

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БЛАЩАК ІВАН ОЛЕКСАНДРОВИЧ

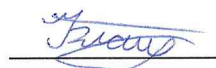
УДК 577, 566, 57.05,
57.08, 599.32, 612.8

ДИСЕРТАЦІЯ
НИЗХІДНА МОДУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ
НОЦИЦЕПТИВНИХ МЕРЕЖ СПИННОГО МОЗКУ

Спеціальність 091 «Біологія»
09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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



Блащак І.О.

Науковий керівник: Білан Павло Володимирович, доктор біологічних наук,
професор, т. в. о. завідувача відділу біофізики сенсорної сигналізації
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Блашак Іван Олександрович. Низхідна модуляція активності нейронів ноцицептивних мереж спинного мозку. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія». – Інститут Фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2025 р.

Ініціація і підтримання болю залежать від складної активності периферичних і центральних нейронних мереж. Первинні аференти передають сенсорні сигнали від рецепторів через ганглії дорзального корінця до сірої речовини спинного мозку, де інформація обробляється проєкційними та локальними нейронами. Ключовими зонами для передачі ноцицептивних сигналів є поверхня дорзального рогу і області навколо центрального каналу (пластинки I та X). Активність нейронів із супраспінальними проєкціями передається далі висхідними трактами у головний мозок. Низхідні шляхи зі стовбура мозку, в першу чергу ті, що проходять в складі задньобічного канатика (ЗБК), модулюють активність спинномозкових ноцицептивних зон, що може посилювати або пригнічувати біль. Механізми цієї низхідної регуляції, особливо у пластинках I та X, залишаються недостатньо вивченими.

Ростральна вентромедіальна зона довгастого мозку (РВДМ) є центральною ретрансляційною станцією серед низхідних шляхів больової регуляції, яка отримує проєкції від кори, периакведуктальної сірої речовини, таламуса та інших структур. Активність РВДМ відіграє роль як у формуванні больових відчуттів, так і їх пригніченні, проте детальне розуміння механізмів цих процесів на рівні спинного мозку досі відсутнє.

Метою роботи було визначення синаптичних механізмів низхідної модуляції нейронних мереж ноцицептивних пластин спинного мозку. Відповідно до мети завданнями роботи було з'ясувати вплив низхідних волокон у складі ЗБК

та низхідних шляхів від РВДМ на первинно-аферентні входи та активність нейронів першої та десятої пластинок спинного мозку гризунів.

Об'єктом досліджень була активність нейронів першої та десятої пластинок дорзального рогу спинного мозку, в той час як предметом досліджень були механізми низхідної модуляції цих нейронів.

У роботі з використанням ряду сучасних методик – електрофізіологічних, фармакологічних та оптогенетичних – проведено дослідження з ціллю відповісти на широке коло окреслених питань. Зокрема, вперше було показано, що активність нейронів ноцицептивних мереж пластинки X спинного мозку майже повністю контролюється низхідними шляхами в складі ЗБК, при цьому модуляторна дія цих шляхів залежить від частоти і тривалості їх активності. За допомогою розробленої методики специфічної фотостимуляції волокон, що походять з РВДМ у *ex-vivo* препараті спинного мозку, вперше було показано, що активація цієї групи низхідних аксонів спричиняє моно- та полісинаптичні гальмівні відповіді в нейронах пластинки I, а також пресинаптично регулює як збуджувальні, так і гальмівні входи у мережі нейронів дорзального рогу.

Низхідні шляхи є потенційними мішенями для фармакологічної терапії патологічних больових станів. Розуміння механізмів хронічного болю неможливе без розуміння нормальної фізіології структур, які беруть участь у його регуляції та підтриманні. Тому подібні дослідження сприятимуть розробці нових та покращенню існуючих засобів лікування хронічного болю, зокрема, спрямованих на відновлення збалансованої низхідної модуляції.

Загалом, в роботі показано, що активність низхідних шляхів, яка відповідає ендogenous, здатна здійснювати повний контроль нейронних мереж люмбарного відділу спинного мозку шляхом одночасного пре- та постсинаптичного інгібування. Підтверджено, що до пресинаптичного інгібування первинних аферентів спільно залучені декілько нейромодуляторів – норадреналін, допамін, серотонін і ендogenous опіоїди. Наведені в роботі дані свідчать про потужну і точну низхідну модуляцію соматосенсорної та вісцеральної ноцицепції у першій і десятій пластинках спинного мозку.

Ключові слова: синаптична передача, спинний мозок, TRP-канали, електрофізіологія, іонний канал; нейрони, вісцеральний біль, мозок, внутрішньоклітинний кальцій, Ca^{2+} -транзєнти, ішемія, ексайтотоксичність, гальмування, викликані постсинаптичні струми; електрична стимуляція.

ANOTATION

Blashchak Ivan. Descending modulation of neuronal activity in the spinal cord nociceptive networks. –Qualification scientific work on the rights of the manuscript. Dissertation for the Philosophy Doctor degree in field of knowledge 09 "Biology" in specialty 091 "Biology and Biochemistry". – Institute of Physiology named after O.O. Bogomolets NAS of Ukraine, Kyiv, 2025.

The initiation and maintenance of pain depend on the complex activity of peripheral and central neuronal networks. Primary afferents transmit sensory signals from receptors through dorsal root ganglia to the gray matter of the spinal cord, where the information is processed by local circuit and projection neurons. Key areas for transmitting nociceptive signals are the surface of the dorsal horn and regions around the central canal (laminae I and X). The activity of neurons with supraspinal projections is further transmitted by ascending tracts to the brain. Descending pathways from the brainstem, primarily those passing through the dorsolateral funiculus (DLF), modulate the activity of spinal nociceptive zones, which can either enhance or suppress pain. The mechanisms of this descending regulation, especially in laminae I and X, remain insufficiently studied. The rostroventromedial medulla (RVM) is a central relay station among descending pain regulation pathways, receiving projections from the cortex, periaqueductal gray, thalamus, and other structures. The activity of the RVM plays a role both in the formation and suppression of pain sensations, but a detailed understanding of the mechanisms of these processes at the spinal cord level is still absent.

The aim of this work was to identify synaptic mechanisms of descending modulation of neuronal networks in the nociceptive laminae of the spinal cord. According to this aim, the tasks were to clarify the influence of descending fibers in the DLF and descending pathways from the RVM on primary afferent inputs and the activity of neurons in laminae I and X of the rodent spinal cord.

The object of the study was the activity of neurons in laminae I and X of the dorsal horn of the spinal cord, while the subject was the mechanisms of descending modulation of these neurons.

Using a range of modern methods—electrophysiological, pharmacological, and optogenetic—research was conducted to answer a broad set of questions outlined above. Notably, for the first time it was shown that the activity of neurons in the nociceptive networks of lamina X of the spinal cord is almost entirely controlled by descending pathways within the LF, with the modulatory effect of these pathways depending on the frequency and duration of their activity. Using a developed method of specific photostimulation of fibers originating from the RVM in an *ex vivo* spinal cord preparation, it was demonstrated for the first time that activation of this group of descending axons causes mono- and polysynaptic inhibitory responses in neurons of lamina I, and also presynaptically regulates both excitatory and inhibitory inputs in the dorsal horn neural networks.

Descending pathways are potential targets for pharmacological therapy of pathological pain states. Understanding the mechanisms of chronic pain is impossible without comprehending the normal physiology of structures involved in its regulation and maintenance. Therefore, such studies will contribute to the development of new and improvement of existing treatments for chronic pain, in particular those aimed at restoring balanced descending modulation.

In general, this work demonstrated that the activity of descending pathways, which corresponds to endogenous pain regulation, is capable of complete control over neuronal networks in the lumbar spinal cord through simultaneous pre- and postsynaptic inhibition. It was confirmed that presynaptic inhibition of primary afferents involves a whole range of neuromodulators—noradrenaline, dopamine, serotonin, and endogenous opioids. The data presented indicate powerful and precise descending modulation of somatosensory and visceral nociception in spinal cord laminae I and X.

Keywords: synaptic transmission, spinal cord, TRP channels, electrophysiology, ion channel; neurons, visceral pain, brain, intracellular calcium,

Ca²⁺ transients, ischemia, excitotoxicity, inhibition, evoked postsynaptic currents;
electrical stimulation

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Krotov, V., **Blashchak, I.**, Moore, J., Moore, A., Romanenko, S., Voitenko, N. and Belan, P. (2025). Optogenetic Approach for Investigating Descending Control of Nociception in Ex Vivo Spinal Cord Preparation. *Bio-protocol* 15(21): e5483. DOI: 10.21769/BioProtoc.5483. (Q3)

2. Koroid, K., **Blashchak, I.**, & Romanenko, S. (2024). The role of TRPV1 and glutamate receptors in the synaptic activity of lamina X neurons of the rat spinal cord. *Fiziologičnij Žurnal*, 70(5), 49–55. <https://doi.org/10.15407/fz70.05.049>

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Blashchak, I.**, Krotov, V., Voitenko, N., Belan, P., Descending control of lumbar spinal cord neurons by rostroventromedial medulla. *FENS Regional Meeting 2021*, Krakov, Poland, poster session

2. **Blaschak I. O.**; Krotov V. V.; Romanenko S. V.; Voitenko N.V.; Belan P. V., Descending control of dorsal horn neurons by rostral ventromedial medulla, *XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2024, Kyiv, Ukraine

3. Koroid K. V.; **Blaschak I. O.**; Romanenko S. V.; Belan P. V., Nociceptive signaling in lamina X neurons: impact of capsaicin and tetrodotoxin, *XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2024, Kyiv, Ukraine

4. К. В. Короїд, **І. О. Блащак**, С. В. Романенко, В. В. Кротов, К. С. Агашков, М. Є. Краснякова, П. В. Білан, Н. В. Войтенко, Сенсорна ноцицептивна активність в першій та десятій пластинці лумбарного відділу спинного мозку щурів в умовах норми та паталогії, *VII науково-практична конференція "Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція"*, 2024, Харків, Україна.

5. К. Короїд; **І. Блащак**; С. Романенко; П. Белан, Пластинка X: вплив капсаїцину та тетродотоксину, *XXIII Читання ім. В. В. Підвисоцького*, 2024, Одеса, Україна

6. **I. Blashchak**, S. V. Romanenko, O. Halaidych, K. Koroid, V. Krotov, B. V. Safronov, Y. M. Usachev, N. V. Voitenko, P. Belan, descending control of nociceptive processing in spinal lamina X, *SfN Neusoscience Meeting Planner*, 2024, Chicago, USA

7. Koroid K.V., Romanenko S.V., **Blashchak I. O.**, Belan P.V Functional diversity of lamina X neurons and their synaptic response to TRPV1 activation. *XIX Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2025, Kyiv, Ukraine

8. **Blashchak I.O.**, Romanenko S.V., Halaidych O.V., Koroid K.V., Krotov V.V., VoitenkoN.V. Belan P.V., Mechanisms of descending control of nociceptive networks in spinal lamina X. *XIX Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2025, Kyiv, Ukraine

9. А. Андрієвська, **І. Блащак**, О. Галайдич, А. Нечай, В. Кротов, П. Білан, Роль низхідних шляхів у регуляції нейронних мереж десятої пластинки спинного мозку, *IX Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»*, 2025, Київ, Україна

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	14
ВСТУП	15
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	22
1.1 Загальна характеристика, класифікація та теорії болю.....	22
1.2 Сенсорні мережі спинного мозку	28
1.3 Низхідні шляхи регуляції болю:.....	33
<i>1.3.1 Ростровентромедіальна зона довгастого мозку (РВДМ)</i>	<i>33</i>
<i>1.3.2 Периакведуктальна сіра речовина (ПАСР)</i>	<i>35</i>
<i>1.3.3 Блакитна пляма</i>	<i>37</i>
1.4 Нейрохімія низхідної регуляції.....	38
1.5 Загальний огляд оптогенетичних та хемогенетичних методик	40
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	43
2.1 Експериментальні тварини	43
2.2 Стереотаксична ін'єкція оптогенетичного конструкту	44
2.3 Виготовлення зрізів та конфокальна мікроскопія.....	47
2.4 Виділення препарату цілого спинного мозку миші.....	48

2.5 Виділення препарату цілої половини спинного мозку щура з збереженим ЗБК.....	57
2.6. Підготовка препарату до петч-клемп реєстрацій, налаштування стимуляційних електродів, реєстрації потенціалу дорзального корінця .	61
2.7 Петч-клемп реєстрації в конфігурації «ціла клітина»	66
2.8 Статистичні методи, аналіз даних	71
РЕЗУЛЬТАТИ	74
3.1. Низхідний контроль ноцицептивної мережі в десятій пластинці спинного мозку.....	74
3.1.1 <i>Деполаризація первинних аферентів викликана стимуляцією ЗБК</i>	<i>74</i>
3.1.2 <i>Вплив частоти стимуляції ЗБК на входи первинних аферентів та мережеву активність нейронів десятої пластинки</i>	<i>79</i>
3.1.3 <i>Вплив кількості стимуляції ЗБК на входи первинних аферентів та мережеву активність нейронів десятої пластинки</i>	<i>84</i>
3.1.4 <i>Вплив стимуляції ЗБК на можливість генерації нейронами десятої пластинки потенціалів дії при стимуляції ДК.....</i>	<i>87</i>
3.1.5 <i>Часові аспекти низхідної модуляції</i>	<i>89</i>
3.1.6 <i>Дослідження TRPV1-активованих синаптичних входів до нейронів пластинки X.....</i>	<i>90</i>

3.2. Низхідний контроль ноцицептивної мережі в першій пластинці спинного мозку.....	102
<i>3.2.1. Розробка методики для вивчення низхідної РВДМ-опосередкованої модуляції ноцицептивних мереж пластинки I дорзального рогу</i>	<i>102</i>
<i>3.2.2. Експресія AAV9-hSyn-EGFP конструкту після ін'єкції в РВДМ.....</i>	<i>105</i>
<i>3.2.3. Експресія AAV9-ChR2-YFP конструкту після ін'єкції в РВДМ</i>	<i>107</i>
<i>3.2.4 Модуляція сенсорних входів у нейрони пластинки I стимуляцією низхідних аксонів РВДМ</i>	<i>110</i>
<i>3.2.5 Відповіді нейронів пластинки I на оптичну стимуляцію низхідних аксонів від РВДМ.</i>	<i>115</i>
3.3. Роль нейромодуляторних систем у загальному пресинаптичному інгібуванні.....	119
<i>3.3.1 Деполяризація первинних аферентів викликана стимуляцією дорзального корінця</i>	<i>119</i>
<i>3.3.2 Вплив норадреналіну на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК).....</i>	<i>121</i>
<i>3.3.3 Вплив допаміну на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК).....</i>	<i>127</i>

3.3.4 Вплив серотоніну на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК).....	130
3.3.5 Вплив DAMGO на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК).....	132
3.3.6 Комбінована дія нейромодуляторів	134
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	139
4.1 Низхідні шляхи дорзолатерального канатика	139
4.2. Низхідна модуляція у десятій пластинці люмбарної частини спинного мозку.....	140
4.3 Низхідна модуляція у першій пластинці люмбарної частини спинного мозку.....	145
ВИСНОВКИ	148
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	150

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГПСС	–	гальмівний постсинаптичний струм
ЗПСС	–	збуджувальний постсинаптичний струм
ПД	–	потенціал дії
ЦНС	–	центральна нервова система
РВДМ	–	ростро-вентромедіальний довгастий мозок
ПАСР	–	периакведуктальна сіра речовина
ДПА	–	деполяризація первинних аферентів
ЗБК	–	задньобічний канатик
ChR2		каналородопсин другого типу (Channelrhodopsin II)
TTX		тетродотоксин (tetrodotoxin)
GFP		зелений флуоресцентний білок (green fluorescent protein)
YFP		жовтий флуоресцентний білок (yellow fluorescent protein)

ВСТУП

Актуальність теми

Гострий біль є необхідним для життя, адже він сигналізує про потенційну небезпеку та привертає увагу, вимагаючи від людини зміну поведінки, що допоможе уникнути подальшого травмування. Тим не менше, іноді критично потрібною є здатність регулювати відчуття болю. Для цього існують нейробіологічні механізми модуляції болю. Розуміння того, як мозок пригнічує сприйняття болю, може сприяти не лише розумінню закономірностей адаптаційної поведінки, але й розробці ліків для боротьби з хронічним боєм, патологічним видом болю, позбавленим біологічних цілей.

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).

Лікування хронічного болю досі залишається значним викликом для сучасної медицини. Відповідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CIDI 2.0 60,4 відсотка з опитаних людей в Україні, стикались з хронічним боєм (Xu et al., 2019). Наявні методи фармакологічної терапії гострого болю неефективні при хронічних больових станах, що вказує на різні механізми в основі їх виникнення. Окрім традиційних знеболювальних засобів, у терапії хронічного болю широко застосовуються нейроактивні сполуки, зокрема антидепресанти та протисудомні препарати. Проте їх використання супроводжується низкою клінічних ризиків, таких як побічні ефекти, взаємодія між лікарськими засобами та кумулятивна токсичність, що становить особливу загрозу для вразливих груп населення, зокрема ветеранів. Ці терапевтичні виклики підкреслюють складну природу болю як сенсорного досвіду, та

актуалізують потребу в глибокому розумінні функціонування нейронних мереж, що лежать в основі різних форм болю.

В основі ініціації та підтримання різних видів болю лежить активність складної мережі периферичних і центральних нейронів. Первинні аференти отримують сенсорні сигнали через периферичні рецептори і передають їх через ганглії дорзального корінця до сірої речовини спинного мозку. Подальша обробка сенсорної інформації відбувається у проекційних та локальних мережевих нейронах спинного мозку. Найважливішими зонами для опрацювання і передачі ноцицептивної інформації є поверхня дорзального рогу та область сірої речовини навколо центрального каналу (пластинки I та X за Рекседом) (Sikandar & Dickenson, 2012; Todd, 2010).

Результуюча активність нейронів цих зон, що мають супраспінальні проекції (спинномозкові проекційні нейрони) передається через висхідний передньобічний тракт у кілька областей головного мозку. Після обробки цієї інформації мозок формує сигнали зворотного зв'язку, які передаються у спинний мозок низхідними шляхами, в першу чергу, тими, що проходять у задньобічному канатику (ЗБК) (Basbaum & Fields, 1979). Ці шляхи здані модулювати активність локальних мережевих і проекційних нейронів ноцицептивних зон спинного мозку, що призводить до посилення або пригнічення болю. Однак, на рівні спинного мозку механізми низхідної регуляції залишаються нез'ясованими, особливо для ноцицептивних зон, таких як пластинки I та X.

Ростральна вентромедіальна зона довгастого мозку (РВДМ), яка розташована в стовбурі мозку і отримує проекції “зверху вниз” від нейронів кори, периакведуктальної сірої речовини (ПАСР), таламуса, парабрахіальних ядер та інших енцефальних областей, є найважливішою ретрансляційною станцією в низхідному шляху регуляції болю (WeiWei et al., 2021). Активність РВДМ значною мірою сприяє як виникненню та підтримці, так і пригніченню болю. (Chen & Heinricher, 2019). Однак роль проекцій РВДМ до пластинок I та X спинного мозку при гострому та хронічному болю залишається нез'ясованою, що

ускладнює розробку нових препаратів, націлених на нейрони РВДМ та пов'язані низхідні шляхи.

Велика частина роботи присвячена вивченню особливостей низхідної модуляції пластинки Х спинного мозку – зони, яка незважаючи на участь у низці життєво важливих функцій, залишається однією з найменш вивчених областей центральної нервової системи. Зокрема, пластинка Х бере участь у процесах сприйняття болю, який походить від внутрішніх органів – вісцероноцицепції (Cervero & Laird, 2004; Lantéri-Minet et al., 1993). Окрім того, ця зона спинного мозку отримує входи від супраспінальних центрів моторного контролю, що доводить її участь в локомоції (Ruder et al., 2016). Як ноцицептивна, так і локомоторна функції залежать від модуляції первинно-аферентного входу сегментарними аферентами і низхідними волокнами. Тому розуміння клітинних та нейрохімічних механізмів низхідної модуляції активності нейронів пластинки Х є актуальним завданням як фундаментальної фізіології, так і прикладної фармакології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу молекулярної біофізики (з 23.10.2023 р. – відділу біофізики сенсорної сигналізації) Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт:

«Дослідження низхідної регуляції активності сенсорних нейронів різних типів поверхневих ламін дорзального рогу та ламіни Х, в нормі та при розвитку хронічних больових синдромів» (2024–2028; № держ. реєстрації – 0124U001557);

«Функціональні характеристики нейронів спинного мозку та їх зміни при різноманітних патологіях та травмах» (2019–2023; № держ. реєстрації – 0118U007346);

«Роль TRP каналів у вісцеральній ноцицепції та порушенні скоротливої активності гладеньких м'язів, викликаній дією загальних анестетиків» (2022–2023; № держ. реєстрації – 0124U001557);

«The Role of the Complement System in Spinal Mechanisms of Chronic Pain»
(2019–2024 National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, USA)

Мета роботи: визначення синаптичних механізмів низхідної модуляції нейронних мереж ноцицептивних пластин спинного мозку.

Відповідно до мети було поставлено наступні **завдання**:

- З'ясувати вплив низхідних волокон у складі задньобічного канатика (ЗБК) на первинно-аферентні входи та активність нейронів пластинки X спинного мозку щурів.
- Охарактеризувати залежність низхідної модуляції аферентних входів у пластинці X спинного мозку від частоти та кількості стимуляцій ЗБК.
- Розробити методику специфічної оптогенетичної стимуляції аксонів та терміналей нейронів ростровентромедіального довгастого мозку (РВДМ), що опосередковують низхідну модуляцію спинномозкових ноцицептивних мереж.
- З використанням розробленої методики виявити входи від нейронів РВДМ до нейронів пластинки I люмбарної частини спинного мозку мишей.
- Встановити дію низхідних шляхів від РВДМ на входи від первинних аферентів до нейронів пластинки I люмбарної частини спинного мозку мишей.
- Встановити вплив нейромодуляторів, що виділяються низхідними шляхами, на пресинаптичне інгібування периферичних аферентів.

Об'єкт досліджень: Активність нейронів I і X пластинок дорзального рогу спинного мозку.

Предмет досліджень: Механізми низхідної модуляції нейронів I і X пластинок дорзального рогу спинного мозку.

Використані методи

У роботі використовували наступні методи: виділення препарату цілого спинного мозку мишей, виділення препарату цілої половини спинного мозку щурів, стереотаксичні ін'єкції генетичних конструктів, лазерна конфокальна флуоресцентна мікроскопія, фотостимуляція каналородопсин-експресуючих клітин (оптогенетика), реєстрація потенціалу дорзального корінця, петч-клемп реєстрації в конфігурації «ціла клітина», електрична стимуляція корінців та низхідних трактів, методика бічного інфрачервоного освітлення, статистичні методи: непараметричні тести Манна-Вітні або Колмогорова-Смірнова, тест Шاپіро-Вілка, t-тест Стьюдента, точний тест Фішера.

Наукова новизна одержаних результатів

В результаті роботи вперше було розроблено методику експресії каналородопсину другого типу (ChR2) в ростровентромедіальних нейронах довгастого мозку (РВДМ), що дозволяє селективно активувати аксони та терміналі низхідних волокон РВДМ у *ex-vivo* препараті цілого спинного мозку. Ця методика дозволяє досліджувати як пре-, так і постсинаптичні механізми низхідної модуляції у фізіологічних та патологічних больових станах. Оптогенетика, у поєднанні із реєстраціями з використанням методу петч-клемп вперше дозволила ідентифікувати моно- та полісинаптичні гальмівні входи від РВДМ до спинномозкових нейронів пластинки I та виявити РВДМ-обумовлене пресинаптичне гальмування первинних аферентних входів.

В роботі було висловлено гіпотезу, що низхідні шляхи в складі ЗБК здійснюють диференційний пресинаптичний волюметричний контроль первинних аферентів та локальної мережі в поперековій пластинці X. Вперше продемонстровано, що модуляторна дія низхідних шляхів ЗБК на ноцицептивні входи до нейронів пластинки X залежить від частоти та тривалості їх активності,

а також те, що ці входи перебувають під повним низхідним контролем з боку шляхів у складі ЗБК.

Практичне значення одержаних результатів

Низхідні шляхи є потенційними мішенями для фармакологічної терапії патологічних больових станів. Розкриття особливостей фізіологічних механізмів низхідної регуляції в структурах спинного мозку може стати першим кроком для подальшого розуміння патологічних змін, що можуть виникати у цій системі та призводити до хронічних больових станів. Наші дослідження сприятимуть покращенню стратегій лікування болю та розробці нових терапевтичних засобів, спрямованих на відновлення збалансованої низхідної модуляції у пацієнтів з хронічними больовими станами.

В ході виконання роботи було розроблено комп'ютерну програму для автоматичного аналізу та візуалізації даних мініатюрної синаптичної активності. Сфера її застосування не обмежується вивченням синаптичних входів до ноцицептивних зон спинного мозку, адже її можна застосовувати для будь-яких електрофізіологічних досліджень, де реєструється спонтанна та/або мініатюрна активність нейронів, її зміни у часі чи під дією якихось факторів.

Особистий внесок здобувача

Дисертантом самостійно проведено аналіз літератури стосовно теми дослідження. Експериментальна робота з дослідження низхідної модуляції нейронів ноцицептивних зон спинного мозку, зокрема стереотаксичні ін'єкції, виділення препаратів, петч-клемп реєстрації викликаних постсинаптичних струмів, статистична обробка та узагальнення результатів проведені безпосередньо дисертантом.

Розробка основної наукової ідеї формулювання мети і завдань дослідження, планування експериментальних робіт, обговорення результатів експериментів та формування висновків досліджень проводились за участю наукового керівника, доктора біологічних наук, професора П. В. Білана.

Аналіз кількісних результатів електрофізіологічних експериментів та оформлення публікацій були проведені разом із співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи доповідались на щорічній конференції Американського товариства нейронаук (Сан-Дієго, США, 2022; Чикаго, США, 2024), регіональній зустрічі федерації європейських товариств нейронаук (Краків, Польща 2021), XVIII та XIX Всеукраїнських конференціях молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна, 2024; Київ, Україна, 2025), міжнародній конференції з нейронаук та наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології, на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (Київ, Україна, 2024), а також на внутрішніх доповідях-семінарах у відділі біофізики сенсорної сигналізації та Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця.

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 8 друкованих робіт: 1 стаття у міжнародному науковому журналі (який входить до третього квартиля (Q3) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), 1 стаття у вітчизняному науковому журналі (проіндексованому у базі даних Scopus) та 9 тез на міжнародних (4) та вітчизняних (5) наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації

Дисертацію викладено українською мовою на 164 сторінках та ілюстровано 69 рисунками. Вона складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і основних методів дослідження, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків, списку із 142 використаних джерел.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальна характеристика, класифікація та теорії болю

За визначенням Міжнародної асоціації з вивчення болю (International Association for the Study of Pain, IASP), «біль – це неприємний сенсорний і емоційний досвід, пов'язаний або схожий на такий, що пов'язаний з фактичним або потенційним пошкодженням тканин" (Raja et al., 2020).

Також існує поняття ноцицепція – це нервовий процес кодування та передачі сигналів, що генеруються ноцицептивними подразниками – такими, що зазвичай викликають відчуття болю. Ноцицепція, як фізіологічний процес, може відбуватися без свідомого відчуття болю, про що свідчать, наприклад, спинномозкові рефлексії у людей з порушенням функції мозку (Sneddon, 2018). Біль, навпаки, – це свідоме, суб'єктивне відчуття, яке виникає в результаті обробки ноцицептивних сигналів центральною нервовою системою, але також включає емоційні та когнітивні компоненти. У людей біль – це складна ознака – особистий досвід – з численними, складними взаємодіями між генетичними, нейробиологічними, психосоціальними та екологічними впливами. На молекулярно-генетичному рівні виявлено декілька десятків генів, пов'язаних з патологіями аферентної ланки больової чутливості (James, 2013).

Біль класифікують різними способами через його складність та неоднорідність, але фундаментальне розмежування проводиться на основі патофізіології між ноцицептивним та нейропатичним болем (Nicholson, 2006). Ця класифікація схвалена Міжнародною асоціацією з вивчення болю (IASP) та відображена в класифікації хронічного болю МКХ-11.

Ноцицептивний біль виникає внаслідок фактичного або загрозового пошкодження нервової тканини та спричинений активацією ноцицепторів, які є спеціалізованими сенсорними нейронами, що реагують на потенційно шкідливі механічні, термічні або хімічні подразники. Цей тип болю є нормальною фізіологічною реакцією на пошкодження тканин або запалення та виконує захисну функцію, сприяючи відстороненню від шкідливих подразників та

полегшуючи загоєння через відпочинок. Ноцицептивний біль далі поділяється на соматичний біль, що виникає зі шкіри, м'язів, суглобів та кісток, який зазвичай є гострим та добре локалізованим, та вісцеральний біль, що виникає з внутрішніх органів, який, як правило, є тупим, дифузним та погано локалізованим. Типовими прикладами ноцицептивного болю є біль від опіків, переломів, артриту та післяопераційних ран.

Нейропатичний біль, навпаки, спричинений ураженням або захворюванням, що вражає саму соматосенсорну нервову систему, периферичну чи центральну. Цей біль виникає внаслідок аномальної нейронної активності, а не внаслідок прямої стимуляції ноцицепторів. Нейропатичний біль часто є хронічним, може бути спонтанним або викликаним, і зазвичай описується як печіння, стріляючий або електричний. До поширених станів, пов'язаних з нейропатичним болем, належать діабетична периферична нейропатія, невралгія трійчастого нерва, постгерпетична невралгія та травма нервів. Неврологічне пошкодження, що лежить в основі нейропатичного болю, може змінювати сигнальні шляхи та обробку болю, сприяючи постійному болю навіть за відсутності постійного пошкодження тканин.

Віднедавна окрім ноцицептивного та нейропатичного болю прийнято виділяти ще й ноципластичний біль. Це біль, що виникає через порушення процесів сприйняття болю, навіть коли немає очевидних пошкоджень тканин чи нервів. До цього виду болю відносять, наприклад, фіброміалгію і деякі форми хронічного розповсюдженого болю. Він проявляється підвищеною чутливістю до больових сигналів через складні зміни в центральній нервовій системі, зокрема змінену регуляцію болю і посилення реакції нейронів на подразники. Але крім болю, цей стан часто супроводжується втомою, проблемами зі сном і порушеннями мислення, що свідчить про загальне порушення механізмів обробки болю.

Запальні та патологічні болі характеризуються тим, що біль виникає не лише у відповідь на шкідливі стимули, а й може з'являтися спонтанно без будь-якого подразника. Дослідження показали, що ноцицептивна система здатна

зазнавати значних змін (пластичності) під впливом запальних медіаторів, факторів росту, активності та травм. Ці зміни відбуваються у ноцицепторах, які під час запалення підвищують чутливість, а їхні аксони можуть генерувати спонтанні імпульси. Тіла клітин змінюють експресію і транспорт білків, а синапси в спинному мозку посилюються або перебудовуються структурно. Подібні процеси відбуваються й у спинному мозку та головному мозку, за участю нейронів і глії, що спричиняє центральну сенситизацію – зниження порогу болю і посилення його тривалості, інтенсивності та поширення (Woolf, 2010).

Для пояснення фізіологічних основ болю історично було запропоновано декілька теоретичних концепцій. З них чотири найвпливовіші теорії відчуття болю включають теорію специфічності (або виділеної лінії), інтенсивності, паттерну та ворітного контролю болю. Усі вони мають під собою певне фактичне підґрунтя, хоча жодна з них ще повністю не враховує всі аспекти сприйняття болю (Moayedī & Davis, 2013).

Теорія інтенсивності була висловлена однією із перших – її запропонував Вільгельм Ерб у 1874 році. Суть полягає у тому, що інтенсивне подразнення рецепторів будь-якої модальності може спричиняти біль. В ній говориться про те, що рецептори будь-якого типу можуть викликати больові відчуття, і залежить це виключно від інтенсивності сигналу. Ця теорія виявилася не зовсім правильною, адже, хоча деякі сенсорні волокна справді реагують як на больові, так і на не больові стимули, проте, існують інші – ноцицептори – волокна, що відповідають виключно на больові стимули. Артур Гольдшайдер розвинув теорію інтенсивності на основі експерименту, проведеного Бернхардом Науніном у 1859 році. Ці експерименти показали, що повторна тактильна стимуляція (нижче порогу тактильного сприйняття) викликає біль у пацієнтів із сифілісом, у яких дегенерували спинні стовпи. Коли цей стимул пред'являли пацієнтам 60–600 разів на секунду, у них швидко розвивався те, що вони описували як нестерпний біль. Наунін відтворив ці результати в серії експериментів з різними типами стимулів, включаючи електричні стимули. Був зроблений висновок, що має бути якась форма сумації, щоб підпорогові стимули стали нестерпно

болючими. Гольдшайдер запропонував нейрофізіологічну модель для опису цього ефекту сумації: повторна підпорогова стимуляція або надпорогова гіперінтенсивна стимуляція може викликати біль (див. рис. 1В). Він також припустив, що посилений сенсорний вхід буде сходитися та сумуватися в сірій речовині спинного мозку. Ця теорія конкурувала з теорією специфічності болю, яку відстоював вон Фрей. Однак ця теорія втратила підтримку еволюційної основи теорії специфічності Шеррінгтона та постулювала існування сенсорних рецепторів, спеціалізованих для реагування на шкідливі подразники, для яких він і ввів термін «ноцицептор».

Теорія специфічності, по суті, є прямим запереченням теорії інтенсивності. Вона постулює специфічний шлях, по якому, і лише по ньому передається виключно больова інформація. Електрофізіологічні дослідження справді свідчать про наявність характерних специфічних ознак окремої больової сенсорної системи: 1) специфічних рецепторів – ноцицепторів; 2) специфічних нейромедіаторів; 3) специфічних провідних шляхів. Система, що здійснює введення інформації від ноцицепторів до ЦНС, її обробку на різних рівнях, наслідком чого є виникнення відчуття болю, отримала назву ноцицептивної системи.

У спробі переглянути теорії сомаестези (включаючи біль), Дж. П. Нафе постулював «кількісну теорію відчуття» (1929). Ця теорія ігнорувала висновки щодо спеціалізованих нервових закінчень та багато спостережень, що підтверджують специфічні та/або інтенсивні теорії болю. Теорія стверджувала, що будь-яке сомаестетичне відчуття виникає завдяки специфічному та особливому патерну нейронної стимуляції, і що просторовий та часовий профіль стимуляції периферичних нервів кодує тип та інтенсивність стимулу. (Lele et al., 1954) відстоювали цю теорію та додали, що шкірні сенсорні нервові волокна, за винятком тих, що іннервують волоскові клітини, є однаковими. На підтвердження цього твердження вони посилалися на роботу, яка показала, що спотворення нервового волокна призведе до розряду потенціалів дії в будь-якому нервовому волокні, незалежно від того, інкапсульоване воно чи ні. Крім того, інтенсивна

стимуляція будь-якого з цих нервових волокон спричинить сприйняття болю (Sinclair, 1958).

У 1965 році Рональд Мелзак та Чарльз Патрік Волл (Melzack & Wall, 1965) запропонували теорію, яка мала революціонізувати дослідження болю: теорію контролю болю через ворота. Теорія ворітного контролю визнала експериментальні дані, що підтверджували теорії специфічності та патерну, і запропонувала модель, яка могла б пояснити ці, здавалося б, суперечливі висновки. У знаковій статті Мелзак та Волл ретельно обговорили недоліки теорій специфічності та патерну – двох домінуючих теорій епохи – і спробували подолати розрив між цими теоріями за допомогою структури, заснованої на аспектах кожної теорії, які були підтверджені фізіологічними даними. Зокрема, Мелзак та Волл визнали, що існують ноцицептори (больові волокна) та сенсорні волокна, і припустили, що ці волокна синапсуються у двох різних областях заднього рогу спинного мозку: клітинах желатинової субстанції та «передавальних» клітинах. Модель (рис. 1 Д) припускала, що сигнали, що утворюються в первинних аферентних нейронах внаслідок стимуляції шкіри, передаються до трьох областей спинного мозку: 1) желатинової субстанції, 2) дорзального стовпа та 3) групи клітин, які вони назвали передавальними клітинами. Вони припустили, що воротами в спинному мозку є желатинова субстанція в дорзальному розі, яка модулює передачу сенсорної інформації від первинних аферентних нейронів до передавальних клітин у спинному мозку. Цей механізм воріт контролюється активністю великих і малих волокон. Активність великих волокон пригнічує (або закриває) ворота, тоді як активність малих волокон сприяє (або відкриває) ворота. Активність низхідних волокон, що беруть початок у супраспінальних областях і проєктуються до дорзального рогу, також може модулювати ці ворота. Коли ноцицептивна інформація досягає порогу, що перевищує викликане гальмування, вона «відкриває ворота» та активує шляхи, що призводять до відчуття болю та пов'язаної з ним поведінки. Таким чином, теорія болю, заснована на ворітному контролі, забезпечила нейронну основу для висновків, які підтвердили та фактично допомогли узгодити очевидні відмінності

між теоріями болю, заснованими на патерні активності, та теоріями специфічності.

Теорія "вхідних воріт", або ворітна теорія – у системі аферентного входу в спинний мозок діє механізм регуляції проходження ноцицептивної імпульсації з периферії у мозок. Такий контроль здійснюється гальмуючими нейронами драглистої субстанції, які активуються імпульсами з периферії по товстих нервових волокнах типу А-альфа та А-бета. "Вхідні ворота" контролюються низхідними впливами структур головного мозку, які блокують передачу ноцицептивних імпульсів від первинних аферентів до релейних нейронів.

У 20 столітті Рональдом Мельзаком та Патріком Уоллом було сформульовано ворітну теорію (Melzack & Wall, 1965). Згідно з запропонованою ними теорією, тонкі (больові А δ - і С-волокна) і товсті(А β) волокна, що реагують на дотики, тиск, вібрації) нервові волокна несуть інформацію від місця пошкодження двома шляхами до дорзального рогу спинного мозку, де активність товстих волокон пов'язана із тонкими волокнами через інгібіторні клітини, в результаті чого, при одночасному стимулюванні двох типів волокон біль відчувається не так сильно. Тобто, нервові мережі спинного мозку формують «ворота», що здатні за певних умов фільтрувати інформацію, яка приходить з ноцицепторів.

Гострий біль є необхідною складовою життя, адже він сигналізує про потенційну небезпеку та привертає увагу, вимагаючи від людини зміну поведінки, що допоможе уникнути подальшого травмування. Тим не менше, іноді критично потрібною є здатність регулювати відчуття болю. Наприклад, під час ситуацій, що загрожують життю, таких як протистояння здобич-хижак, сприйняття болю слід придушити, щоб дозволити тварині, яка перебуває під загрозою, захистити себе незважаючи на больовий подразник. Для досягнення цієї мети існують нейробіологічні механізми модуляції болю. Розуміння того, як мозок пригнічує сприйняття болю, може сприяти не лише розумінню

закономірностей адаптаційної поведінки, але й розробці ліків для боротьби з хронічним болем, патологічним видом болю, позбавленим біологічних цілей.

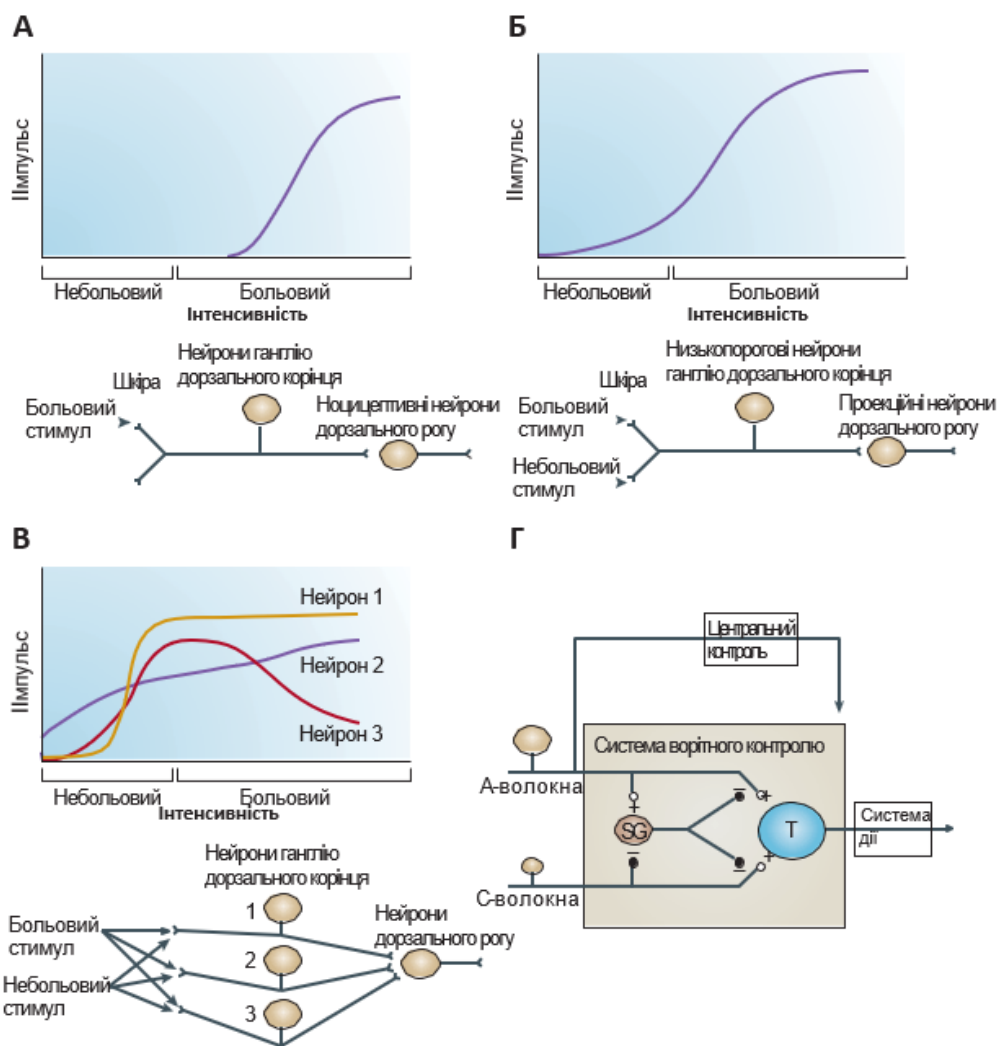


Рисунок 1.1 Схематичні ілюстрації чотирьох основних теорій відчуття болю: А) специфічності (або виділеної лінії), Б) інтенсивності стимулу, В) паттерну , Д) ворітного контролю болю. Ілюстрацію адаптовано з: (Perl, 2007)

1.2 Сенсорні мережі спинного мозку

Сенсорні мережі спинного мозку - це сукупність нейронних структур, які приймають, обробляють та передають сенсорну інформацію від периферичних рецепторів до вищих рівнів центральної нервової системи. Найбільш вивченими серед них є дорзально-медіальний лемнісковий шлях, антеролатеральна система

та спіноцеребелярні шляхи. У контексті дослідження болю доцільно ближче розглянути антеролатеральну систему.

Антеролатеральна система спинного мозку – це комплекс висхідних трактів, які передають ноцицептивну, термічну та грубу тактильну інформацію від периферії до головного мозку. Основним її компонентом є спиноталамічний тракт (латеральний і передній пучки), що проводить сигнали до вентрально-постеролатерального ядра таламуса (Wang et al., 2022).

Поряд із ним функціонують інші проєкції – спіноретикулярний, спіно-мезенцефалічний і спіно-гіпоталамічний шляхи, які передають інформацію до ретикулярної формації, середнього мозку та гіпоталамуса, залучаючись у регуляцію афективних і вегетативних реакцій на біль (Willis & Coggeshall, 2004)

Первинні аферентні нейрони входять до заднього рогу спинного мозку, де утворюють синапси з нейронами другого порядку в пластинах I–V за Рекседом (Todd, 2002, 2022)

Аксони цих нейронів перехрещуються в передній білій комісурі і піднімаються контралатерально в складі антеролатерального канатика. На рівні стовбура мозку частина волокон віддає колатералі до ретикулярної формації й періакведуктальної сірої речовини, що забезпечує інтеграцію сенсорних і мотиваційно-афективних аспектів болю (Naser & Kuner, 2018)

Сенсорна інформація надходить у спинний мозок через первинні аферентні волокна в складі заднього корінця. В залежності від порогу активації їх поділяють на низько- та високопорогові волокна. Ноцицептивну інформацію переважно передають високопорогові волокна. За швидкістю проведення волокна поділяють на А- (швидкі, мієлінізовані), В- (менш мієлінізовані у порівнянні з А-волокнами) та С- (повільні, немієлінізовані) волокна.

Нервові волокна групи А, за класифікацією Ерлангера й Гассера, є мієлінізованими й поділяються на підтипи А α , А β , А γ та А δ , кожен зі своїми характеристиками (Whitwam, 1976). Ці волокна переважно закінчуються в пластинках I, III, IV та V дорзального рогу спинного мозку, з незначними проєкціями вглиб пластинки II. Тип А α об'єднує як волокна Ia, так і Ib, що

походять від м'язових волокон та рецепторів Гольджі сухожилля. Головна їх функція – передача пропріоцептивної інформації. Тип А β – це низькопорогові шкірні механорецептори, що можуть адаптовуватись як повільно, так і швидко. Їх відносяться до типу II аферентів м'язових волокон. Волокна А β переважно проєктуються в пластинки III–IV дорзального рогу спинного мозку. Тип А γ також відноситься до II типу волокон, що іннервують м'язові веретена, підтримуючи їхній тонус і чутливість до розтягнення. Тип А δ – це мієлінізовані ноцицептори, що передають термальні й механічні больові сигнали. Вони відносяться до типу III аферентів і закінчуються в пластинках I та V дорзального рогу. Діаметр волокон А δ становить приблизно 2-5 μm , а швидкість проведення імпульсу – близько 30 м/с; вони відповідають за короткочасний, колючий біль (Abraira & Ginty, 2013).

Волокна групи В мають помірну мієлінізацію та швидкість проведення імпульсу 3-14 м/с. До них належать прегангліонарні волокна автономної нервової системи і загальні вісцеральні аферентні волокна (Yam et al., 2018).

Волокна групи С є немієлінізованими, їхній діаметр менший за 2 μm , а швидкість проведення становить близько 0,2 м/с. До цієї групи належать чутливі волокна задніх корінців (тип IV аферентів) і постгангліонарні волокна симпатичного та парасимпатичного відділів автономної нервової системи. Переважна їхня функція – ноцицепція. Вони передають близько 70 % больових сигналів у спинний мозок і закінчуються в пластинках I та II сірої речовини спинного мозку. С-волокна є полі-модальними ноцицепторами, що активуються термічними, механічними та хімічними стимулами, і відповідають на нечітко локалізовані відчуття, наприклад печіння шкіри. За нейрохімічними ознаками їх поділяють на пептидергічні та непептидергічні. Близько 50 % С-волокон є пептидергічними. Вони експресують кальцитонін-ген-асоційовані пептиди нейрокініни та субстанцію Р (Yam et al., 2018).

Сенсорна інформація через певну кількість переключень доходить до проєкційних нейронів, чий аксон залишають межі цього сегмента й прямують до вищих центрів.

Проекційні нейрони гетерогенні за своїм складом. Зазвичай це великі за розміром клітини, що зустрічаються у пластинках I, III–VI (Browne et al., 2021). Існують молекулярно відмінні класи та функціональні класифікація, між якими є певна закономірність. Також вони відрізняються за мішенню, до якої вони прямують. Саме больові проекційні нейрони переважно закінчуються в бічному парабрахіальному ядрі, що дозволяє використовувати цю зону для їх ретроградного мічення (Deng et al., 2020). Функціонально в пластинці I можна виділити три типи спіно-парабрахіальних проекційних нейронів, в залежності від паттернів відповіді на входи від С-волокон первинних аферентів (Agashkov et al., 2019).

Окрім проекційних у спинному мозку багато інтернейронів, які забезпечують обробку інформації. Серед них є як збуджувальні, так і гальмівні нейрони. Останні забезпечують "фільтрацію" вхідного сигналу, працюючи таким чином "воротами", згаданими вище. Гальмування може бути постсинаптичним, якщо воно спрямоване на нейрон і запобігає генерації ПД, або пресинаптичним, якщо працює через аксо-аксональні гальмівні синапси. Такі у великій кількості є, зокрема, у на первинних аферентах з дорзальних корінців. Гломерули – особливі мікроанатомічні структури, які забезпечують пресинаптичне інгібування.

Гломерули у поверхневому дорзальному рогу спинного мозку щурів можна поділити на два морфологічно відмінні типи (Ribeiro-da-Silva & Coimbra, 1982; Todd, 1996), які зосереджені навколо терміналей немієлінізованих та мієлінізованих первинних аферентних волокон відповідно.

Залежно від типу нейромедіаторів у спинному мозку виділяють три основні типи гальмівних нейронів і терміналей: ГАМК-ергічні, гліцинергічні та змішані ГАМК/гліцин-ергічні (Shimizu-Okabe et al., 2022). Вони організовані у локальні нейронні ланцюги, які відіграють важливу роль у контролі ноцицепції, моторної координації та генерації дихальних ритмів. У процесі постнатального розвитку частина ГАМК-ергічних нейронів пластинок III–IV набуває здатності до співвивільнення гліцину, тоді як у поверхневих пластинках I–II більшість

клітин зберігає чисто ГАМК-ергічний фенотип до завершення дозрівання. Незважаючи на їх відносно широке поширення, проекційні нейрони становлять лише 5% від усіх нейронів у пластинці I і лише 1% від нейронів у пластинках I і II (Browne et al., 2021).

Збуджувальні інтернейрони у свою чергу становлять 60-70% загальної кількості локальних нейронів у пластинках I і II (Das Gupta et al., 2021). Вони використовують глутамат як основний нейромедіатор і можуть додатково експресувати нейропептиди, що визначають їхню модальність. Тас1-позитивні нейрони, які вивільняють субстанцію Р, залучені переважно у передачу ноцицептивних сигналів, а саме – гострого болю. GRP-експресуючі клітини відповідають за передачу відчуття свербіння. ССК-позитивні нейрони беруть участь у формуванні механічної гіперчутливості та алодинії. Nts-позитивні інтернейрони асоціюються з термочутливістю, а NPFF-експресуючі нейрони можуть бути залучені як у ноцицептивну, так і у антиноцицептивну регуляцію (Gutierrez-Mecinas et al., 2016). Загальна схема організації сенсорних нейронних мереж наведена на рисунку 1.2.

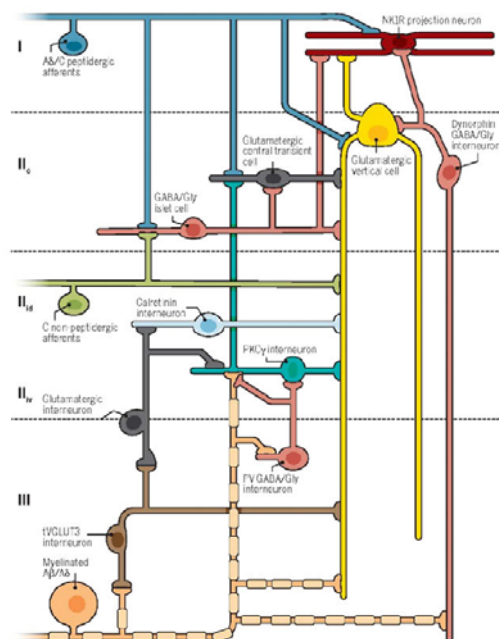


Рис. 1.2. Ламінарна організація ноцицептивної мережі у дорзальному розі спинного мозку

1.3 Низхідні шляхи регуляції болю:

1.3.1 Ростровентромедіальна зона довгастого мозку (РВДМ)

Спочатку РВДМ був описаний як «центр знеболювання» після демонстрації того, що низькоінтенсивна (<10 мкА) електрична стимуляція в цій області викликає потужну антиноцицепцію, а опіоїди частково здійснюють свій знеболювальний ефект через дію в РВДМ (H. L. Fields & Heinricher, 1985). Однак згодом було показано, що функції РВДМ значно складніші. Всупереч цій початковій концептуальній рамці, РВДМ не тільки пригнічує біль, але й може полегшувати його, сприяючи гіпералгезії (Heinricher, 2016; Heinricher et al., 2009; Porreca, 2002). Крім того, РВДМ також бере участь у вегетативній функції (Mason, 2005; Morrison & Nakamura, 2019). Однак модуляція болю РВДМ може бути відокремлена від вегетативного контролю (Vianna et al., 2008), що свідчить про те, що різні функції РВДМ опосередковуються різними популяціями клітин. Тому вкрай важливо ідентифікувати конкретні типи клітин РВДМ, які опосередковують низхідний контроль болю.

Достовірність категоризації OFF/ON-клітин для класифікації нейронів РВДМ додатково підтверджується різними фармакологічними профілями, що демонструються цими двома класами клітин (De Preter & Heinricher, 2024; Neubert et al., 2004). Наприклад, опіоїди безпосередньо пригнічують активацію ON-клітин, не справляючи прямого впливу на OFF-клітини. Хоча OFF-клітини активуються, коли опіоїди вводяться таким чином, що це викликає антиноцицепцію, ця активація є непрямою, через розгальмування (Heinricher et al., 1992, 1994).

Нейрони РВДМ, які не виявляють змін у збудженні на шкідливу стимуляцію, вважаються третім класом – «нейтральними клітинами». На відміну від чіткого розуміння функцій OFF- та ON-клітин, роль нейтральних клітин залишається значною мірою загадкою. Як і OFF- та ON-клітини, принаймні деякі нейтральні клітини проектується до спинного мозку, хоча неясно, чи є задній ріг їхньою конкретною мішенню. Цілком ймовірно, що нейтральні клітини

функціонально гетерогенні та сприяють іншим відомим функціям РВДМ, таким як термогенез (Morrison & Nakamura, 2019).

Функціональні класи клітин OFF/ON/NEUTRAL, визначені за допомогою комбінації електрофізіології, поведінки та фармакології *in vivo*, досі не були успішно зіставлені з молекулярними типами клітин, що визначаються вмістом нейромедіаторів, наприклад, ГАМК або глутамату. Дійсно, жоден з цих класів не має однорідної молекулярної сигнатури.

Інший підхід до визначення молекулярних класів полягає у використанні різних фармакологічних реакцій з використанням різних функціональних класів, що пов'язано з їхніми різними типами рецепторів. Мю-опіоїдний рецептор (MOR) експресується лише на ON-клітинах, і цей клас клітин є єдиним, який експресує MOR; крім того, всі ON-клітини реагують на агоністи мю-опіоїдів (Heinricher & Ingram, 2008).

У більш широкому сенсі, ці аналізи функцій ростро-вентромедіального довгастого мозку виявляють деякі потенційні пастки, пов'язані з інтерпретацією поведінкових експериментів, заснованих на кандидатних молекулярних маркерах. По-перше, коли маніпулюють популяцією клітин, що експресують певний маркер, можливо, що лише підмножина цієї популяції відповідає за будь-який вимірюваний поведінковий ефект. Без незалежної демонстрації того, що нейрони, що експресують маркер, є функціонально однорідними, можна лише зробити висновок, що якась невідома підмножина цього «типу» достатня для викликання поведінки. Дійсно, ця експериментальна парадигма не виключає можливості того, що деяка підмножина нейронів, що експресують відповідний маркер, не має ефекту, має різні ефекти або навіть протилежні ефекти, оскільки інші результати можуть бути перекриті та не проявлятися в поведінці. Ще одне занепокоєння полягає в тому, що не можна виключити роль в інших моделях поведінки або фізіологічних параметрах, які не були повністю досліджені в експериментальній парадигмі. Нарешті, слід враховувати можливість того, що додаткові популяції клітин, визначені різними маркерами, що не перетинаються, тим не менш, також можуть мати такий самий чистий поведінковий ефект.

1.3.2 Периакведуктальна сіра речовина (ПАСР)

Периакведуктальна сіра речовина розташована у середньому мозку. У дослідженні на щурах було виявлено, що вона є основною структурою, що бере участь у захисній та емоційній поведінці. Відповідно до функціональних характеристик та анатомічного розташування, ПАСР можна розділити на чотири зони: дорзомедіальна ПАСР, дорзолатеральна ПАСР, латеральна ПАСР та вентролатеральна ПАСР. Остання проасоційована з пасивною захисною поведінкою, глибокою аналгезією, опосередкованою опіоїдами, та регуляцією сну (Zhang et al., 2024).

Отримуючи сигнали про контекст поведінки від ділянок переднього мозку ПАСР модулює обробку висхідних та низхідних больових сигналів. Це відбувається через взаємодію з ростральним вентромедіальним довгастим мозку для контролю больових сигналів на рівні спинного мозку (Chung et al., 2020; Kim et al., 2024). Шляхи ПАСР – РВДМ проектується до нейронів, що передають біль, у дорзальному розі спинного мозку та хвостовому ядрі трійчастого нерва, забезпечуючи двонаправлений контроль ноцицепції (Kim et al., 2024). Це дозволяє ПАСР як полегшувати, так і пригнічувати больові сигнали, на що впливають різні поведінкові, емоційні та патологічні чинники (Benarroch, 2012).

Історично дослідження ПАСР починалися зі спроб зрозуміти її роль у формуванні реакцій на біль. Ранні дослідження в основному зосереджувалися на участі ПАСР у висхідному шляху болю. Було показано, що стимуляція області ПАСР може викликати відчуття болю, вібрації, руху очей та страху. (Nashold et al., 1969).

З 1960-х років визнано роль ПАСР в аналгезії, оскільки було виявлено, що електрична стимуляція ПАСР викликає глибоку аналгезію у самців щурів (Reynolds, 1969). Короткочасні больові подразнення шкіри активують латеральну та дорзальну ПАСР, викликаючи не тільки збудження симпатичної нервової системи, але й тимчасову аналгезію, неопосередковану опіоїдами (Keay & Bandler, 2001; Lumb, 2004). І навпаки, глибокий соматичний біль, вісцеральний

біль або повторюваний поверхневий біль активують вентролатеральну ПАСР, що призводить до тривалої опіюдно-залежної аналгезії, пов'язаної з судинним гальмуванням та нерухомою поведінкою (Bandler et al., 2000). ПАСР та його низхідний ланцюг демонструють статевий диморфізм, що призводить до різних реакцій на біль та аналгезію у самців та самок. Наприклад, активація дофамінергічних нейронів у вентролатеральній ПАСР /дорзальному шві сприяє антиноцицепції у самців мишей, але індукує локомоцію у самок мишей (Yu et al., 2021). У самок щурів, незважаючи на більші зв'язки ПАСР з РВДМ, морфін та біль викликають меншу активацію проєктуючих нейронів ПАСР – РВДМ порівняно з самцями щурів, що призводить до меншого зменшення болю після мікроін'єкції морфіну в ПАСР (Linnman et al., 2012; Loyd et al., 2008). Більше того, стійкий запальний біль підвищує експресію канабіноїдного рецептора 1 у ПАСР, сприяючи статево-специфічним відмінностям у модуляції болю, причому самці демонструють більше посилення активації G-білка, індукованої болем, ніж самки (Wilson-Poe et al., 2021). Ці результати відображають складну природу модуляції болю, опосередкованої ПАСР у різних статей.

Різні типи нейромедіаторів у ПАСР, включаючи глутамат, γ -аміномасляну кислоту (ГАМК), опіюїди, канабіноїди, дофамін та серотонін, беруть участь у підтримванні балансу між низхідним посиленням та низхідним гальмуванням ноцицепції. Глутамат або іонотропні агоністи глутаматних рецепторів, мікроін'єктовані в вентролатеральну ПАСР, підвищують сенсорні пороги, тоді як глутаматергічні антагоністи викликають гіпералгезію (Nguyen et al., 2023; Samineni et al., 2017). Навпаки, ін'єкція агоністів ГАМК у вентролатеральну ПАСР викликає гіпералгезію, тоді як ін'єкція його антагоністів викликає антиноцицептивні ефекти (Nguyen et al., 2023; Samineni et al., 2017). Більше того, дослідники виявили вісім підтипів глутаматних метаботропних рецепторів (mGluR1–8) у ПАСР, з яких mGluR1 та mGluR5 викликають гіпералгезію, а mGluR2–4 та mGluR6–8 індукують аналгезію (Peng et al., 2022). Що стосується опіюїдів, то ін'єкція агоністів μ -опіюїдних рецепторів у вентролатеральну ПАСР генерує антиноцицепцію, причому опіюїди переважно індукують аналгезію через

пресинаптичне гальмування ГАМКергічних та 5-НТергічних проєкцій до РВДМ (Vázquez-León et al., 2023). Канабіноїдний рецептор 1, який широко експресується як у дорзолатеральній ПАСР, так і у вентролатеральній ПАСР, активує низхідний ланцюг модуляції болю. Їх активація у вентролатеральній ПАСР індукує антиноцицепцію та антигіпералгезію, тоді як їх активація в дорзолатеральній ПАСР опосередковує опіїдно-незалежну аналгезію, індуковану стресом (Bouchet & Ingram, 2020). Крім того, дослідження показали, що активація 5-НТ рецепторів у ПАСР індукує аналгезію та сприяє антиноцицепції, викликаній страхом (Vázquez-León et al., 2023) (Vázquez-León et al., 2023). На додаток до раніше згаданих нейромедіаторів, інші речовини відіграють життєво важливу роль у модуляції болю в ПАСР. Наприклад, простагландини в ПАСР мають проноцицептивну дію (Drake et al., 2016), а субпопуляція парвоцелюлярних окситоцинових нейронів, що проєктуються до вентролатеральної ПАСР, була виявлена, що опосередковує аналгезію через низхідну систему модуляції болю, контрольовану ПАСР (Iwasaki et al., 2023). Крім того, мелатонін діє через рецептор мелатоніну 2 у вентролатеральній ПАСР, індукуючи аналгезію (Lopez-Canul et al., 2015).

1.3.3 Блакитна пляма

Ще однією областю мозку, яка бере активну участь у низхідній регуляції, є блакитна пляма. В поверхневому дорзальному рогу спинного мозку більшість терміналей, що походять від області блакитної плями є норадренергічними та встановлюють звичайні, не гломерулярні синапси (Holstege & Bongers, 1991). Однак не можна виключати наявність не-норадренергічного компонента так, як зараз існують докази того, що нейрони блакитної плями можуть вивільняти дофамін на ряду з норадреналіном у різних мішенях мозку, наприклад, у гіпокампі (Poe et al., 2020; Schwarz & Luo, 2015).

Загальна схема структур та шляхів, які беруть участь в обробці ноцицептивної інформації на шляху до вищих мозкових центрів наведена на рисунку 1.3.

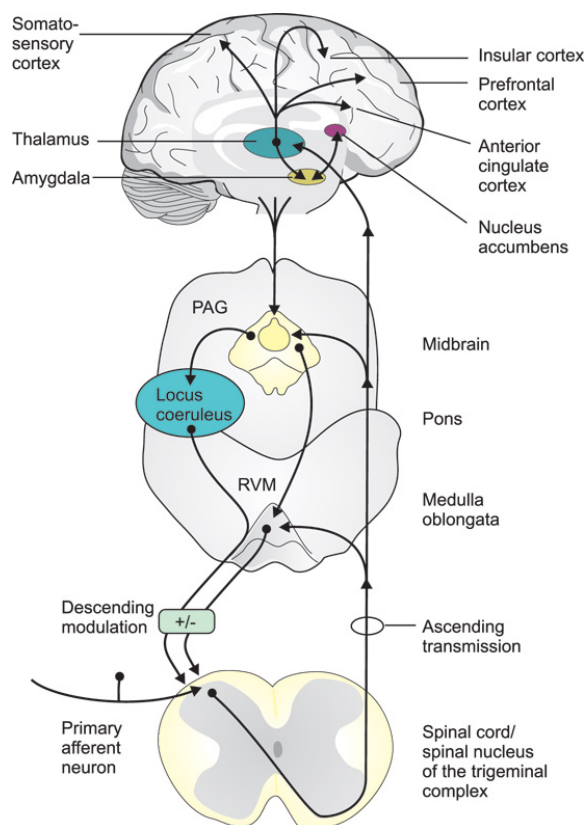


Рис.1.3. Висхідні та низхідні шляхи регуляції болю (Brodin et al., 2016).

1.4 Нейрохімія низхідної регуляції

Норадренегрична низхідна регуляція починається з блакитної плями, у нейронах якої синтезується НА. Після синтезу НА упаковується у везикули через VMAT2 і вивільняється в дорзальний ріг спинного мозку внаслідок надходження потенціалу дії. При цьому α_2 -адренорецептори на нейронах блакитної плями інгібують надлишкову вогнищеву секрецію НА. Вилілення НА у області пластинок I-V призводить до пресинаптичного гальмування та постсинаптичної гіперполяризації (Pertovaara, 2006). При пресинаптичному гальмуванні активуються α_2A -адренорецептори, що локалізовані на центральних терміналях субстанція Р-позитивних первинних аферентів (C- і А δ -волокон). Це інгібує N-тип кальцієвих каналів, відкриває GIRK-калієві канали та знижує внутрішньоклітинний cAMP, що призводить до зменшеного вивільнення глутамату й пептидів із цих терміналей – «закриття воріт» больових сигналів. Експерименти in vitro на зрізах спинного мозку показали зниження EPSP у

нейронів пластинки II при стимуляції дорзального корінця після додавання норадреналіну або α_2 -агоніста, без зміни відповідей на пряме вивільнення глутамату, що підтверджує пресинаптичний характер ефекту. Активація постсинаптичних α_2 - адренергічних рецепторів на вторинних сенсорних нейронах спинного мозку призводить до відкриття внутрішньо спрямованих K^+ каналів для гіперполяризації клітин, тим самим зменшуючи збудливість нейронів (Hayashida & Obata, 2019; Pertovaara, 2006)

Основними ядрами, які дають початок серотонінергічній проєкції до спинного мозку, є дорзальне ядро шва (nucleus raphe dorsalis) та велике ядро шва (nucleus raphe magnus), розташовані у середньому та довгастому мозку відповідно. Ці ядра належать до ростровентромедіальної області довгастого мозку (РВДМ), яка безпосередньо бере участь у низхідній регуляції болю та сенсорних сигналів, формуючи серотонінергічний тракт (raphespinal tract) (Millan, 2002; Willis Jr., 1985). Їхні аксони формують рафеспінальний тракт, що проєктується переважно в дорзальний ріг спинного мозку, особливо в пластинки I, II та V, де здійснюється безпосередня модуляція сенсорних і больових сигналів. Серотонін реалізує свої ефекти через різноманітні рецептори, серед яких основними є 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ та 5-HT₇. Активація 5-HT_{1A} та 5-HT_{1B} рецепторів переважно сприяє анальгезії, оскільки вони пригнічують пресинаптичне вивільнення глутамату і таким чином зменшують передачу больових сигналів. Натомість активація 5-HT_{2A/2C} та 5-HT₃ рецепторів зазвичай має протилежний ефект, посилюючи збудливість постсинаптичних нейронів та сприяючи гіпералгезії чи алодинії. Рецептор 5-HT₇, залежно від конкретного фізіологічного контексту, може проявляти як збуджуючий, так і гальмівний ефекти. Молекулярні механізми серотонінергічної регуляції охоплюють G-білок-залежні внутрішньоклітинні каскади, зміни рівнів вторинних месенджерів (сАМР, протеїнкінази) та активацію іонних каналів (Hao et al., 2023).

Низхідна опіоїдна модуляція починається в періакведуктальній сірій речовині середнього мозку, де β -ендорфін активує μ -, δ - та κ -опіоїдні рецептори. З періакведуктальної сірої речовини проєктуються збуджуючі волокна до

рострального вентромедіального мозку, в якій нейрони «off-cells» пригнічують ноцицептивну передачу, тоді як «on-cells» можуть її посилювати. Нейрони ростральної вентромедіальної медули, у свою чергу, відправляють низхідні проєкції до дорзального рогу спинного мозку (Oliva et al., 2022).

1.5 Загальний огляд оптогенетичних та хемогенетичних методик

Оптогенетика та хемогенетика – це інноваційні методи, що дозволяють вивчати функцію нейронів та інші фізіологічні процеси за допомогою точного контролю над нейронною активністю. Обидва підходи активно використовуються у нейробиології, забезпечуючи можливість маніпулювати нейронними мережами з високою специфічністю і швидкістю.

Каналродопсин (ChR) був вперше виявлений у одноклітинних зелених водоростей виду *Chlamydomonas reinhardtii*. У водорості цей білок знаходиться у світлочутливому вічку та дозволяє водоростевій клітині відчувати світло та реагувати на нього (Ernst et al., 2014; Nagel et al., 2002, 2003). Після стимуляції світлом виникає первинна деполяризація в плазматичній мембрані світлочутливого вічка, яка далі переходить на джгутикову мембрану, що в результаті призводить до змін у роботі джутика, які переорієнтовують водоростеву клітину у бік джерела світла та індують фототаксис чи фотофобні реакції (Ernst et al., 2014). Зелені водорості кодують дві форми ChR, ChR1 і ChR2, обидві вони беруть участь у реакціях, що опосередковуються світлом, але їхній обсяг і знання механізму дії були дуже обмеженими до їх клонування Нагелем та співавт. в ооцитах *Xenopus* та клітинах ссавців (Nagel et al., 2002, 2003).

Як ChR1, так і ChR2 використовуються в оптогенетичних методах; однак останньому приділяється значно більше уваги, оскільки гетерологічний ChR2 здатний зв'язуватися з ендегенним повністю транс-ретиналем та утворювати функціональний білок в системі ссавців (Lin et al., 2009). Крім того, ChR2 проявляє швидку кінетику фотоактивації (мілісекунди), демонструє здатність надійно виробляти потенціали дії від світлових імпульсів високої частоти (порядку 100 Гц) і утворює функціональні комплекси в більшості систем

хребетних без потреби у введенні екзогенних добавок (завдяки природній доступності повністю транс-ретиналю). Все вищеперелічене робить ChR2 зручним та дуже часто використовуваним оптогенетичним інструментом (Boyle et al., 2013; Mei & Zhang, 2012).

З хомогенетикою для активації або інгібування цільових нейронів, замість опсинів використовуються спеціально розроблені рецептори, що активуються виключно призначеними для них препаратами (designer receptor exclusively activated by designer drugs, DREADD). Збуджувальний DREADD hM3Dq - це модифікований мускариновий рецептор людини M3, який має низьку спорідненість до природного ліганду ацетилхоліну, але високу спорідненість до синтетичного ліганду клозапін-N-оксиду (CNO) (Armbruster et al., 2007). Коли цей G-білок зв'язаний рецептор активується при місцевому або системному введенні CNO, це викликає збудження у цільових нейронах (Alexander et al., 2009). Для гальмування нейронів використовується зв'язаний з Gi-білком hM4Di DREADD, що являє собою модифікований людський мускариновий рецептор M4. Так само, як і hM3Dq, він активується і здійснює сайленсинг цільових нейронів при введенні CNO (Urban & Roth, 2015). У мишей ефекти внутрішньоочеревинного введення CNO спостерігаються через 10–15 хв, максимум - через 45–50 хв і повільно повертаються до вихідного рівня приблизно через 9 год (Alexander et al., 2009). CNO розчиняється у водних розчинах, таких як звичайний фізіологічний розчин, і для мишей дослідники зазвичай використовують 0,1–3 мг /кг CNO, що вводиться внутрішньоочеревно (Roth, 2016), хоча також використовувались внутрішньочерепні мікроін'єкції (Vazey & Aston-Jones, 2014).

Нещодавно повідомлялося, що hM3Dq та hM4Di DREADD активуються клозапіном (метаболітом CNO, який перетинає гематоенцефалічний бар'єр), а не CNO (Gomez et al., 2017). Оскільки клозапін є антипсихотичним препаратом, який може спричиняти седацію у високих дозах, цей висновок наголосив на важливості використання низьких доз CNO для експериментів з хомогенетичними методами та проведення належних контрольних експериментів

шляхом введення CNO тваринам, які не експресують DREADDs hM3Dq та hM4Di (Roth, 2016).

У 2015 році було розроблено про новий DREADD на основі каппа-опіоїдних рецепторів (KORD), що дозволяє інгібувати нейрони сальвінорином В (SalB) (Vardy et al., 2015). Цей новий DREADD дозволив проводити двонаправлену хемотропіку, активуючи або інгібуючи однакові нейрони різними лігандами. Однак сальвінорин В є відносно нерозчинним у водному розчині, і тому для парентерального введення можуть знадобитися хімічні розчинники, такі як диметилсульфоксид (DMSO). Залежно від дизайну експерименту, можливо, доведеться включити додаткові засоби контролю, щоб перевірити, чи транспортний засіб (наприклад, DMSO) справляє якісь суттєві ефекти. Кінетика SalB також суттєво відрізняється від CNO, при цьому поведінкові ефекти проявляються незабаром після ін'єкції та тривають близько 1 год (Vardy et al., 2015). Хоча система KORD / сальвінорин В забезпечує унікальну перевагу двонаправленого хемотропічного контролю одних і тих же нейронів (коли використовується разом з hM3Dq / CNO), система hM4Di / CNO є більш зручною, коли бажане більш тривале нейронне гальмування. Інші варіанти DREADD включають модифіковані рецептори до β -арсестину, і GD DREADD, хоча вони використовуються рідше (Roth, 2016).

Таким чином, як оптогенетика, так і хемотропіка відкривають нові можливості для вивчення нейронних мереж та їх функціонування. Хоча оптогенетичні методи, зокрема використання ChR2, довели свою ефективність у швидкому та точному контролі нейронної активності, хемотропічні підходи, такі як DREADD-системи, дозволяють більш гнучко маніпулювати нейронами в тривалих експериментах. Кожен з цих методів має свої переваги та обмеження, але в поєднанні вони відкривають значний потенціал для глибшого розуміння механізмів мозкової діяльності і нейрофізіології в цілому.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Експериментальні тварини

Для експериментів використовували щурів лінії Вістар та мишей лінії FVB. Тварини утримувалися у віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в умовах стандартного догляду: мали вільний доступ до їжі та води, сталі параметри температури навколишнього середовища, природній світловий цикл і забезпечувалися стандартним комбікормом.

Протоколи досліджень відповідали Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 року), Гельсінській декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), а також іншим міжнародним та національним законодавчим актам, включаючи Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 рік), що було погоджено і підтверджено комітетом з біомедичної етики Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця Крім того, експерименти дотримувалися рекомендацій Міжнародної асоціації з вивчення болю (IASP) та Товариства нейронаук, що регламентують політику використання тварин і людей у дослідженнях нервової системи.

При дослідженні низхідної регуляції у пластинці I дорзального рогу спинного мозку використовували дорослих мишей (віком 3 місяці). В такому віці тваринам проводили операцію – стереотаксично вводили генетичний конструкт у зону РВДМ стовбуру мозку. Це призводило до експресії флуоресцентної мітки та/або світлочутливого йонного каналу в нейронах РДВМ та їх низхідних аксонах. Через 5-7 тижнів після операції у мишей виділяли препарат цілого спинного мозку з збереженими дорзальними корінцями для запису електрофізіологічних даних та/або мікроскопії.

Для дослідження низхідної регуляції у пластинці X спинного мозку, а також записів потенціалу дорзального корінця використовували лабораторних щурів (обох статей) лінії Вістар віком 11-12 постнатальних днів (P11-P12). Такий вік було обрано через те, що в цей період оболонки спинного мозку менш щільні,

що знижує ймовірність ушкодження при виділенні препарату. Доступ до десятої пластики потребує розділення препарату спинного мозку на дві половинки, що було б складно здійснити на тваринах старшого віку. Окрім того, відсутність густих сполучнотканинних оболонок покращує візуалізацію нейронів у подальших електрофізіологічних та морфологічних дослідженнях, а також сприяє швидшому проникненню прикладених речовин вглиб препарату.

2.2 Стереотаксична ін'єкція оптогенетичного конструкту

Для проведення хірургічних маніпуляцій попередньо було проведено підготовку інструментів шляхом їх автоклавування (ручка скальпеля, пружинні ножиці, вигнуті щипці тощо). Після стерилізації інструменти розміщували поруч із стереотаксичним апаратом разом із хірургічними шовними матеріалами (скобами) для забезпечення швидкого доступу під час втручання. Мікроін'єкційні піпетки виготовляли пулером зі скляних капілярів діаметром 1 мм. Кінцевий діаметр піпеток становив 10-50 мкм, а довжина конуса - 8-10 мм від його початку. Перед виконанням ін'єкцій флакон із вірусною конструкцією AAV9-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP повільно розморожували, підтримуючи температуру розчину в межах 4-8 °C протягом усієї процедури.

Для ін'єкції використовували мікрошприц Hamilton об'ємом 10 мкл, який разом із мікропіпеткою наповнювали мінеральною олією. Після цього мікропіпетку вставляли у компресійний фітінг діаметром 1 мм і герметично з'єднували зі шприцом, уникаючи потрапляння бульбашок повітря. Шприц фіксували у ручному або автоматичному інжекторі, який монтували на правому кронштейні стереотаксичного апарату.

Анестезію експериментальних тварин здійснювали за допомогою одного з двох методів - ін'єкційного (кетамін/ксилазин) або інгаляційного (ізофлуран). У першому випадку готували суміш кетаміну (100 мг/кг) та ксилазину (12 мг/кг) відповідно до маси тіла тварини. Приготований розчин набирали в інсуліновий шприц із голкою 29-30 G та вводили внутрішньочеревно, після чого тварину поміщали в анестезіологічну камеру. Ефект анестезії настав протягом 3-4

хвилин. У разі використання ізофлурану тварину розміщували в камері, забезпечували подачу кисню під тиском 700 мм рт. ст. і концентрацію ізофлурану 4%, що призводило до анестезії протягом 1–2 хвилин.

Після досягнення хірургічного рівня анестезії (відсутність відсмикувального рефлексу кінцівки при ущипуванні задньої лапи) тварину переносили у стереотаксичний апарат. Фіксацію виконували таким чином: голову тварини розміщували в центральному затискачі, слідкуючи, щоб передні зуби надійно входили в паз біля його основи, після чого обережно затягували затискач.

Вушні фіксатори по черзі вводили в слухові проходи з обох боків, вирівнюючи череп відносно центрального затискача та забезпечуючи симетричне положення голови (рис. 2.1). Після цього фіксатори затягували, відміряючи однакову відстань від центру черепа з обох боків. У разі використання ізофлуранової анестезії після закріплення тварини на стереотаксичному апараті концентрацію ізофлурану знижували до 2–2,5%.



Рис. 2.1. Встановлення миші на стереотаксичну рамку. Фотографії ілюструють правильне положення голови в стереотаксичному апараті.

Під час усієї процедури температуру тіла миші підтримували на рівні 37 °С за допомогою грілки, розміщеної під тілом тварини. Перед проведенням розрізу хутро на голові зістригали, шкіру обробляли антисептичним розчином (бетадином), а на очі наносили захисну офтальмологічну мазь для запобігання висиханню рогівки. Далі вздовж серединної лінії голови, від ділянки трохи позаду очей до потиличної зони, виконували ретрокаудальний розріз шкіри за допомогою скальпеля, після чого обережно відтягували шкіру для візуалізації орієнтирів – точок лямбда та брегма.

Після фіксації тварини у стереотаксичному апараті здійснювали вирівнювання черепа з метою забезпечення точної просторової орієнтації. Для цього до лівого плеча стереотаксичної рами приєднували голку 30 G, кінчик якої послідовно вирівнювали з точкою брегма, встановлюючи координату по осі Z, а потім із трьома додатковими опорними точками: 2 мм латерально ліворуч від брегми, 2 мм латерально праворуч від брегми та точкою лямбда (рис. 2.2) . Після отримання показників для всіх позицій перевіряли, щоб значення осі Z збігалися з координатою брегми; у разі розбіжності положення черепа коригували до досягнення рівної орієнтації.

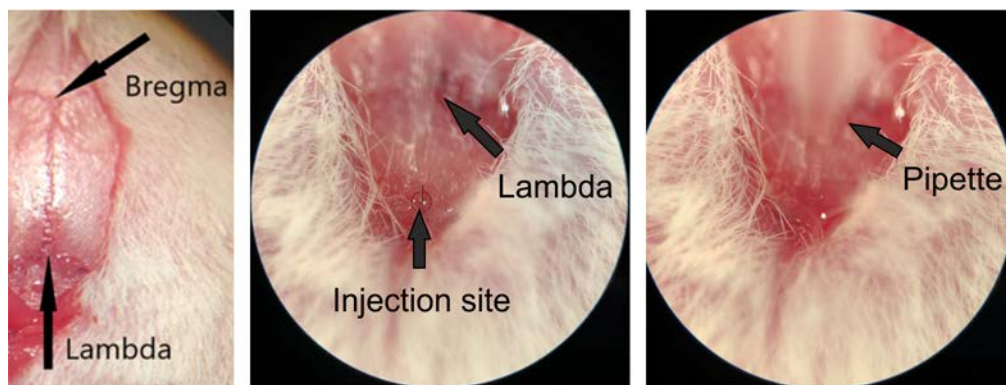


Рис. 2.2. Визначення місця ін'єкції. Фотографії, ілюструють місце ін'єкції відносно точок брегма та лямбда.

Після вирівнювання черепа голку повторно позиціонували в точці брегма, після чого переміщували її на 5,8 мм каудально вздовж середньої лінії та позначали місце свердління легким натисканням кінчика голки у серединний шов черепа. Отвір створювали за допомогою мікродриля з використанням свердла діаметром 0,6 мм; за відсутності мікродриля застосовували голку 29 G, яку обертали вручну до зникнення опору кістки.

Для введення вірусного конструкту на поверхні черепа розміщували невеликий шматочок парафільму та за допомогою каліброваної мірної піпетки наносили 50–100 нл вірусного розчину в центр парафільму. Мікроін'єкційну піпетку опускали в краплю і повільно втягували увесь об'єм вірусного розчину в її внутрішній канал, після чого парафільм видаляли. Кінчик мікропіпетки

вирівнювали із центром просвердленого отвору, поступово опускаючи її до рівня отвору, а потім – вентрально на глибину 5,8 мм від поверхні черепа протягом однієї хвилини до досягнення РВДМ. Після досягнення цільової глибини піпетку піднімали на 0,1–0,2 мм для зменшення тиску на тканини.

Введення вірусної конструкції здійснювали зі швидкістю 1 нл/с. Після завершення ін'єкції мікропіпетку залишали у тканині на 5–10 хвилин для забезпечення дифузії та запобігання зворотному витіканню розчину, після чого її повільно витягували протягом приблизно однієї хвилини. Отвір у черепі герметизували невеликою кількістю акрилового клею або стоматологічного цементу, після чого розріз шкіри зашивали або з'єднували скобами. У випадку, коли тварини утримувалися групами, поверх шва додатково наносили тканинний клей для запобігання його пошкодженню. Після цього мишу знімали зі стереотаксичного апарату, розміщували на поверхні із підігрівом до повного відновлення після наркозу, а потім переносили у клітку.

2.3 Виготовлення зрізів та конфокальна мікроскопія

Флуоресцентні реєстрації були виконані на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Японія) Центру колективного користування «Прилади і обладнання клітинної біофізики та фізіології». Управління мікроскопом здійснювалося через пакет FV10-ASW, наданий виробником обладнання.

Для отримання зображень спинного мозку використовували товсті препарати. Попередньо фіксовані 4% розчином формальдегіду зразки 3-4 рази промивали у фосфатному буферному розчині рН 7.4 (137 мМ NaCl, 1.3 мМ KCl, 0,88 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ Na_2HPO_4). Промиті зразки спинного мозку приклеювали до дна пластикової камери ціаноакрилатним клеєм, розташовуючи так, щоб поверхня дорзального рогу знаходилася вгорі. Щоб зробити зображення коронарного вигляду за допомогою леза робили зріз спинного мозку товщиною в кілька міліметрів, і також приклеювали до дна камери. Після того камеру з приклеєними зразками заповнювали фосфатним буферним розчином. Такі зразки

могли зберігатись у щільно закритій камері до двох тижнів при температурі 4°C. Загальний вигляд зразків було отримано об'єктивом малого збільшення (4x 0,13, Olympus, Японія). Для великого збільшення використовували високоапертурний водо-занурювальний об'єктив (60 x 1.00, Olympus, Японія).

Для валідації місця ін'єкції в головному мозку, після декапітації його обережно виділяли та поміщали у 4% розчин формальдегіду. Після фіксації зразків їх 3-4 рази промивали у фосфатному буферному розчині. Далі за допомогою вібротома виготовляли серію зрізів товщиною 300 мкм. За допомогою пензля зрізи по одному обережно поміщали в планшет з лунками і розпрямляли вздовж дна. Лунки заповнювали фосфатним буферним розчином, і в такому вигляді переносили на мікроскоп. Аналогічно до зразків спинного мозку зрізи зберігали у щільно закритому планшеті при температурі 4°C. Для тривалішого збереження частину зрізів було відібрано для фіксації на предметному скельці та виготовленні постійних мікропрепаратів.

2.4 Виділення препарату цілого спинного мозку миші

Підготовку спинного мозку проводили не раніше, ніж через п'ять тижнів після стереотаксичної ін'єкції, що забезпечувало стабільну експресію каналродопсину-2. Перед початком процедури переконувалися, що сахарозний розчин для виділення (що містив (у mM): 200 сахарози, 2 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 0,5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 11 глюкози, 5 аскорбату натрію, 3 пірувату натрію) (pH 7,3 - 7,4) має кімнатну температуру (20-23 °C) та барботувався 95% O₂ та 5% CO₂ протягом не менше ніж 15 хвилин. Усі інструменти для препарування розміщували біля стереомікроскопа, вмикали освітлення та готували робочу поверхню.

Для виділення спинного мозку тварину вводили у стан глибокої анестезії за допомогою ізофлурану, після чого перевіряли відсутність відсмикувального рефлексу кінцівки. Після здійснювали декапітацію великими ножицями та

давали стекти крові протягом приблизно 10 секунд. Декапітовану тварину розміщували на препарувальній дошці, фіксуючи кінцівки голками 25 G.

Далі виконували видалення хребетного стовпа разом із ребрами (рис. 2.3). Спочатку знімали шкіру зі спини для оголення хребта, після чого ножицями здійснювали розрізи вздовж обох боків тулуба та біля хвоста. Потім ножиці вводили на 3-5 мм углиб на рівні стегон і, тримаючи їх вертикально, розтинали хребет уздовж осі. Піднявши розрізаний кінець хребта щипцями, продовжували розсічення навколишніх тканин у ростральному напрямку, доки не відкривалися ребра, які згодом розрізали з обох боків. Залишки внутрішніх органів видаляли, зберігаючи ребра достатньої довжини для подальшої фіксації препарату. Після цього хребетний стовп відокремлювали на рівні нижніх шийних або верхніх грудних сегментів.

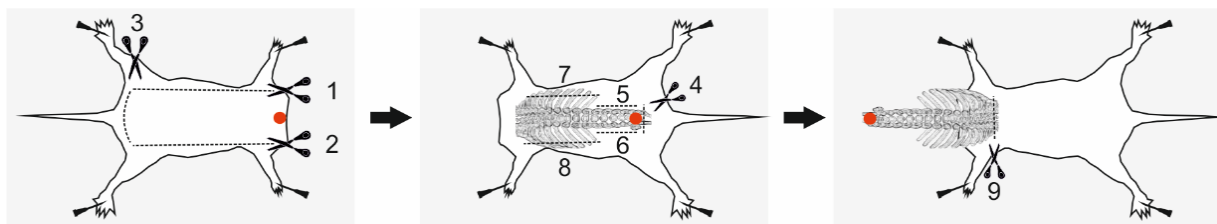


Рис. 2.3. Виділення хребетного стовпа. Схематичне зображення процесу. Червоними крапками позначені точки, які захоплювали щипцями; пунктирні лінії представляють шляхи розрізів. Числа позначають рекомендовану послідовність розрізів для правші. Рисунок адаптований з (Krotov et al., 2024)

Виділену частину переносили до препарувальної камери, дно якої вкрите біосумісним силіконом та заповненої розчином сахарози. Хребет фіксували за допомогою голок 30 G, розміщуючи його вентральною стороною вгору та орієнтуючи рострально до експериментатора.

Після фіксації видаленого хребетного стовпа у чаші для препарування стереомікроскоп налаштовували на фокусування на зразку при збільшенні 8-10×, що забезпечувало оптимальну візуалізацію анатомічних структур під час подальшого розтину. За допомогою грубих щипців захоплювали ребра біля

рострального кінця хребта та обережно піднімали їх, створюючи невеликий отвір для доступу до спинномозкового каналу. Одне лезо великих пружинних ножиць вводили в утворений отвір, спрямовуючи його вздовж хребців, після чого здійснювали акуратний розріз (рис. 2.4). Після завершення розсічення ножиці зімкнутими лезами обережно відводились у бік для мінімізації пошкодження спинного мозку. Процедуру повторювали по черзі з протилежних боків хребців до повного розкриття спинномозкового каналу.

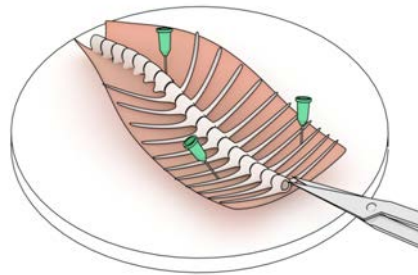


Рис. 2.4. Схема кріплення препарату до чашки для препарування для відкриття спинномозкового каналу. Рисунок адаптований з (Krotov et al., 2024).

Після розкриття спинномозкового каналу (рис 2.5) за допомогою грубих щипців захоплювали розрізану вентральну частину хребта біля рострального кінця та обережно піднімали її вгору і каудально, що дозволяло створити простір між спинним мозком і хребцями. У цей простір вводили лезо ножиць, продовжуючи розрізання хребців уздовж каналу, тримаючи ножиці паралельно до поверхні препарувальної чашки. Положення щипців коригували в міру просування, особливо обережно працюючи в ділянці поперекового розширення. При необхідності обережно розрізали залишки твердої мозкової оболонки, прикріпленої до вентральної частини хребців. Після відкриття ділянки кінського хвоста (пучка нервів і корінців, що відходять від дистального кінця спинного мозку) вентральну частину хребта повністю відсікали та видаляли з препарувальної камери. Додатково розрізали мозкові оболонки вздовж середньої лінії за допомогою малих пружинних ножиць.

Після цього спинний мозок відділяли від хребетного стовпа. Спочатку розсікали ділянку кінського хвоста, а потім, орієнтуючись на бічні поверхні хребців, поступово перерізали грудні, дорзальні та вентральні корінці з обох боків. Вигнутими щипцями спинний мозок обережно піднімали вгору і вбік, розтинаючи тверду мозкову оболонку, що залишалася прикріпленою до дорзальної поверхні хребців. Під час цього етапу препарат утримували за ростральний кінець або за тверду мозкову оболонку чи грудні корінці, уникаючи прямого натягу тканини.

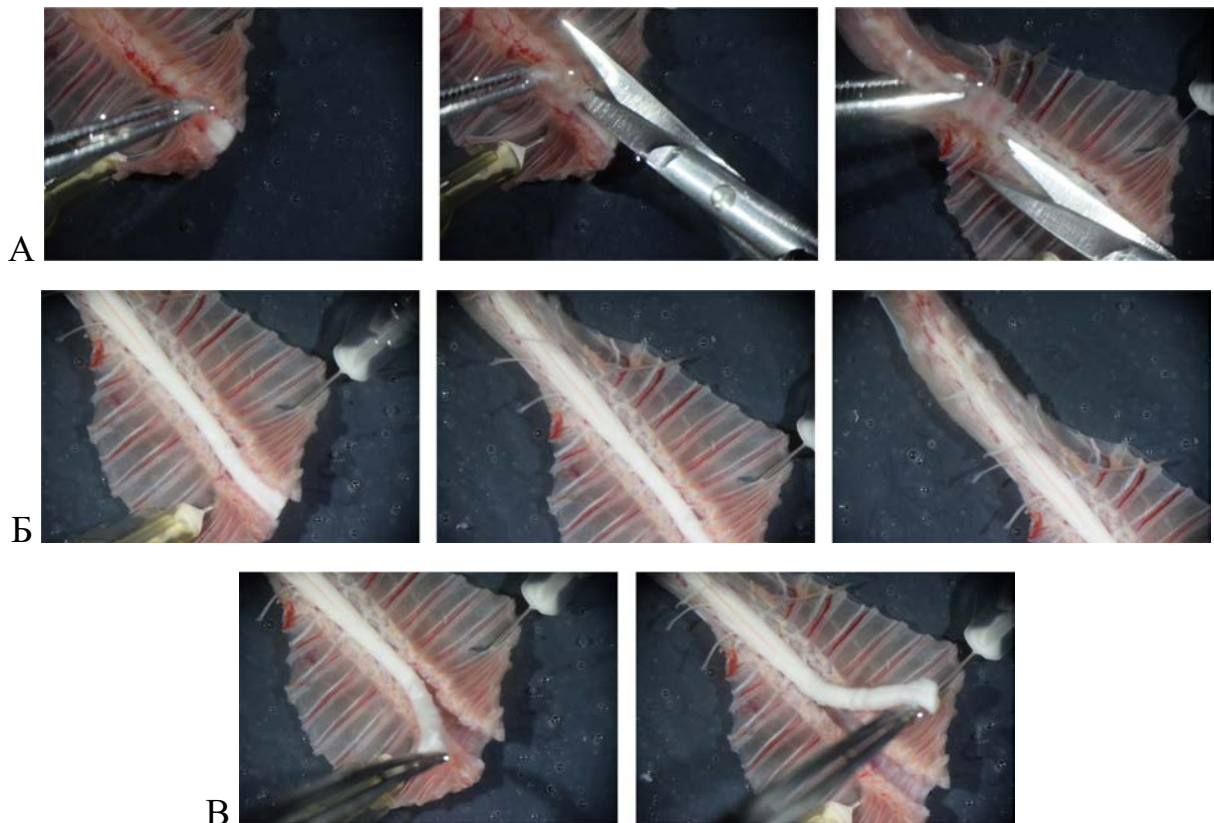


Рис.2.5. Розкриття спинномозкового каналу (А), відкритий спинний мозок (Б), виділення спинного мозку (В)

Важливо було залишати спинний мозок зануреним у розчин, не допускаючи його висихання або механічного розтягування. Далі розсікали тильні корінці поперекового відділу, зберігаючи їхню повну довжину, і видаляли будь-які залишки тканин, що з'єднували спинний мозок з внутрішньою частиною хребта. Після повного відокремлення спинний мозок вилучали, а хребетний

стовп із ребрами утилізували. Усі ці маніпуляції виконували протягом 7–10 хвилин після декапітації, оскільки збільшення часу маніпуляцій знижувало кількість нейронів, придатних для подальших електрофізіологічних записів.

Отриманий спинний мозок орієнтували вентральною стороною вниз і за допомогою малих пружинних ножиць робили розріз спинномозкових оболонок вздовж середньої лінії. Якщо роstrальна частина виявлялася механічно пошкодженою, її обережно відрізали. Препарат фіксували у препарувальній чашці голками 30 G, закріплюючи його на роstrальному та каудальному кінцях для стабільності під час подальших маніпуляцій. Потім за допомогою вигнутих або тонких щипців видаляли залишки твердої мозкової оболонки, що вкривала дорзальну поверхню спинного мозку та дорзальні корінці. Розпочинали з роstrального кінця, поступово відшаровуючи тверду мозкову оболонку в каудальному напрямку, уникаючи пошкодження нижніх поперекових дорзальних корінців. За необхідності використовували малі пружинні ножиці для виконання дрібних розрізів навколо корінців, видаляючи оболонку окремими ділянками. Після завершення цього етапу всі дорзальні корінці мали бути чітко розділені.

На наступному етапі проводили видалення спинномозкових оболонок - павутинної та м'якої - з тієї сторони спинного мозку, яка призначалася для експериментальної роботи (рис. 2.6.). Спочатку за допомогою тонких пінцетів обережно захоплювали роstrальну частину спинного мозку та відтягували оболонки. Потім м'яку та павутинну оболонки поступово відшаровували у каудальному напрямку до рівня верхніх поперекових сегментів, уникаючи пошкодження нервової тканини.

Під час роботи орієнтувалися на судинний малюнок - оскільки м'яка оболонка містить виражену мережу кровоносних судин. Про її успішне видалення можна було казати при відділенні цих судин від поверхні спинного мозку. Як правило, при знятті м'якої оболонки у ділянці грудних сегментів від неї відокремлювалися також дорзальні та вентральні корінці.

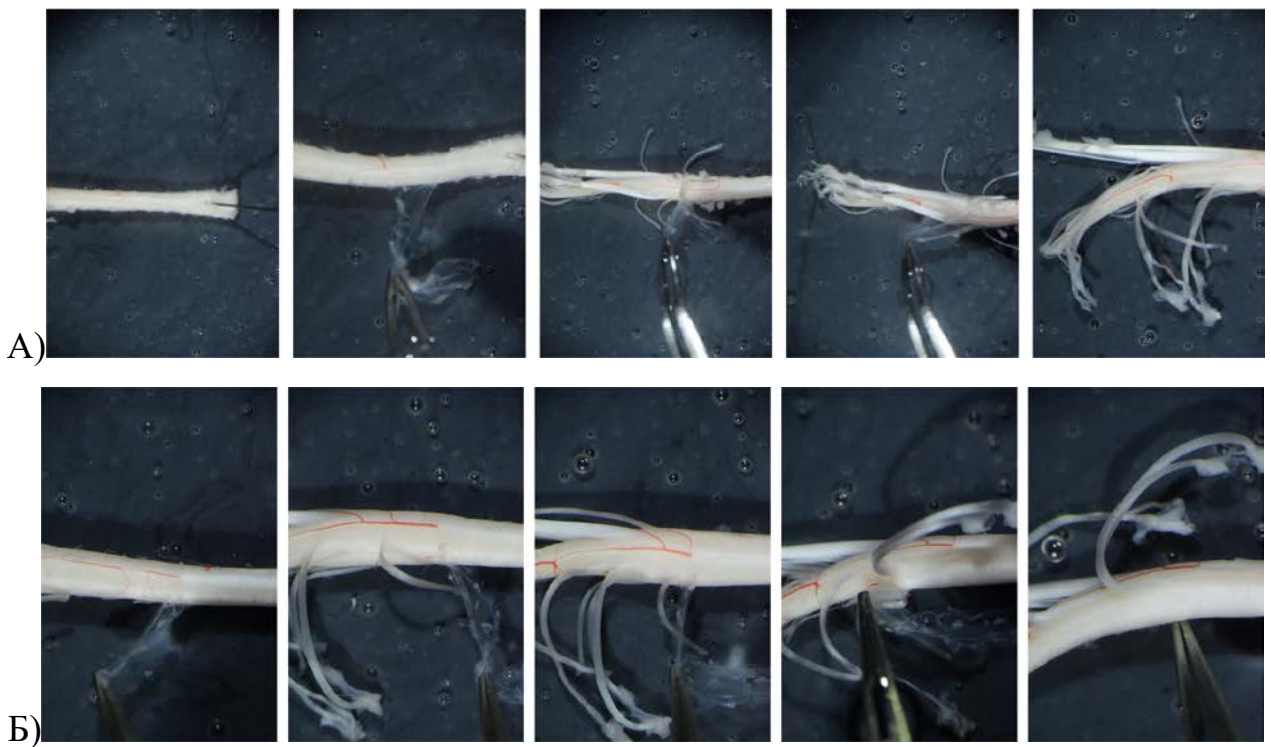


Рис. 2.6. Різні етапи видалення мозкових оболонок. А) видалення твердої спинномозкової оболонки, Б) видалення м'якої спинномозкової оболонки.

Важливим етапом було проведення надрізу мозкових оболонок уздовж межі між дорзальним рогом сірої речовини та дорзальною білою речовиною за допомогою малих пружинних ножиць. Це дозволяло зберегти потрібні дорзальні корінці неушкодженими. Після цього оболонки, що проходили під дорзальними корінцями та вкривали дорзальний ріг, акуратно видаляли, забезпечуючи повний доступ до досліджуваної ділянки.

Особливо важливо було повністю усунути оболонки, що покривали дорзальний ріг у зоні під дорзальними корінцями сегментів L4-L5. Водночас оболонки, розташовані над дорзальною білою речовиною, залишали недоторканими, щоб уникнути пошкодження цих дорзальних корінців.

Після видалення мозкових оболонок з ділянки спинного мозку, призначеної для експерименту, зберігали непошкодженими дорзальні корінці L4 та L5, а всі інші дорзальні й вентральні корінці, не передбачені для подальшої роботи, обережно розсікали. Для визначення L4-L5 корінців орієнтувалися на розташування L3 дорзального корінця, який відповідає найширшій частині поперекового потовщення. L4 розташований каудальніше від L3, тоді як L5 –

каудальніше від L4, у ділянці конічного звуження спинного мозку. Зазвичай зберігали два дорзальні корінці навіть у випадках, коли для експерименту потрібен лише один, щоб мати резервний варіант у разі випадкового забруднення клеєм під час фіксації препарату.

Для подальших електрофізіологічних досліджень спинний мозок прикріплювали до металевої пластини (рис. 2.7). Пластину розташовували на основі стереомікроскопа поруч із препарувальною чашкою. За допомогою голки 30 G рівномірно розподіляли тонкий шар ціаноакрилатного клею по половині поверхні пластини, залишаючи невелику кількість клею на кінчику голки для подальшого використання. Далі, використовуючи дві вигнуті пінцети, обережно піднімали спинний мозок за ростральний і каудальний кінці, переносили його з розчину на не вкриту клеєм частину пластини, після чого легенько розтягували препарат і опускали його на ділянку з клеєм. Важливо уникати контакту клею з дорзальними корінцями.

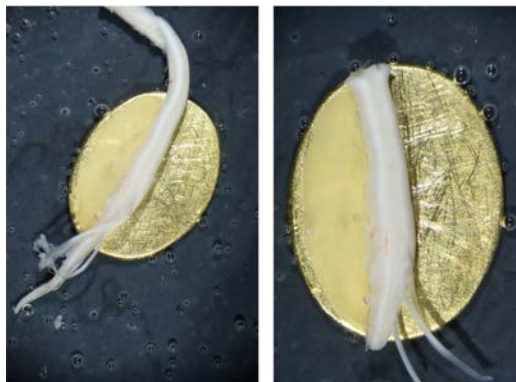


Рис. 2.7. Препарат спинного мозку *ex-vivo*, приклеєний до металевої пластини. Ліворуч: спинний мозок після кріплення до металевої пластини. Праворуч: *ex-vivo* препарат спинного мозку, повністю підготовлений та готовий до експериментів

Спинний мозок розміщували під кутом приблизно 45°, щоб дорзальний ріг знаходився зверху, оскільки така орієнтація забезпечує найкращу видимість клітин під косим освітленням. Занадто пласке або бокове положення істотно ускладнює подальші електрофізіологічні реєстрації. За допомогою голки 30 G

додатково наносили невелику кількість клею на вентральну поверхню поперекового сегмента для кращої фіксації, після чого металеву пластину з прикріпленим спинним мозком негайно повертали у розчин сахарози. Усі маніпуляції з препаратом поза розчином тривали не більше 20–30 секунд, оскільки тривале перебування препарату на повітрі може призвести до пошкодження нейронів поверхневого дорзального рогу. У випадку, якщо один або обидва дорзальні корінці випадково торкнулися клею, їх обережно від'єднували за допомогою голки 30 G, щоб вони вільно плавали у розчині.

Після фіксації спинного мозку на металевій пластині обрізали його ростральний і каудальний кінці, які виступали за межі пластини або не були надійно приклеєні. Дорзальні корінці, не призначені для експерименту, акуратно відділяли: кожен корінець злегка натягували пінцетом і розрізали якомога ближче до місця його виходу зі спинного мозку. Хоча використання двох дорзальних корінців може забезпечити більшу кількість даних від кожного нейрона, у більшості випадків доцільніше залишати лише один - це полегшує доступ до сегмента спинного мозку, розташованого ростральніше.

Якщо до дорзальних корінців були прикріплені спинномозкові ганглії, їх видаляли. Потім дорзальні корінці обрізали до потрібної довжини, використовуючи гострі ножиці, щоб уникнути їх пошкодження. За можливості намагалися зберегти максимальну довжину корінців, оскільки це полегшує розрізнення компонентів аферентного сигналу, опосередкованих А- і С-волокнами. Готовий *ex-vivo* препарат цілого спинного мозку показано на рисунку 2.7.

Під час отримання та наступних електрофізіологічних досліджень цілісних препаратів спинного мозку мишей і щурів в умовах *in vitro* часто виникає ішемія - стан недостатнього кровопостачання, що призводить до дефіциту кисню та глюкози в тканинах. Така ішемія активує каскад патологічних процесів, серед яких ключову роль відіграє ексайтотоксичність – надмірне збудження нейронів, спричинене накопиченням глутамату в позаклітинному середовищі (Chojnowski et al., 2021). Глутамат, як головний збуджувальний

нейромедіатор, у високих концентраціях активує NMDA- та AMPA-рецептори, що веде до надмірного входження кальцію в клітини, порушення іонного гомеостазу та запуску апоптозу або некрозу (Brassai et al., 2015). У контексті наших досліджень це створювало виклик для збереження життєздатності нейронів і достовірності експериментальних результатів, тому для нас важливо було працювати з найменшущкодженими частинами спинного мозку, контролювати умови перфузії та використовувати нейропротекторні стратегії для запобігання ексайтотоксичності. По перше, при виділенні препарату, він використовувався в досліді, тільки якщо час від зупинки серця тварини до розміщення виділеного спинного мозку у розчині для його обробки не перевищував 4 хвилини, що суттєво знижувало тривалість ішемії. По друге, розчин для виділення і розчин Кребса під час проведення електрофізіологічних експериментів інтенсивно насичували газовою сумішшю 95% O₂ і 5% CO₂ протягом щонайменше 5 хвилин і підтримували безперервне барботування протягом усього експерименту. Достатня концентрація глюкози у 10 mM також використовувалася у всіх розчинах. Це забезпечувало високий парціальний тиск O₂ у зовнішньоклітинному розчині та нормальну концентрацію глюкози в ньому, запобігало дефіциту кисню та глюкози в тканинах та запобігало розвитку ішемії та ексайтотоксичності. O₂ міг швидко втрачатися з відкритої експериментальної камери (об'єм близько 1 мл). Тому ми постійно підтримували високий рівень перфузії зовнішньоклітинного розчину для заміни його на новий з високим рівнем O₂, що також запобігало розвитку ішемії. Нами також було показано, що додавання 5 mM аскорбату натрію, 3 mM пірувату натрію (нейропротекторів, що можуть сприяти зниженню ексайтотоксичності, особливо в умовах ішемії або оксидативного стресу, завдяки своїм антиоксидантним властивостям (Wilson et al., 2007)) до розчину для виділення препарату призводило до суттєвого покращення стану препарату цілісного спинного мозку мишей протягом подальших електрофізіологічних досліджень.

Таким чином, ми вважаємо, що вжиті нами заходи, перераховані вище, забезпечили уникнення виникнення ішемії та ексайтотоксичності в препаратах

спинного мозку щурів та мишей, особливо в їх поверхневих шарах (20-150 мікрометрів) та забезпечили нейропротекцію нервової тканини та поверхневих нейронів першої та десятої пластинок спинного мозку, які і були предметом наших досліджень.

2.5 Виділення препарату цілої половини спинного мозку щура з збереженням ЗБК

Використовували щурів віком 11-13 днів. Тварин глибоко анестезували поміщаючи в камеру з газовою сумішшю з ізофлураном у концентрації 3%. Перед декапітацією обов'язково перевіряли відсутність педального рефлексу, затиснувши задню лапу тварини, після чого швидко декапітували тварину великими ножицями та зливали кров протягом 10 секунд.

Далі швидко виділяли хребетний стовп з прикріпленими до нього ребрами. Для цього обезголовленого щура клали на препарувальний столик дорзальною стороною вгору і закріплювали лапи голками 25G. Зі спини тварини знімали шкіру, щоб оголити хребетний стовп та ребра. При цьому грубим пінцетом відхиляли шкіру вгору і вставляли під неї одну гілку маленьких ножиць. Далі розрізали шкіру вздовж обох боків, тримаючи ножиці паралельно до планшета для препарування. Нарешті, розрізали шкіру біля хвоста. Після того, як шкіру з дорзальної сторони знято, тримаючи ножиці вертикально з відкритими браншами вниз, їх вставляли в спину щура до глибини 3–5 мм на рівні стегон, так, щоб бранші були навколо хребта, та розрізали хребет.

Розрізану частину хребта брали грубими щипцями, відводили її вгору та розрізали тканини рострально вздовж кожного боку хребта, доки не досягали ребер. Ребра необхідні для кріплення препарату до чашки для препарування, тому їх обрізали з кожного боку, залишаючи простір для приколювання голками. Також відрізали будь-які грудні та черевні внутрішні органи, які могли бути прикріплені до хребта або грудної клітки.

Нарешті, хребетний стовп відрізали, тримаючи його вертикально, на нижньому шийному/верхньому грудному рівні.

Виділений хребетний стовп поміщали у чашку для препарування з дном, викладеним силгардом, заповнену розчином сахарози, який постійно барботувався сумішшю 95% O₂ та 5% CO₂. Тканини закріплювали за допомогою голок 30G дорзальною стороною вниз, (вентральною стороною вгору) рострально до експериментатора, як показано на рисунку 2.8.

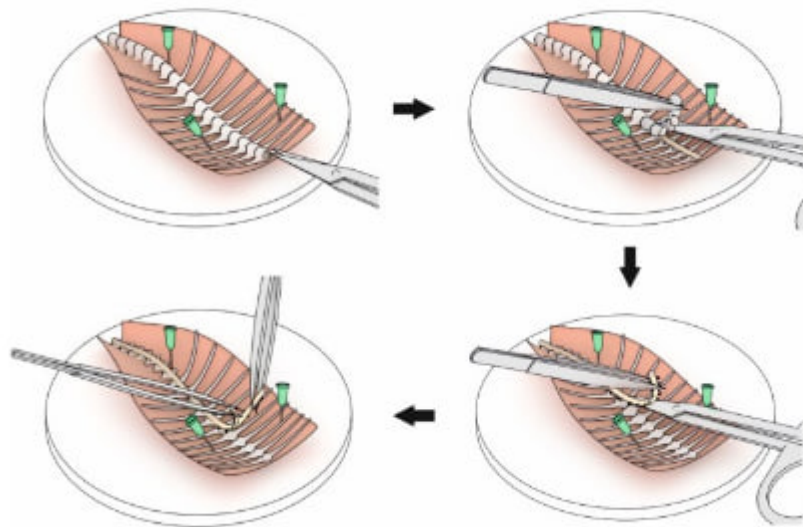


Рис. 2.8 Етапи виділення препарату цілої половини спинного мозку з збереженими дорзальними корінцями.

Наступні етапи приготування препарату проводились під стереомікроскопом.

Використовуючи грубі щипці, піднімали ребра біля ростральної частини хребетного стовпа, щоб побачити отвір. Вставляли одне лезо великих пружинних ножиць всередину отвору, притискали лезо до хребців і розрізали їх. Потім аналогічним чином розрізали інший бік хребців.

Розрізану вентральну частину хребта захоплювали грубими щипцями та злегка тягнули її вгору та каудально. Це дозволяє чітко побачити простір між спинним мозком і хребцями, куди потрібно вставити лезо ножиць. Тримавши ножиці паралельно до препарувальної чашки, продовжували розрізати хребці

(Рисунок). Також розрізали будь-які частини твердої мозкової оболонки, що прикріплені до вентральної частини хребта. Після того, як було оголено кінський хвіст, вентральну частину хребта вирізали та виймали її з чашки.

Маленькими пружинними ножицями розрізали тверду мозкову оболонку вздовж середньої лінії аж до каудального сегмента спинного мозку. За необхідності обережно відтягували тверду мозкову оболонку вигнутими щипцями.

Далі спинний мозок повністю відокремлювали від хребетного стовпа (рис. 2.8). Для цього спочатку розрізали кінський хвіст. Потім, використовуючи бічну частину хребців як рейку, розрізали дорзальні та вентральні корінці грудних сегментів з кожного боку спинного мозку. Використовуючи вигнуті щипці, відтягували спинний мозок вгору та вбік і розрізали тверду мозкову оболонку, прикріплену до дорзальної частини хребців. При цьому спинний мозок тримали лише за його ростральний кінець, тверду мозкову оболонку або грудні корінці. Відтягуючи спинний мозок, слідкували, щоб він завжди залишався у водному розчині і надмірно не ротягувався.

Поперекові дорзальні корінці розрізали, зберігаючи їхню повну довжину. Також розрізали будь-яку іншу тканину, яка прикріплює спинний мозок до внутрішньої частини хребта. Спинний мозок перевертали вентральною стороною вниз і розрізали тверду мозкову оболонку з дорзального боку вздовж середньої лінії. Повертали спинний мозок вентральною стороною вгору.

Використовуючи великі пружинні ножиці, розташовували їх леза вздовж середньої лінії та робили початковий розріз (довжиною 2–4 мм). Кожну сторону спинного мозку брали вигнутими щипцями та розводили їх, як показано на рисунку, щоб оголити десятку пластинку. В результаті отримували два препарати цілих половин спинного мозку зі збереженими корінцями. Приблизно у 25% випадків дорзальні корінці на одному з гемісекційних канатів перерізані. Це трапляється частіше, якщо тверда мозкова оболонка не розрізана належним чином.

Хребетний стовп виймали з чашки для препарування. Відрізали пошкоджені частини спинного мозку, тонкий крижовий сегмент, залишки твердої мозкової оболонки та дорзальні/вентральні корінці, не призначені для стимуляції/запису. Препарат розташовували таким чином, щоб спинний мозок та дорзальні корінці утворювали перевернуту літеру Т.

Препарат приклеювали до металевої пластини. Для цього спочатку металеву пластину клали поруч із чашкою для препарування, та голкою 25 G, наносили ціаноакрилатний клей. Клей наносився так, щоб створити тонкий шар, який покриває половину пластини. Використовуючи два вигнуті щипці, брали напіврозсічений спинний мозок за його найбільш ростральну та каудальну частини. Виймали препарат з водного розчину та обережно переносили його на частину металевої пластини, яка не покрита клеєм. Переконавалися, що сіра речовина (тобто пластинка Х) спрямована вгору.

Не відпускаючи щипці злегка розтягували препарат, піднімали його на декілька міліметрів над металевою пластиною та клали напіврозсічений тяж на покриту клеєм частину пластини. Дорзальні корінці при цьому за рахунок поверхневого натягу залишалися на вільній від клею частині пластини і це допомагало уникнути їх склеювання. Вигнутими щипцями, переносили металеву пластину назад у чашку для препарування.

Голкою 30 G відокремлювали корінці від металевої пластини щоб вони вільно плавали. Відрізали каудальні та ростральні частини спинного мозку, які виходять за межі металевої пластини або неправильно приклеєні. Також відрізали будь-які пошкоджені кінці дорзальних корінців

Загалом методика виділення ex-vivo препарату цілої половини спинного мозку щура була аналогічна такій для препарату, цілого мозку миші, за виключенням етапу гемісекції.

2.6. Підготовка препарату до петч-клемп реєстрацій, налаштування стимуляційних електродів, реєстрації потенціалу дорзального корінця

Перед початком електрофізіологічних вимірювань встановлювали експериментальну камеру та розташовували референтний електрод для петч-клемп запису. Систему перфузії наповнювали бікарбонатним розчином Кребса, який містив (в мМ) 125 NaCl, 2,5 KCl, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 глюкози та постійно барботувався 95 % O₂ та 5% CO₂ (рН 7,3). Швидкість перфузії становила ~ 1,5–2 мл / хв., у випадку повторного використання забезпечували мінімальний об'єм 30–40 мл. Для зменшення електричного шуму, спричиненого перистальтичним насосом, на відповідні трубки приєднували крапельниці.

Швидкість перфузії встановлювали в межах 1,5–3 мл/хв, що досягалося використанням скляних капілярів для подачі та відведення розчину. Кінчики капілярів обпалювали для досягнення потрібного діаметра або, за потреби, застосовували регулятор потоку. Перед початком записів перевіряли, щоб потік через камеру був стабільним і безперервним – поява хвиль чи коливань у розчині могла порушити стабільність patch-clamp контакту.

Безпосередньо перед перенесенням препарату розчин Кребса інтенсивно насичували газовою сумішшю 95% O₂ і 5% CO₂ протягом щонайменше 5 хвилин і підтримували безперервне барботування протягом усього експерименту.

Після цього чашку з препаратом обережно підносили до записувальної камери. За допомогою пінцета акуратно захоплювали металеву пластину, до якої прикріплений спинний мозок, і переносили її у камеру, слідкуючи, щоб увесь препарат, включно з дорзальними корінцями, постійно залишався зануреним у розчин. Металеву пластину вирівнювали так, щоб ростокаудальна вісь препарату була паралельною до однієї з осей (x або y) мікроскопного столика.

За потреби на цьому етапі здійснювали візуалізацію клітин пластини I, щоб переконатися у надійній фіксації спинного мозку до металевої пластини. Зображення мало залишатися стабільним – без коливань чи тремтіння. Якщо

спостерігався будь-який рух препарату, його обережно виймали з розчину, злегка осушували вентральну поверхню спинного мозку серветкою Kimwipe та наносили додаткову кількість клею для повторної фіксації.

Для налаштування стимуляції дорзальних корінців використовували мале збільшення (об'єktiv 4×-5×) і біле світлодіодне освітлення. Спочатку фокусувалися на дистальному кінчику дорзального корінця та вимірювали його діаметр за допомогою окулярного мікрометра або програмного забезпечення камери. На основі отриманих даних виготовляли підсмоктувальний електрод із тонкостінного скляного капіляра шляхом обпалювання кінчика до отримання потрібного діаметра. Отвір електрода мав бути дещо вужчим за діаметр дорзального корінця, що забезпечувало герметичне прилягання. Зазвичай заздалегідь готували набір підсмоктувальних електродів із різними розмірами отворів (250–400 мкм) і під час експерименту підбирали оптимальний варіант.

Отриманий електрод закріплювали в тримачі, змонтованому на маніпуляторі, і з'єднували його з анодом стимулятора постійного струму. Тримач електрода приєднували до 5 мл шприца за допомогою силіконової трубки, що дозволяло створювати контрольований негативний тиск. Доцільним було використання компактного маніпулятора з магнітною основою.

Далі піпетку опускали в експериментальну камеру й за допомогою шприца втягували розчин до моменту контакту внутрішнього хлорсрібного електрода із середовищем. Потім наближали отвір підсмоктувального електрода до кінчика дорзального корінця, точно вирівнюючи їх відносно один одного. Якщо положення корінця було неідеальним, його акуратно коригували пінцетом. Дистальну частину корінця всмоктували всередину піпетки створюючи легкий негативний тиск до утворення щільного контакту (рис. 2.9).

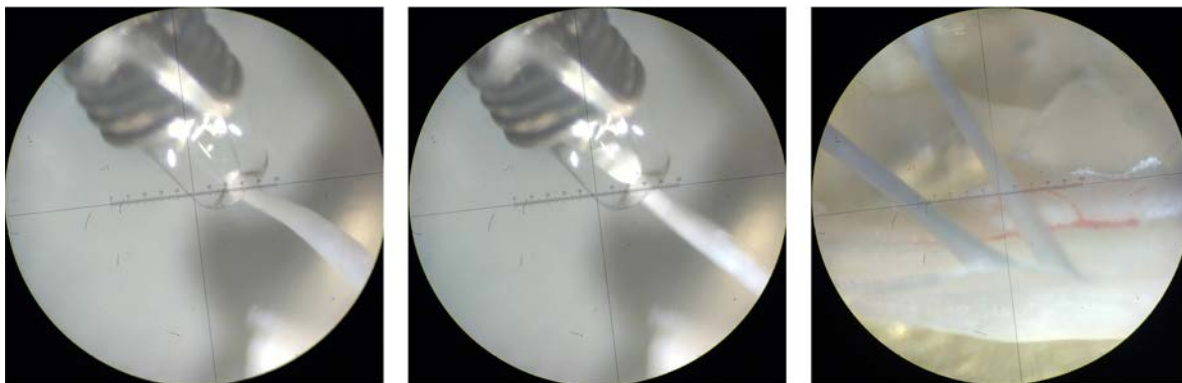


Рис. 2.9. Фотографії, що демонструють ключові етапи прикріплення дорзального корінця до підсмоктувального електрода

Після цього візуально оцінювали герметичність з'єднання між корінцем і електродом. Контакт мав бути достатньо щільним, але без надмірного натягнення тканини. У разі недостатньої герметичності або надмірного тиску корінець виймали та використовували електрод більш підходящого діаметру. Оскільки потенціали дії ініціюються саме на отворі всмоктувального електрода, для стимуляції було достатньо ввести лише дистальну частину дорзального корінця.

Референтний хлорсрібний електрод, підключений до катода стимулятора, розташовували поруч із всмоктувальним електродом у камері. Іноді його дріт обгортали навколо тримача всмоктувального електрода для зручності. За потреби процедуру повторювали для другого дорзального корінця.

Для препарату цілого спинного мозку миші після закріплення електродів фокусувалися на зоні входження дорзального корінця в спинний мозок і, використовуючи маніпулятор, обережно натягували корінець до легкого напруження, щоб трохи відкрити підлеглу ділянку дорзального рогу. Надмірне натягнення уникали, оскільки воно могло змістити препарат і порушити стабільність петч-клемп записів.

Якщо було потрібно проводити реєстрацію потенціалу дорзального корінця, ще один присмоктувальний електрод під'єднували до головки підсилювача. Розмір отвору на кінчику такого електрода повинен бути приблизно вдвічі-втричі меншим, ніж діаметр корінця. Електрод заповнювали зовнішнім розчином

та за допомогою мікроманіпулятора підводили до дорзального корінця максимально близько до його входу в спинний мозок. За допомогою шприца подавали негативний тиск, так, щоб між отвором скляної піпетки та бічною поверхнею корінця утворився щільний контакт. Опір електроду після підсмоктування становив від 20 до 100 кОм. Реєстрації ПДК проводили у режимі фіксації струму $I = 0$.

Після налаштування усіх стимуляційних електродів центрували сіру речовину безпосередньо під дорзальним корінцем у полі зору мікроскопа. Для забезпечення надійних відповідей на стимуляцію дорзального корінця петч-клемп записи проводили в межах того самого сегмента спинного мозку, який іннервується стимульованим корінцем, або в безпосередньо рострально прилеглому сегменті.

Візуалізацію нейронів здійснювали з використанням бічного інфрачервоного освітлення (IR-LED oblique illumination), оскільки проходження світла наскрізь через весь інтактний спинний мозок неможливе, а зазначений метод спеціально розроблений для ідентифікації клітин у товстих зрізах тканини (Safronov et al., 2007; Szűcs et al., 2009). Перед початком візуалізації з оптичного шляху мікроскопа видаляли всі фільтри, після чого встановлювали об'єктив із 60-кратним збільшенням, вмикали інфрачервоний світлодіод (IR-LED) та CCD-камеру, активували програмне забезпечення для керування камерою та вмикали режим автоматичного контрасту. Препарат освітлювали вузькопроменевим інфрачервоним світлодіодом (860 нм, $\pm 3^\circ$, SFH4550, Osram), закріпленим до мікроманіпулятора. Останній дозволяв підлаштовувати положення та кут освітлення для кожного досліду, для досягнення максимальної контрастності зображення. Джерело інфрачервоного світла розташовували таким чином, щоб його промінь падав на площину експериментальної камери під кутом приблизно $10\text{--}20^\circ$, що забезпечувало оптимальне бокове освітлення препарату. Після цього фокусувалися на поверхні сірої речовини спинного мозку та переконувалися у повній стабільності препарату. У разі виявлення повільних латеральних зсувів положення препарату коригували натяг дорзальних корінців за допомогою

мікроманіпуляторів до усунення напруження. Для покращення якості зображення положення та інтенсивність IR-LED регулювали до отримання максимально чіткого зображення клітинних контурів. Реєстрацію та вивід зображення на екран здійснювали за допомогою камери OLY-150IR (Olympus, Японія).

Дорсальні та вентральні межі пластинки X у *ex-vivo* препараті цілої половини спинного мозку щура ідентифікували за пучками паралельних волокон, що тягнуться в ростокаудальному напрямку. Як правило, по центру пластинки X першими помітно клітини епендими – тонкої (5–10 мкм) нейроепітеліальної вистилки центрального каналу. Епендимальний шар неоднорідний, і деякі нейрони пластинки X можуть спостерігатися на самій поверхні препарату (рис. 2.10). Більшість нейронів пластинки X розташовані під епендимою і мають довжину приблизно 20–40 мкм, хоча деякі можуть сягати 70–80 мкм. При правильному налаштуванні освітлення можна візуалізувати клітини на глибину до 60 мкм. У молодших (P7–9) тварин, у яких епендима менш виражена, можна візуалізувати клітини на глибину до 80–100 мкм.

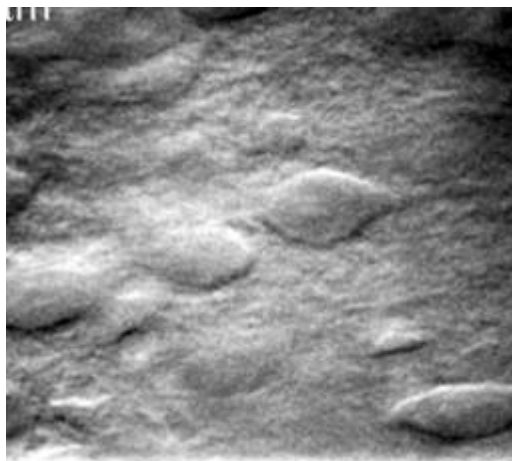


Рис.2.10 Нейрони пластинки X під бічним інфрачервоним освітленням

Пластинку I у *ex-vivo* препараті цілого спинного мозку миші ідентифікували як зону, що містить відносно розріджену популяцію нейронів середніх розмірів (15–35 мкм), які за морфологією належать до мультиполярних, веретеноподібних або пірамідальних типів. Вони розташовані на глибині 10–30

мкм від поверхні дорзального рогу; межі пластинки I визначали за пучками паралельних волокон, що тягнуться в rostroкаудальному напрямку, а її дорзальну межу – за волокнами дорзальних корінців. У дорослих мишей можлива візуалізація клітин на глибинах до 40–60 мкм, що відповідає зовнішнім шарам пластинки II, однак на таких рівнях розсіювання світла значно погіршує якість зображення, що ускладнює візуально керований петч-клемп. Тому для експериментів обирали нейрони пластинки I, розташовані на глибинах 10–30 мкм від поверхні дорзального рогу. Для електрофізіологічних записів підбирали нейрон з чітко окресленими контурами та стабільною позицією у полі зору; за можливості віддавали перевагу більшим клітинам (25–30 мкм), оскільки вони забезпечували вищу стабільність тривалих записів. Водночас враховували, що пластинка I є морфологічно та функціонально гетерогенною, тому обмеження вибору лише великими клітинами могло призвести до зміщення вибірки та зниження репрезентативності результатів. За необхідності проводили оцінку експресії ChR2, оскільки використаний вірусний конструкт забезпечував експресію білка ChR2-EYFP; флуоресцентний сигнал EYFP (збудження 510 нм, випромінювання 530 нм) використовували для візуалізації аксонів та en passant потовщень волокон РВДМ у межах пластинки I. Проте відсутність флуоресценції у конкретному полі зору не розцінювали як показник відсутності низхідного контролю з боку РВДМ, оскільки відростки нейронів пластинки I поширюються вентрально. Після завершення експерименту препарат фіксували для подальшого постфактум аналізу рівня експресії ChR2.

2.7 Петч-клемп реєстрації в конфігурації «ціла клітина»

Для виконання patch-clamp записів із нейронів пластинок I та X послідовно проводили низку підготовчих та технічних операцій, спрямованих на забезпечення стабільного встановлення конфігурації цілої клітини (whole-cell configuration). Перед початком записів вмикали все необхідне обладнання: підсилювач, аналого-цифровий перетворювач, генератор постійного струму, мікроманіпулятор та монохроматор (для оптичної стимуляції). Запускали

відповідне програмне забезпечення для кожного пристрою, після чого встановлювали режим voltage-clamp на підсилювачі.

Система контролю тиску для петч-піпетки готувалася шляхом під'єднання трьохходового крана до утримувача піпетки за допомогою силіконової трубки. До одного порту крана приєднували шприц об'ємом 2,5 мл, а до іншого – мундштук, виготовлений із шприца об'ємом 1 мл без поршня. Внутрішній розчин готували безпосередньо перед експериментом: 1 мл аліквоту калій-глюконатного внутрішньоклітинного розчину розморожували, після чого за допомогою шприца з фільтром наповнювали систему піпет-наповнювача. Упродовж експерименту шприц із розчином зберігали на льоді або при температурі +4–8 °C, щоб запобігти утворенню осаду калій-глюконату та/або NaGTP, який може блокувати кінчик піпетки.

Петч-піпетки виготовляли з боросилікатних скляних капілярів за допомогою мікропулера. Для отримання оптимальних параметрів користувалися рекомендаціями «Sutter Pipette Cookbook» (Sutter Instrument, 2008). Діаметр кінчика піпетки становив близько 2 мкм, а опір – 3–5 МОм при заповненні калій-глюконатним розчином. Після виготовлення піпетку заповнювали внутрішнім розчином і встановлювали у тримач, з'єднаний із головкою підсилювача.

Далі піпетку позиціонували під мікроскопом: водно-іммерсійний об'єктив піднімали так, щоб утворився меніск, який покривав конічну частину піпетки. Після занурення піпетки у розчин її кінчик фокусували у полі зору. Перевіряли цілісність та прохідність кінчика піпетки візуально, а також вимірювали її опір за допомогою функції «Membrane Test (Bath)» у програмі «pClamp»; при правильному виготовленні опір складав 3–5 МОм.

Після цього створювали постійний позитивний тиск у системі шляхом зміщення поршня шприца об'ємом 2,5 мл на 1–1,5 мл, забезпечуючи помітний вихід розчину з піпетки. Компенсували потенціал зміщення. Під час використання калій-глюконатного розчину така подача тиску зазвичай підвищувала опір між patch-піпеткою та референтним електродом приблизно на

0,5–0,7 МОм; значно більший приріст (кілька МОм) свідчив про часткове закупорення кінчика піпетки.

Після калібрування системи піпетку наближали до поверхні препарату, почергово опускаючи об'єктив і піпетку. Коли кінчик досягав поверхні тканини, переходили на малу швидкість руху маніпулятора та розташовували його безпосередньо над центром соми вибраного нейрона. Далі піпетку повільно занурювали в тканину; у міру просування кінчика назовні з піпетки виходив струмінь розчину, який помітно відтісняв і розсував навколишню тканину, що візуально підтверджувало правильність підходу до клітини.

Після позиціонування піпетки над вибраною клітиною здійснювали формування гігаомного контакту між скляною піпеткою та мембраною нейрона. Враховуючи, що вихід висококалієвого розчину з піпетки може деполяризувати навколишні нейрони, цей етап виконували максимально швидко, мінімізуючи час між проникненням у тканину та утворенням герметичного контакту.

Поступово опускаючи піпетку, спостерігали момент, коли клітинна мембрана вгиналася під дією позитивного тиску, що вказувало на безпосередній контакт із клітиною. Після того як глибина вгинання досягала приблизно подвійного діаметра отвору піпетки, трьохходовий кран переводили у положення, що сполучало систему з мундштуком, і негайно прикладали слабкий негативний тиск (аналогічний легкому втягуванню рідини через соломинку). Успішне встановлення початкового контакту підтверджувалося різким підвищенням опору піпетки до 200–300 МОм, після чого припиняли всмоктування. Протягом кількох секунд відбувалося спонтанне формування гігаомного контакту із опором ≥ 1 ГОм. У разі відсутності щільного контакту застосовували короточасний слабкий негативний тиск або прикладали невеликий негативний потенціал для стимуляції процесу герметизації.

Недостатня глибина вгинання мембрани унеможливило формування гігаомного контакту, тоді як надмірний тиск може призвести до механічного пошкодження клітинної оболонки та подальшої невдачі у створенні цілоклітинної конфігурації. Після утворення гігаомного контакту компенсували

ємність піпетки, дозволяли стабілізуватися інтерфейсу між піпеткою та клітиною протягом кількох хвилин і перевіряли величину струму витоку, яка не повинна перевищувати 20 пА (оптимально – менше 10 пА).

На цьому етапі, за потреби, проводили «cell-attached» записи для оцінки впливу низхідної модуляції на генерацію потенціалів дії у нейронах. Оскільки після формування гігаомного контакту лише невелика ділянка мембрани контактує з висококалієвим розчином всередині піпетки, тому деполяризація клітини не створювала суттєвих артефактів. «Cell-attached» записи здійснювали як у режимі фіксації струму ($I = 0$), так і у режимі фіксації потенціалу ($V = 0$). Використання режиму фіксації струму дозволяло докладніше аналізувати параметри потенціалів дії (ПД), тоді як режим фіксації потенціалу застосовувався переважно для підрахунку частоти ПД. Докладнішу методологію cell-attached записів наведено у джерелі (Bradaïa & Trouslard, 2002).

Після формування гігаомного контакту переходили до встановлення конфігурації «ціла клітина» (whole-cell): підсилювач переводили в режим фіксації потенціалу -70 мВ, а прорив мембрани здійснювали шляхом обережного прикладання негативного тиску через мундштук, поступово збільшуючи всмоктування до того моменту, коли плоска лінія в індикаторі «Membrane Test (Patch)», що свідчила про гігаомний контакт, змінювалася на характерний трансієнт цілоклітинного доступу; при появі цього транзієнта негативний тиск негайно припиняли. Протягом усього експерименту постійно контролювали опір доступу, оскільки він має властивість зростати з часом і його стабільність є критичною для якості даних; слід припиняти подальші записи, якщо зміна опору доступу перевищує 20 %. Наприклад, у більших нейронів пластинки I опір доступу зазвичай становить $\sim 15\text{--}25$ МОм, у менших – $\sim 25\text{--}35$ МОм, і, загалом, опір доступу повинен бути принаймні на порядок меншим за мембранний опір клітини. Наявність підвищеного опору піпетки корелює з більшою мінливістю опору доступу, тому його слід враховувати при відборі записів. За потреби компенсували ємнісний транзієнт та опір доступу для оптимізації умов вимірювання.

Оцифровування сигналу виконували з частотою 10–20 кГц, а смугу пропускання Bessel-фільтра встановлювали на рівні 2,4–3 кГц.

Стимулювання дорзального корінця здійснювали за допомогою підсмоктувального електроду. Діаметр піпетки підбирався відповідно до діаметру корінця. Джерелом імпульсів струму був стимулятор ISO-Flex (AMPI, Israel). Для активації всіх волокон, в тому числі високопорогових А δ - та С-аферентів, використовувався імпульс тривалістю 1 мс і силою 150 мкА. Селективної активація С-волокон досягали шляхом застосування електричних стимулів негативної полярності (-150 мА 1 мс), що індукували анодний блок швидкопровідних А β /А δ - волокон, механізм якого детально зображено на рисунку 2.11. (Fernandes et al., 2020; Krotov et al., 2023).

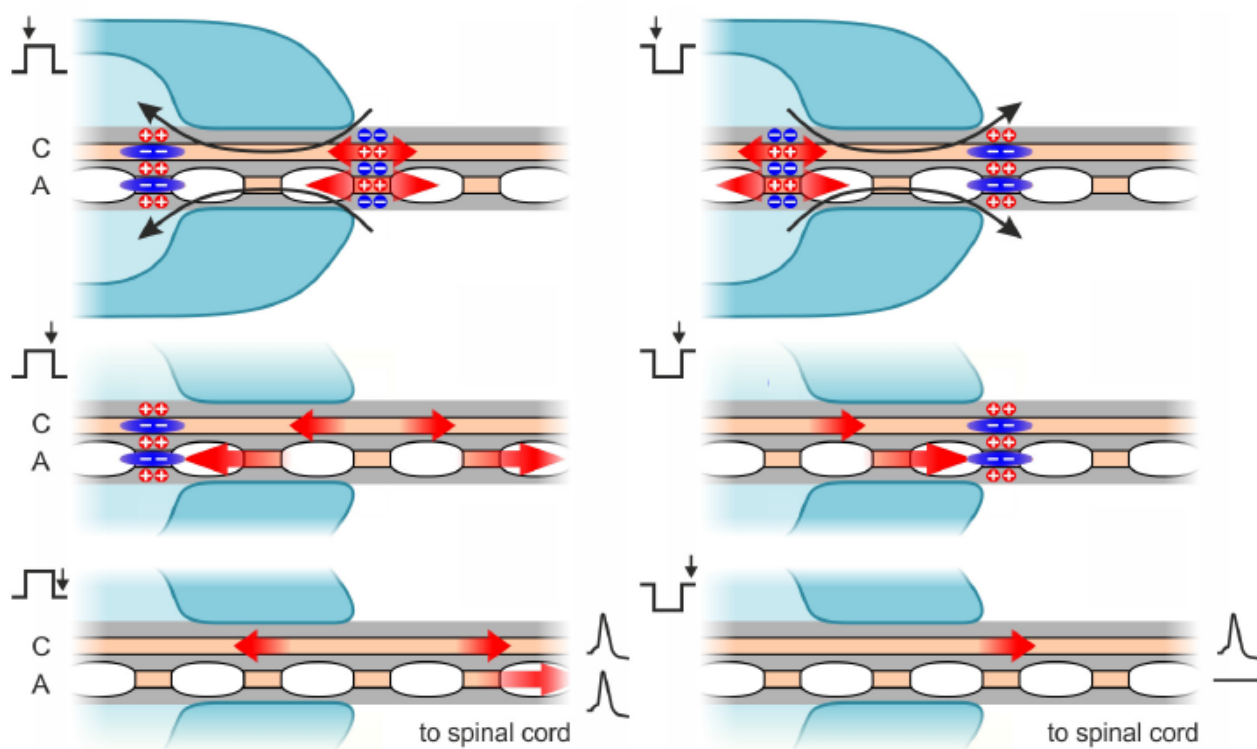


Рис. 2.11. Техніка селективної активації С-волокон за допомогою стимуляції інвертованим імпульсом струму тривалістю 1 мс. Червоні стрілки представляють поширення збудження. Сині зони представляють області, де провідність заблокована внаслідок гіперполяризації мембрани (анодний блок). Враховуючи геометрію країв піпетки та різницю в швидкостях провідності, потенціали дії А β /А δ -волокон, що при стимуляції негативним струмом

утворюються на внутрішньому кінці країв піпетки, блокуються на зовнішньому кінці, тоді як потенціали дії С-волокон через свою меншу швидкість поширення уже можуть проходити до спинного мозку.

Для селективної стимуляції навпаки, А β /А δ -волокон використовували стимуляцію тривалістю 1 мс і силою 150 мкА. Такий стимул є супрамаксимальним для А β /А δ -волокон, проте залишається підпороговим для С-волокон (Krotov et al., 2019). Щоб запобігти феномену “wind-up”, який спостерігається в нейронах дорзального рогу (Nachisuka et al., 2018) та сповільнення швидкості проведення ПД в С-волокнах (Pinto et al., 2008) частота, з якою відбувались послідовні стимуляції корінця становила 0,1 Гц.

Оптогенетичну стимуляцію ChR2, експресованого в низхідних аксонах, що походять від РВДМ, проводили за допомогою синього світла (470 нм), імпульси тривали 10 мс із частотою 5 Гц. За потреби налаштовували тригери для синхронізації фотостимуляції та електрофізіологічного запису. Наведені параметри слід розглядати як орієнтовні, оскільки оптимальні значення визначаються рівнем експресії ChR2, потужністю джерела світла та оптичною конфігурацією. У проведених експериментах джерело світла забезпечувало потужність до 10 мВт, при цьому імпульси 10 мс із частотою 5 Гц викликали достовірні зміни активності нейронів; у окремих серіях експериментів частоту збільшували до 20 Гц.

2.8 Статистичні методи, аналіз даних

Початкова робота з даними електрофізіологічних реєстрацій проводилась в застосунку Clampfit (Molecular devices). Підготовка записів в режимі фіксації потенціалу складалась з наступних етапів. Спочатку базову лінію для всіх трейсів – окремих записів повторень протоколу – приводили до нуля. Від усіх записів віднімали струм витоку, який визначали, як середнє значення струму на ділянці запису без викликаних чи спонтанних синаптичних подій та/або артефактів реєстрації. За можливості така «контрольна» ділянка обиралась зразу перед

початком стимуляції, а її довжина становила від 5 до 15 мс. Далі для усіх записів визначали опір доступу та пасивні характеристики клітинної мембрани. Для цього під час записів на початку кожного повторення, в протоколі введено зміну підтримуваного потенціалу з -70 мВ до -80 мВ та тривалістю 50мс. Використовуючи запис струму у відповідь на таку зміну підтримуваного потенціалу на клітині визначали опір доступу та пасивні характеристики мембрани (Thompson et al., 2001). Опір доступу вимірювали як обернене значення пікового струму при зміні підтримуваного потенціалу на величину цієї зміни (10 мВ). Аналогічним способом, за величиною струму при виході на плато оцінювали загальний опір (сума опорів доступу та мембрани). Ємність мембрани визначалась через її опір та виміряну константу спаду.

Для аналізу брались лише ті записи, у яких протягом реєстрації опір доступу та пасивні параметри мембрани змінювались не більше, ніж на 20%. Для попарних порівнянь використовували не менше 8 реєстрацій відповідей клітини в кожній з порівнюваних груп.

Силу викликаних стимуляцією відповідей характеризували кількістю перенесеного заряду, останнє значення чисельно рівне площі під реєстраційною кривою. Оскільки збуджувальні струми в електрофізіології вважаються від'ємними, значення для збуджувальних відповідей записувались з від'ємним знаком.

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; Pinto et al., 2010) Класифікація моносинаптичних входів проводилася наступним чином: $CV < 0,5$ м/с відповідає волокнам C, $0,6-1,4$ м/с – волокнам A δ , $CV > 3,5$ м/с – волокнам A β .

Оскільки отримані набори даних часто не відповідають нормальному розподілу, для статистичних порівнянь використовували непараметричні тести. Для аналізу інтегралів постсинаптичних струмів та амплітуд моносинаптичних компонентів первинного аферентного входу застосовували тест Манна–Уїтні, а

для більших наборів даних спонтанних постсинаптичних струмів – тест Колмогорова–Смирнова. Для візуальної презентації сліди подій за потреби обробляли фільтром Савицького–Голя для зменшення високочастотного шуму, спричиненого перистальтичним насосом.

Побудова графіків та статистичні тести виконували у програмах origin та Rstudio. При порівнянні вибірок спочатку для кожної будували Q-Q графіки з довірчим інтервалом для перевірки нормальності розподілу даних. При нормально розподілених даних значення між двома групами порівнювали за t-критерієм Велча, який є модифікацією t-тесту Стюдента для вибірок з нерівними дисперсіями. Для непараметричних даних використовувався пермутаційний тест. Статистично достовірними вважалися відмінності, при яких р-значення проведеного тесту становило менше 0,05.

Для аналізу спонтанної та мініатюрної синаптичної активності електрофізіологічні записи аналізували за допомогою програми NeuroExpress для автоматичної детекції mEPSC. Оцінювали частоту, яка являє собою величину, обернену до інтервалу між подіями. Проміжні результати оцінювали, використовуючи програмний пакет Microsoft Office Excel та спеціально створений скрипт для інтерактивної візуалізації даних, написаний мовою програмування R.

РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Низхідний контроль ноцицептивної мережі в десятій пластинці спинного мозку

3.1.1 Деполяризація первинних аферентів викликана стимуляцією ЗБК

Відомо, що пресинаптичне інгібування у первинних аферентах супроводжується деполяризацією первинних аферентів (ДПА) (Rudomin & Schmidt, 1999; Willis Jr., 1999). Пресинаптичне інгібування аферентів значно відрізняється від постсинаптичного інгібування нейронів, яке супроводжується гіперполяризацією мембрани. ДПА викликається вивільненням ГАМК зі спинномозкових інтернейронів, і, відповідно, активацією GABA_A рецепторів на постсинаптичній мембрані первинних аферентів. Оскільки у волокнах первинних аферентів підвищена внутрішньоклітинна концентрація аніонів хлору, то відкриття хлорних каналів супроводжується виходом хлору назовні за електрохімічним градієнтом, і, відповідно, деполяризацією аферентів (Fernandes et al., 2020; Zimmerman et al., 2019). В експериментах ДПА можна спостерігати як потенціал дорзального корінця (ПДК), повільну, антидромно поширювану хвилю деполяризації від первинних аферентів, що реєструють електродом, який під'єднується до дорзального корінця (рис. 3.1).

Метод реєстрації ПДК є відносно простим, він гарно адаптований для *ex-vivo* препаратів з збереженими дорзальними корінцями та відображає загальний рівень пресинаптичного інгібування первинних аферентів цілого корінця. Тому, саме його було обрано для початкової оцінки пресинаптичного інгібування, зумовленого низхідним впливом.

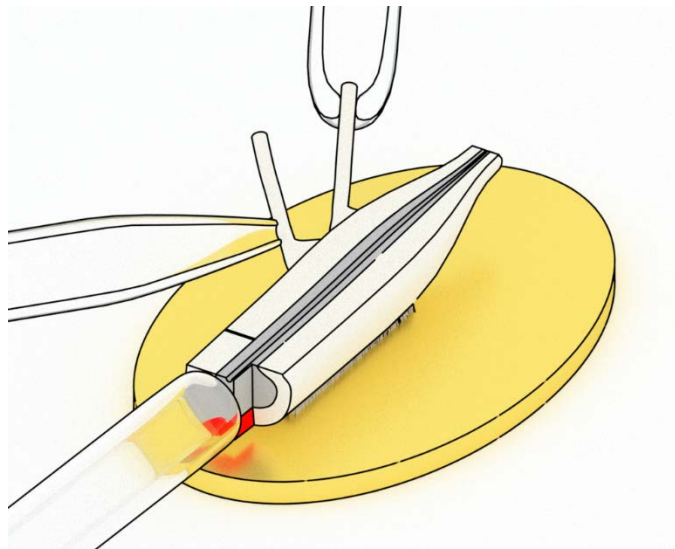


Рис. 3.1. Схема реєстрації ПДК від низхідних шляхів. Червоним кольором позначено ЗБК. Для запобігання ретроградного поширення потенціалів дії висхідними шляхами, здійснено переріз дорзальної колонки.

Щоб визначити пресинаптичне інгібування, зумовлене низхідними волокнами у складі ЗБК, було зареєстровано та виміряно ПДК, викликані супрамаксимальною стимуляцією ЗБК згідно до описаної в попередньому розділі методики. При стимуляції ЗБК на дорзальному корінці реєстрували позитивну зміну потенціалу, яка наростала до пікового значення приблизно через 100мс, і поступово згасала в межах секунди (рис.3.2). Амплітуди становили 17 мкВ. Слід зазначити, що амплітуда ДПА завжди була менша (в ≈ 2.3 рази) від ДПА, викликаного стимуляцією того ж, або сусіднього заднього корінця. Таким чином, ми показали, що стимуляція ЗБК в *ex-vivo* препараті спинного мозку дійсно призводить до деполяризації первинних аферентів найбільш вірогідно за рахунок виділення нейромедіаторів з синапсів аксонів низхідних шляхів.

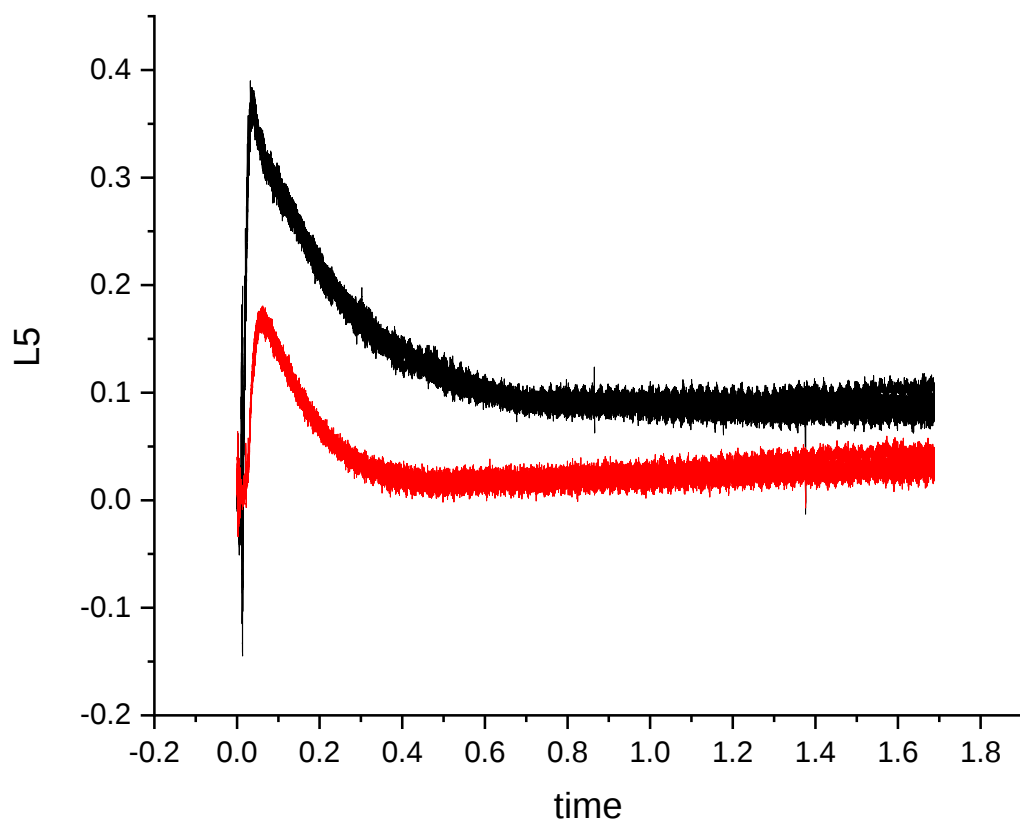


Рис. 3.2. ДРП, викликані стимуляцією корінця (чорний) та ЗБК (червоний)

Головним низхідним шляхом у складі ЗБК є шлях від ростроветромедіальної області довгастого мозку (РВДМ) (De Preter & Heinricher, 2024). Нейрони, що знаходяться у ядрах цієї зони складаються з проноцицептивних ON клітин, антиноцицептивних OFF клітин та NEUTRAL клітин (H. Fields et al., 1983). ON клітини РВММ неактивні в разі відсутності ноцицептивного входу, в той час як OFF клітини постійно генерують пачкові розряди потенціалів дії тривалістю близько 10 сек із змінною частотою у діапазоні 5-20 Гц (Carlson et al., 2007). Генерація потенціалів дії NEUTRAL клітинами не залежить від активації ноцицептивних входів. Кількість OFF клітин РВММ, що дають низхідні проєкції у люмбарний відділ спинного мозку значно переважає кількість ON клітин (H. L. Fields et al., 1995). Таким чином, ми припустили, що загальна активація низхідних шляхів ЗБК повинна призводити

до сумарної антиноцицепції. Ми також вирішили застосовувати такі патерни стимуляції, які генеруються OFF клітинами *in vivo*, для того щоб дослідити як ендогенна активність OFF клітин може впливати на первинні аферентні входи та роботу ноцицептивних мереж лямбарної частини спинного мозку.

На відмінну від поодиноких стимулів ЗБК, при застосуванні більшої кількості стимулів на частотах характерних для активності OFF клітин спостерігали збільшення ПДК, яке відбувалось внаслідок послідовного накладання відповідей від окремих стимулів. Так, при застосуванні стимуляції ЗБК з частотою 20 Гц кожна наступна деполяризація накладалась на попередню, багатократно збільшуючи амплітуду та площу ПДК (Рис. 3.3). Таким чином, ми спостерігали часову сумачію ПДК від кожних окремих стимулів. При частоті стимулів у 20 Гц загальна амплітуда зміни потенціалу дорзального корінця наростала, виходячи на плато приблизно на п'ятому-восьмому стимулі (250-400 мс) і продовжувала залишатись такою впродовж всієї тривалості послідовності стимулів (1 с). Після завершення стимуляції тривалістю 1 сек, кінетика спаду ПДК була значно подовжена в порівнянні з такою при однократній стимуляції ЗБК (~0,3 сек) і точно сягала декількох секунд (Рис. 3.12).

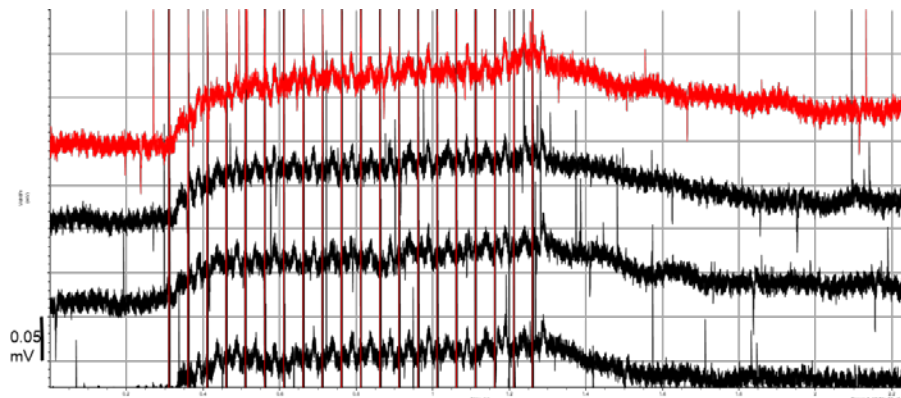


Рис. 3.3. Поступове підвищення потенціалу дорзального корінця при багаторазовій високочастотній стимуляції ЗБК. Показано відповіді на послідовні стимуляції ЗБК (20 Гц, 1 сек), що повторювалися кожні 10 сек.

Нажаль, ми не змогли кількісно точно визначити кінетику спаду ПДК із-за суттєвих повільних змін базового рівня потенціалу. Однак поступове збільшення

потенціалу під час стимуляції та його багатосекундний спад після її закінчення прямо свідчать про накопичення і багатосекундне перебування нейромедіаторів поблизу первинних аферентів.

Слід відзначити, що при частоті 20 Гц час між стимулами становить 50мс. Згідно до рисунку 3.2, це є час, коли ще триває фаза наростання одиничного ПДК. Якщо ж проводити стимуляцію ЗБК з частотою в 5 Гц, тобто, раз у 200мс, то наступний стимул буде приходиться на фазу спадання ПДК (пік якого припадає приблизно на 50-100мс після стимулу). Відповідно, ефективна сумація не відбувається, а досягнута амплітуда ПДР не повинна суттєво перевищувати таку, яка б спостерігалась при однократній стимуляції. Дійсно саме такий результат ми і отримували при коротких стимуляціях ЗБК на частоті 5 Гц (Рис. 3.4).

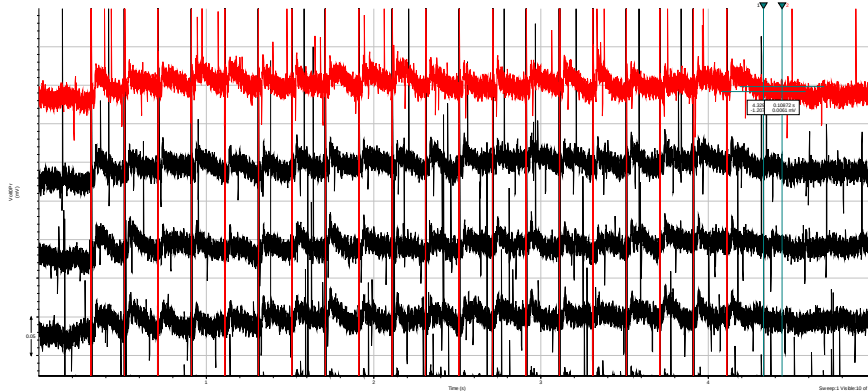


Рис. 3.4. Потенціал дорзального корінця при стимуляції ЗБК на частоті 5 Гц. Показано відповіді на послідовні стимуляції ЗБК (5 Гц, 1 сек), що повторювалися кожні 10 секунд.

Виходячи з цих спостережень щодо залежності параметрів ПДР від частоти стимуляції ЗБК, слід очікувати наявності пресинаптичного впливу на потенціал первинних аферентів при активації низхідних шляхів, що повинно призводити до певної низхідної модуляції постсинаптичних струмів викликаних стимуляцією первинних аферентів та залежності такої модуляції від частоти та кількості стимуляцій ЗБК.

3.1.2 Вплив частоти стимуляції ЗБК на входи первинних аферентів та мережеву активність нейронів десятої пластинки

Раніше в нашій лабораторії вже було показано, що постійна стимуляція ЗБК з частотою 5 Hz впливає на відповіді нейронів десятої пластинки на стимуляцію дорзального корінця, але ступінь модуляції відповідей низхідними шляхами та механізми цієї модуляції залишалися нез'ясованими. В першій серії дослідів ми вирішили перевірити наявність та ступінь модуляції моносинаптичних входів і довести її пресинаптичний характер. Рис. 3.3 демонструє експериментальний дизайн, який ми використовували для дослідження впливу низхідної модуляції на первинні аферентні входи у люмбарній частині спинного мозку. Стимуляція ЗБК (DLF) та дорзального корінця у складі *ex-vivo* препарату спинного мозку проводилася скляними електродами аналогічно до випадку реєстрацій ПДР (рис. 3.5 А). Водночас ми за допомогою скляної піпетки проводили петч-клемп реєстрації від нейронів десятої пластинки спинного мозку з використанням бічного інфрачервоного освітлення, як це робилося раніше в нашій лабораторії (Krotov et al., 2022). Стимуляція первинних аферентів в такому препараті з характерними патернами активності OFF клітин призводила до виникнення моно- та полісинаптичних постсинаптичних збуджувальних струмів (ПСЗС) (Krotov et al., 2022). Приклад реєстрацій у випадку коли моносинаптичні відповіді були чітко виокремленими приведений на Рис. 3.5 Б-Г. Попередня стимуляція ЗБК (20 Hz, 8сек) призводила до значного інгібування моносинаптичних А- та С-компонентів відповіді на стимуляцію дорзального корінця. Це інгібування було безперечно пресинаптичним оскільки сама по собі стимуляція ЗБК не викликала в даному та інших аналогічних випадках (n=6) жодних постсинаптичних відповідей (рис. 3.5 В). Після припинення стимуляції ЗБК відповіді на стимуляцію дорзального корінця поступово поновлювалися і за деякий час (40-100 сек) поверталися до попередніх значень (нижня крива на рис. 3.5 В). Суттєве, статистично достовірне та різне за ступенем дії інгібування А- та С-компонентів відповіді на стимуляцію

дорзального корінця показано на Рис. 3.5 Г,Д. Аналогічні результати отримані ще для 4 нейронів десятої пластинки спинного мозку щурів.

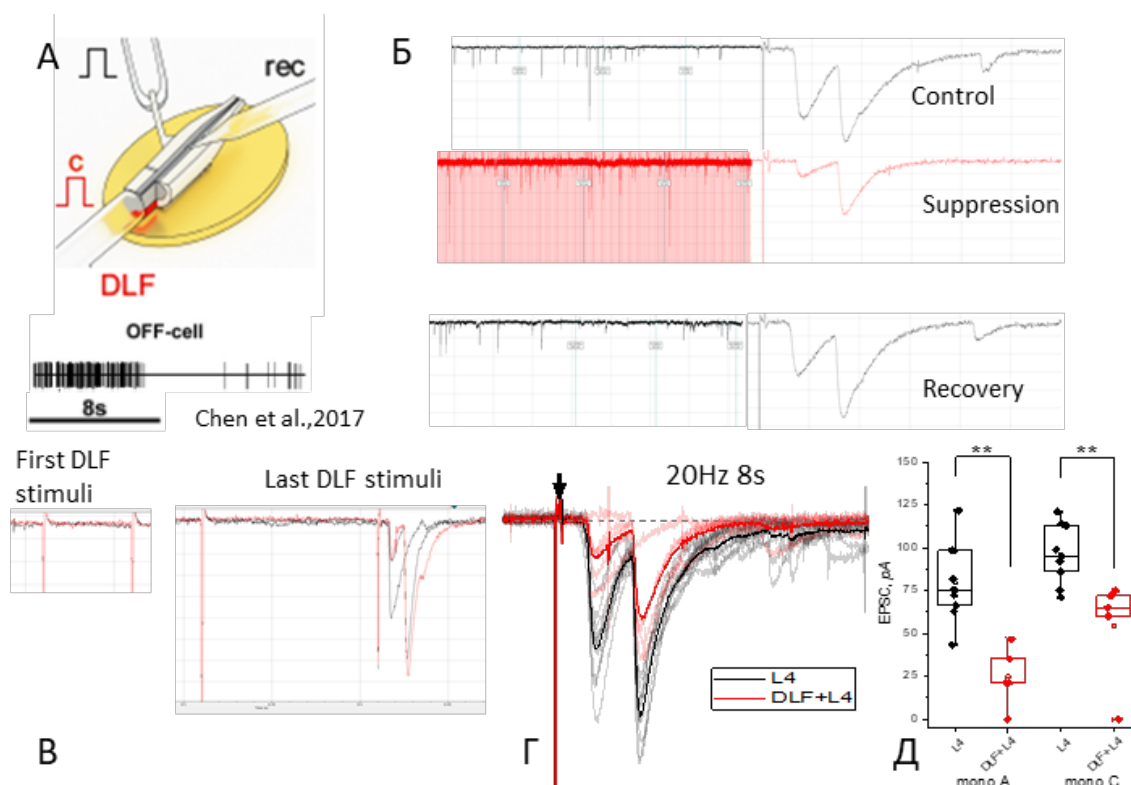


Рис. 3.5. Диференційне пресинаптичне інгібування моносинаптичних А- та С-входів первинних аферентів до нейронів десятої пластинки високочастотною стимуляцією ЗБК з патерном характерним для активності OFF клітин РВММ. Показано відповіді на послідовні стимуляції ЗБК (20 Гц, 8 сек), що повторювалися кожні 10 сек. **А.** Експериментальний дизайн та характерний патерн активності OFF клітин, що був відтворений в даному експерименті. **Б.** Приклади реєстрацій моносинаптичних А- та С-компонент струму, викликаного стимуляціями дорзального корінця до стимуляції ЗБК (верхня крива), через 100 мсек після стимуляції ЗБК (середня крива) та через 100 сек після припинення даної стимуляції (нижня крива). Реєстрація струму під час стимуляції ЗБК показана червоним на середній кривій. **В.** Відсутність постсинаптичних струмів у даному нейроні десятої пластинки у відповідь на стимуляцію ЗБК. **Г.** Інгібування моносинаптичних А- та С-компонент струму під дією низхідної стимуляції. Показано по 7 відповідей на стимуляцію дорзального корінця в контролі (сірі криві) та попередньою стимуляцією ЗБК (рожеві криві). Чорна та

червоні криві показують усереднене значення струмів. Відмітьте наявність повної відсутності моносинаптичних струмів (failure) в деяких ЗПСС під дією стимуляції низхідних шляхів. Д. Статистична обробка даного експерименту, що показує значне достовірне та різне інгібування А- та С-компонент струму. Аналогічні результати що до інгібування моносинаптичних А- та С- струмів викликаних стимуляцією дорзального корінця низхідною стимуляцією були отримані для 7 нейронів десятої пластинки.

Таким чином, ми показали що стимуляція ЗБК (20 Гц, 8 сек) може призводити до дуже суттєвого або навіть повного (failure) інгібування моносинаптичних відповідей на стимуляцію первинних аферентів. Тому наступним кроком, як було вказано в попередньому підрозділі, ми виріши перевірити залежність впливу низхідної стимуляції на відповіді на стимуляцію первинних аферентів.

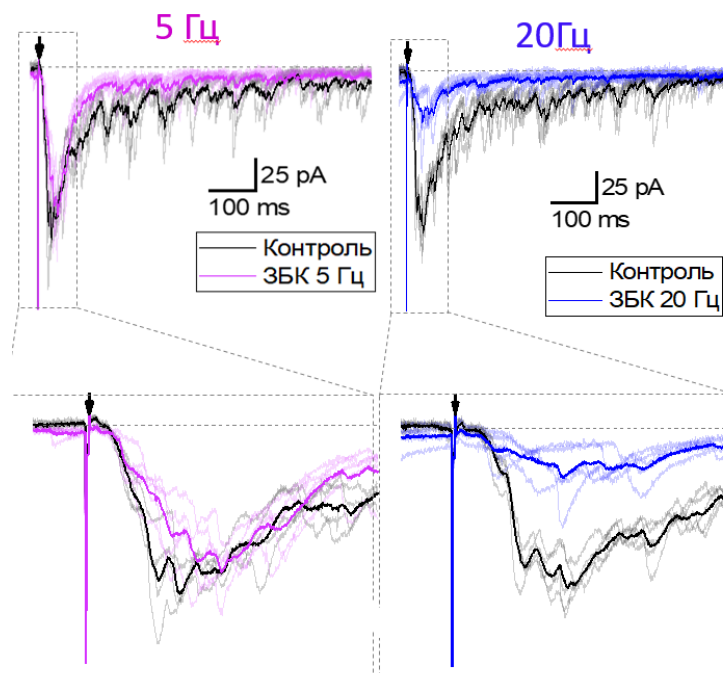


Рис. 3.6. Модуючий вплив низхідних волокон в складі ЗБК на входи первинних аферентів та мережеву активність нейронів десятої пластинки залежить від частоти їх стимуляції. Окремі (показані блідим кольором) та усереднені (показані товщими лініями) записи ЗПСС, викликаних стимуляцією

дорзального корінця в контролі (чорний) та після 8 секунд стимуляції ЗБК з частотою 5 Гц (фіолетовий) або 20 Гц (синій). Верхній ряд показує інгібування загального ЗПСС, який викликаний одноразовою стимуляцією ДК, за стимуляцій ЗБК. Нижній ряд кривих демонструє (з кращою часовою розгорткою) вплив стимуляції ЗБК на моно- та полісинаптичний компоненти. Аналогічні результати щодо інгібування моно та полісинаптичних струмів та мережевої активності викликаних стимуляцією дорзального корінця низхідною стимуляцією були отримані для всіх досліджених нейронів десятої пластинки ($n=12$).

На рисунку 3.6 показані репрезентивні відповіді нейрону десятої пластинки на супрамаксимальну (150 μ A, 1 мсек) стимуляцію дорзального корінця в контролі та при попередній стимуляції ЗБК протягом 8 сек з частотою 5 та 20 Hz.

Сама по собі поодинокі стимуляція дорзального корінця (ДК) викликала моно- та полісинаптичні ЗПСС та значне багатократне збільшення мережевої синаптичної активності в нейронах пластинки X. Видно, що попередня стимуляція ЗБК пригнічує як моно- та полісинаптичні аферентні входи (показані на нижньому ряді на рис. 3.6), так і блокує викликану стимуляцією ДК тривалу мережеву активність в пластинці X (показану на верхньому ряді на рис. 3.6), що триває сотні мілісекунд або навіть декілька секунд (дані не приведено) після цієї стимуляції. Стимуляція ЗБК з помірною частотою (5 Гц, 8 с) частково пригнічувала цю підвищену мережеву активність, не змінюючи істотно безпосередньо моно- та полісинаптичну відповідь на стимуляцію первинних аферентів (рис. 3.6, 3.7). При стимуляції ЗБК з високою частотою (20 Гц, 8 с) спостерігалось подальше зменшення активності локальної мережі до рівня, який реєструвався без стимуляцій ДК. Окрім того, при стимуляції ЗБК (20 Гц, 8 с) спостерігали зменшення моно/ полісинаптичної компоненти первинного аферентного входу, що свідчить про їх пресинаптичне інгібування (рис. 3.7, 3.8).

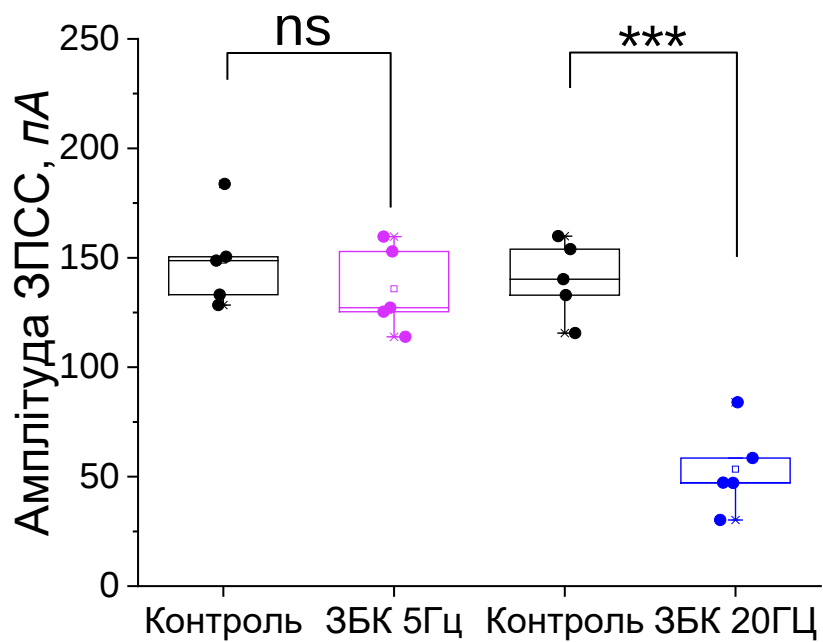


Рис. 3.7. Порівняння амплітуд моно/полісинаптичної компоненти ЗПСС у контролі та після 8 секунд стимуляції ЗБК з частотою 5 Гц (фіолетовий) або 20 Гц (синій).

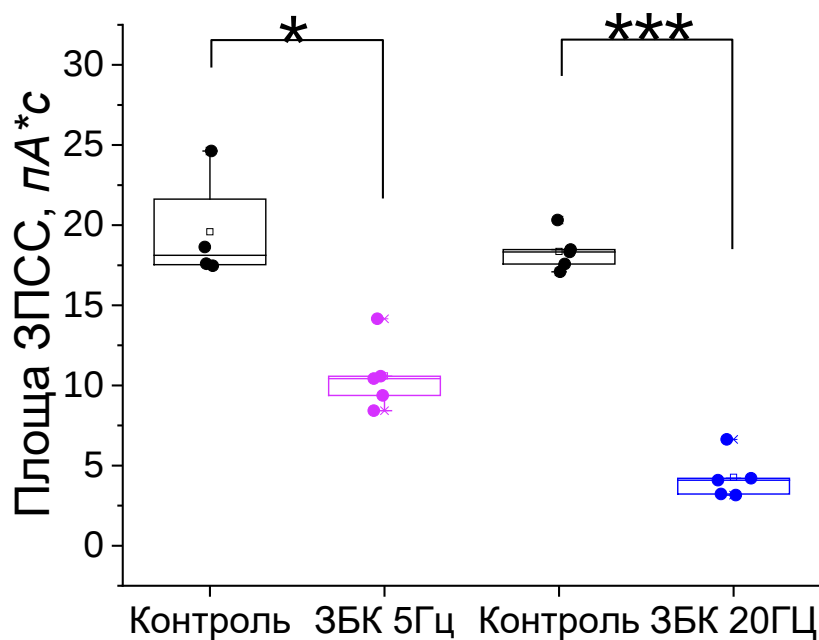


Рис. 3.8. Порівняння площ ЗПСС у контролі та після 8 секунд стимуляції ЗБК з частотою 5 Гц (фіолетовий) або 20 Гц (синій).

Зменшення моно/полісинаптичних струмів вказує на те, що відбувається пресинаптичне гальмування первинних аферентів через аксо-аксональні синапси, в той час як зменшення інтегралу струму після завершення моно/полісинаптичного компонента ЗПСС демонструє суттєве достовірне пригнічення мережевої активності нейронів десятої пластинки. Але, те що викликані моно- та полісинаптичних струми і викликана мережева активність модулюються по-різному, свідчить що низхідні шляхи при їх активації з патерном східним до ендогенної активності OFF клітин RBMM, модулюють первинні аферентні входи та викликану мережеву активність за допомогою різних молекулярно-клітинних механізмів.

3.1.3 Вплив кількості стимуляції ЗБК на входи первинних аферентів та мережеву активність нейронів десятої пластинки

В попередній серії дослідів ми показали, що стимуляція ЗБК з патерном, що нагадує ендогенну активність OFF клітин RBMM, призводить до майже повного інгібування ноцицепції у десятій пластинці спинного мозку. Далі ми вирішили перевірити чи дійсно стимуляція тривалістю 8 сек при 20 Hz, що генерує 160 потенціалів дії у аксонах низхідних шляхів є необхідною для такого сильного інгібування. Тому ми застосували стимуляцію ЗБК з частотою 20 Hz та кількістю потенціалів дії 20 (1 сек), 80 (4 сек) та 160 (сек).

Як і у попередніх дослідях, стимуляція ДК викликала значне багатократне збільшення синаптичної активності в нейронах пластинки X. Видно, що загалом попередня стимуляція ЗБК пригнічує як моно- та полісинаптичні аферентні входи (показані на нижньому ряді на Рис. 3.9), так і блокує викликану стимуляцією ДК тривалу мережеву активність в пластинці X (показану на верхньому ряді на Рис. 3.9), що триває сотні мілісекунд або навіть декілька секунд після цієї стимуляції.

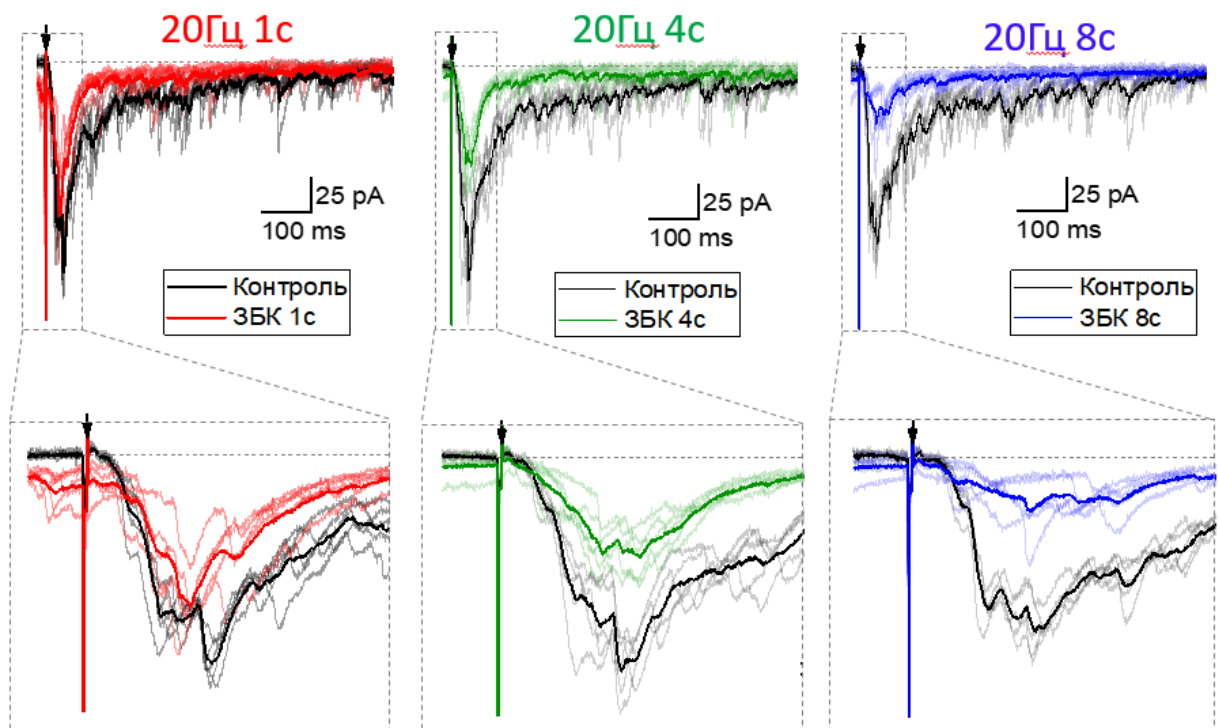


Рис. 3.9. Модулюючий вплив низхідних волокон в складі ЗБК на входи первинних аферентів та мережеву активність нейронів десятої пластинки залежить від кількості стимулів ЗБК. Окремі (показані блідим кольором) та усереднені (показані товщими лініями) записи ЗПСС, викликаних стимуляцією дорзального корінця в контролі (чорний) та після 1 с (червоний), 4 с (зелений) або 8 с (синій) стимуляції ЗБК з частотою 20 Гц. Верхній ряд показує інгібування загального ЗПСС, який викликаний одноразовою стимуляцією ДК, за стимуляції ЗБК. Нижній ряд кривих демонструє (з кращою часовою розгорткою) вплив стимуляції ЗБК на моно- та полісинаптичний компоненти. Аналогічні результати щодо інгібування моно/полісинаптичних струмів та мережевої активності викликаних стимуляцією дорзального корінця низхідною стимуляцією при частоті 20 Гц з різною кількістю ПД були отримані для 5 досліджених нейронів десятої пластинки.

Помірна стимуляція ЗБК (20 ПД на частоті 20 Гц, 1 сек) частково пригнічувала мережеву активність підвищену стимуляцією ДК, не змінюючи істотно безпосередньо відповідь на стимуляцію первинних аферентів. При збільшенні кількості стимулів ЗБК (80 і 160 ПД на частоті 20 Гц, 4 та 8 сек,

відповідно) спостерігалось подальше незначне зменшення активності локальної мережі до рівня, який реєструвався в стані спокою, без стимуляції ДК (Рис. 3.10). Цікаво, що при таких стимуляції ЗБК спостерігали зменшення моно/полісинаптичної компоненти первинного аферентного входу (Рис. 3.11), що свідчить про їх пресинаптичне інгібування.

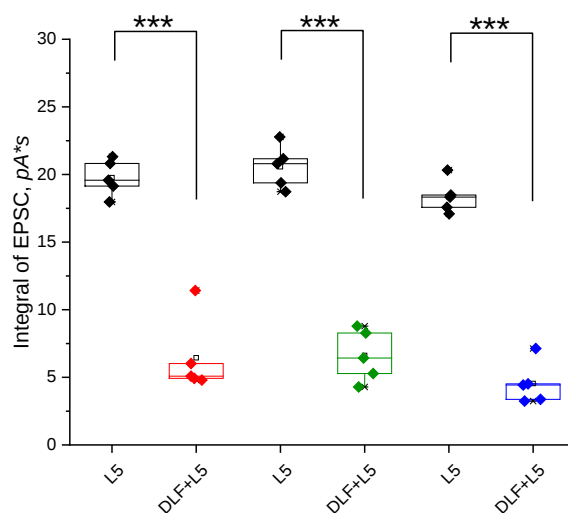


Рис 3.10. Порівняння інтегралів викликаних стимуляцією дорзального корінця ЗПСС у контролі (чорний) та після 1 с (червоний), 4 с (зелений) або 8 с (синій) стимуляції ЗБК з частотою 20 Гц.

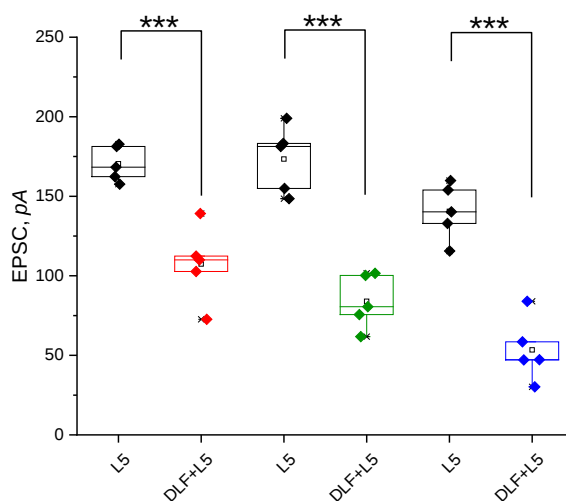


Рис. 3.11. Порівняння амплітуд моно/полісинаптичної компоненти ЗПСС, викликані стимуляцією дорзального корінця у контролі (чорний) та після 1 с (червоний), 4 с (зелений) або 8 с (синій) стимуляції ЗБК з частотою 20 Гц.

Як і попередньому розділі, зменшення моно/полісинаптичних струмів вказує на те, що відбувається пресинаптичне гальмування первинних аферентів через аксо-аксональні синапси, в той час як зменшення інтегралу струму після завершення моно/полісинаптичного компоненту ЗПСС демонструє суттєве достовірне пригнічення мережевої активності нейронів десятої пластинки. Те що викликані моно- та полісинаптичних струми і викликана мережева активність модулюються по-різному кількістю стимуляцій ЗБК (Рис. 3.10, 3.11), свідчить що низхідні шляхи модулюють первинні аферентні входи та викликану мережеву активність за допомогою різних молекулярно-клітинних механізмів. Додатково ми також показали що саме активація ЗБК з патерном східним до ендогенної активності OFF клітин РВДМ (20 Гц, 8 сек) призводить до максимального інгібування первинних аферентних входів та локальних мереж у пластинці X.

3.1.4 Вплив стимуляції ЗБК на можливість генерації нейронами десятої пластинки потенціалів дії при стимуляції ДК

Суттєве достовірне інгібування входів первинних аферентів та мережевої активності в пластинці X низхідними шляхами ЗБК, що найбільш вірогідно опосередковується активністю OFF клітин РВММ, повинно змінювати можливість нейронів цієї зони спинного мозку генерувати ПД у відповідь на стимуляцію аферентних входів. Загалом незначна субпопуляція нейронів десятої пластинки, що складає 20-30% здатна генерувати ПД у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію ДК {Krotov et al. 2019}. Тому ми вирішили дослідити, чи може попередня стимуляція ЗБК призводити до блокування генерації потенціалів дії у цій субпопуляції. Стимуляція ДК в нейронах даної субпопуляції (150 μ A, 1 мсек), що перебували в режимі реєстрації «фіксація потенціалу» призводила, як у всіх інших нейронах пластинки X, до генерації ними вхідних струмів (Рис. 3.12). Попередня стимуляція ЗБК суттєво зменшувала інтеграл і амплітуду ЗПСС. При переключенні реєстрації в режим «фіксація потенціалу» при $\sim$ -60 мВ, наступні стимуляції ДК призводили до генерації

нейроном ПД у 8 з 10 стимуляцій. В разі попередньої стимуляції ЗБК збуджувальний постсинаптичний потенціал зменшувався і не досягав порогу активації ПД у 10 з 10 випадків ($p < 0,001$, Fisher's exact test). Після припинення попередньої стимуляції ЗБК, генерація ПД у відповідь на стимуляцію ДК відновлювалася.

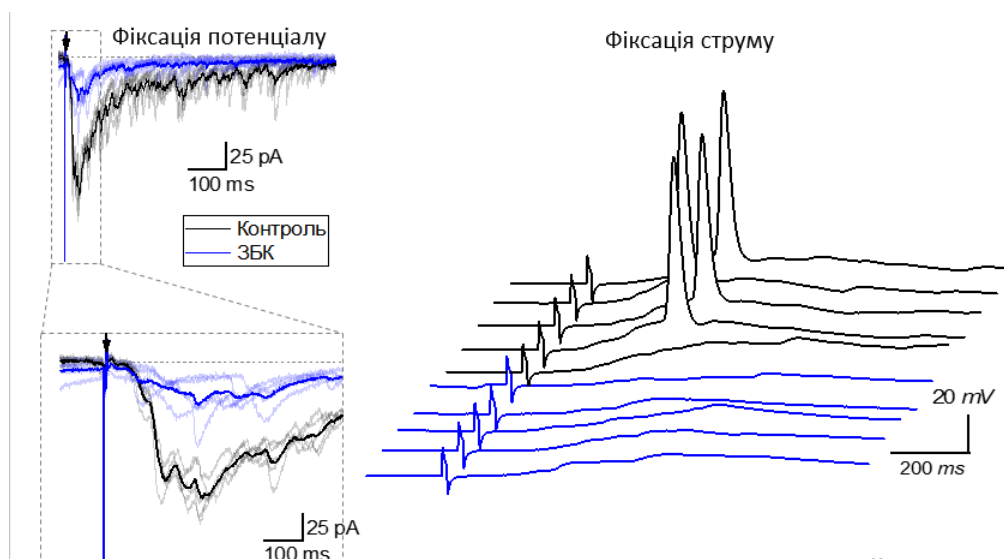


Рис. 3.12. Стимуляція низхідних волокон (20 Гц, 8 сек, 0,1 Гц) здатна повністю пригнічувати генерацію ПД у нейронах пластинки X. **А.** Індивідуальні (показані блідим кольором) та усереднені (показані товщими лініями) записи ЗПСС, викликаних стимуляцією задніх корінців у контролі (чорний) та після 8 с 20 Гц стимуляції ЗБК (синій). **В.** Індивідуальні записи в режимі фіксації струму з тієї ж клітини показали блокування викликаних потенціалів дії, спричинене низхідним кондиціонуванням внаслідок активації ЗБК. Контроль (чорні криві) та попередня стимуляція ЗБК (сині криві). Аналогічні результати щодо інгібування ПД викликаних стимуляцією дорзального корінця низхідною стимуляцією (20 Гц, 8 сек) були отримані для всіх досліджених нейронів десятої пластинки, що генерували ПД ($n=3$).

Таким чином, нами було показано, що стимуляція ЗБК здатна повністю блокувати генерацію ПД нейронами десятої пластинки у відповідь на сильну ноцицептивну стимуляцію первинних аферентів.

3.1.5 Часові аспекти низхідної модуляції

Під час проведення дослідів по впливу попередньої стимуляції ЗБК (20 Гц, 8 сек) на ЗПСС викликані стимуляцією ДК, було помічено, що перша кондиціонуюча стимуляція ЗБК призводила до майже повного інгібування ЗПСС; однак вплив подальших стимуляцій ЗБК на ЗПСС, що проводилися кожні 10 секунд, поступово зменшувався. Більш того, незалежно від того чи продовжувалася стимуляція ДК, довга (200 сек: 20 повторень стимуляцій 20 Гц, 8сек при частоті 0,1 Гц) активація ЗБК призводило до майже повної втрати низхідного інгібування ЗПСС, що викликані стимуляцією ДК і відновлення величини інтегралу ЗПСС (Рис. 3.13).

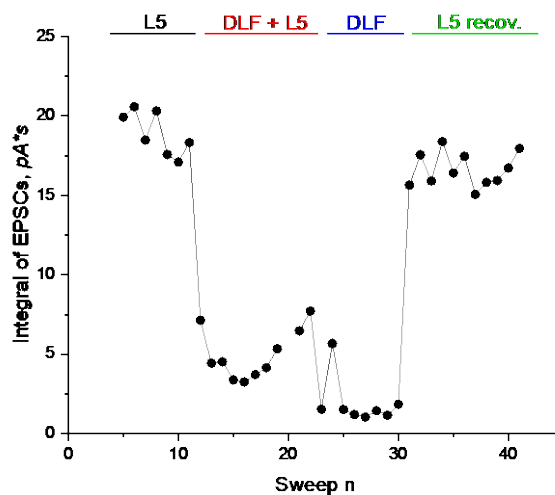


Рис. 3.13. Динаміка зміни інтегралу ЗПСС впродовж дослідів. Кожна точка це інтеграл ЗПСС підрахований для кожного струму викликаного стимуляцією ДК кожні 10 сек. L5 – контрольні реєстрації ЗПСС на стимуляцію корінця L5 (150 μ A, 1 мсек); DLF+L5 – реєстрації ЗПСС при попередній стимуляції ЗБК (20 Гц, 8сек); DLF – реєстрації ЗПСС після стимуляцій ЗБК (20 Гц, 8сек) без стимуляції ДК; L5 ресов. - реєстрації ЗПСС на стимуляцію корінця L5 (150 μ A, 1 мсек). Видно поступове відновлення ЗПСС незважаючи на продовження стимуляцій ЗБК (sweep 22). Також видно майже повне відновлення ЗПСС незважаючи на продовження стимуляцій ЗБК (sweep 31). Аналогічний результат було отримано для всіх 5 нейронів, що досліджувалися з використанням даного протоколу.

Таким чином, вплив інтенсивної та тривалої стимуляції ЗБК на нейрони пластинки Х був тимчасовим і поступово зменшувався протягом 50-200 сек. Це, найімовірніше, пов'язано з виснаженням пулу готових до виділення везикул на терміналях низхідних аксонів, залучених у пресинаптичний контроль аферентного входу до нейронів пластинки Х та їх мережевої активності, оскільки індуковані стимуляцією ЗБК постсинаптичні струми, що реєструвалися у частини досліджених нейронів, зникали з такою ж часовою динамікою (дані не приведені). Викликане стимуляцією ЗБК інгібування розвивалося прогресивно і тривало 10-100 с після припинення останньої стимуляції, що означає поступове накопичення та об'ємну дифузію нейромедіаторів. У сукупності наші результати свідчать про потужний, та, ймовірно, волюметричний пресинаптичний контроль первинних аферентів і локальної мережі в пластинці Х поперекового відділу спинного мозку від низхідних проекцій у складі ЗБК.

3.1.6 Дослідження TRPV1-активованих синаптичних входів до нейронів пластинки Х

Нейрони десятої пластинки спинного мозку, як інтегративного центру, отримують велику кількість різноманітних синаптичних входів, зокрема, від соматичних і вісцеральних сенсорних систем (Todd, 2010). Розуміння того як TRPV1 модулюють нейрональну активність у цій ділянці, може мати вирішальне значення для розробки таргетованої терапії болю. Адже, TRPV1-рецептори переважно знаходяться в ноцицептивних нейронах периферичної нервової системи, і є першою ланкою ноцицептивної термочутливості (Eversaerts et al., 2011). Активація TRPV1 у периферичних частинах первинних сенсорних нейронів викликає деполяризацію їх мембрани, що може призвести до виникнення потенціалу дії (ПД). Далі по первинних аферентах цей сигнал передається до центральної нервової системи, забезпечуючи сприйняття болю, пов'язаного з підвищенням температури.

Також ряд досліджень показали, що цей тип рецепторів виявлений у інших тканинах центральної нервової системи, де вони беруть участь у передачі

та модулюванні ноцицептивних сигналів (Cui et al., 2006; Everaerts et al., 2011). Тому нами було виконано серію дослідів з метою вивчення впливу активації TRPV1 на синаптичну активність нейронів пластинки X спинного мозку, а також визначення ролі глутаматних рецепторів у підтримці капсаїцин-індукованої активності. Для цього проводили тривалі (близько 30хв) patch-clamp реєстрації в режимі фіксації потенціалу з нейронів пластинки X в конфігурації «ціла клітина» (рис. 3.14).

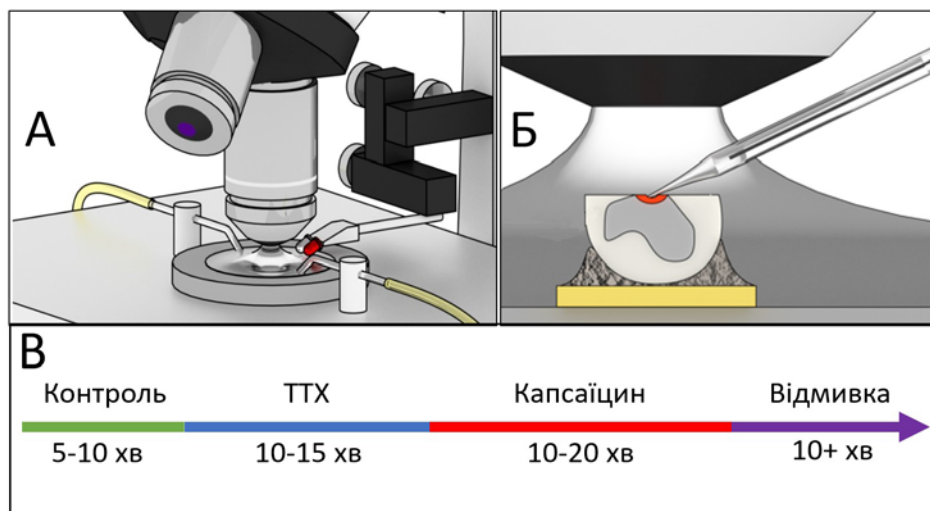


Рис. 3.14. Схема експерименту з вивчення впливу активації TRPV1 на синаптичні входи до нейронів пластинки X. А) схематичне зображення установки: камера з *ex-vivo* препаратом цілої половини спинного мозку щура, бічне світлодіодне освітлення, мікроскоп; Б) вигляд збоку: прикріплений до металевої пластини препарат, з позначеною пластинкою X (червоний) та петч-піпеткою; В) Часовий протокол реєстрації – послідовність додавання речовин.

Записи проводились за відсутності будь-якої електричної стимуляції, тобто, записували спонтанну синаптичну активність, присутню у препараті. Кожні декілька хвилин запис переривали, щоб перевірити стабільність опору доступу та пасивних параметрів мембрани – її власний опір та ємність. До подальшого аналізу брали лише ті дані, у яких ці параметри для однієї клітини змінювались не більше, ніж на 25% впродовж експерименту. Записи проводились при підтримуваному потенціалі клітинної мембрани у -70 мВ, що близько до

природньо підтримуваного потенціалу спокою у нейронах. При цьому на реєстрації спостерігали спонтанні збуджувальні постсинаптичні струми (рис. 3.15).

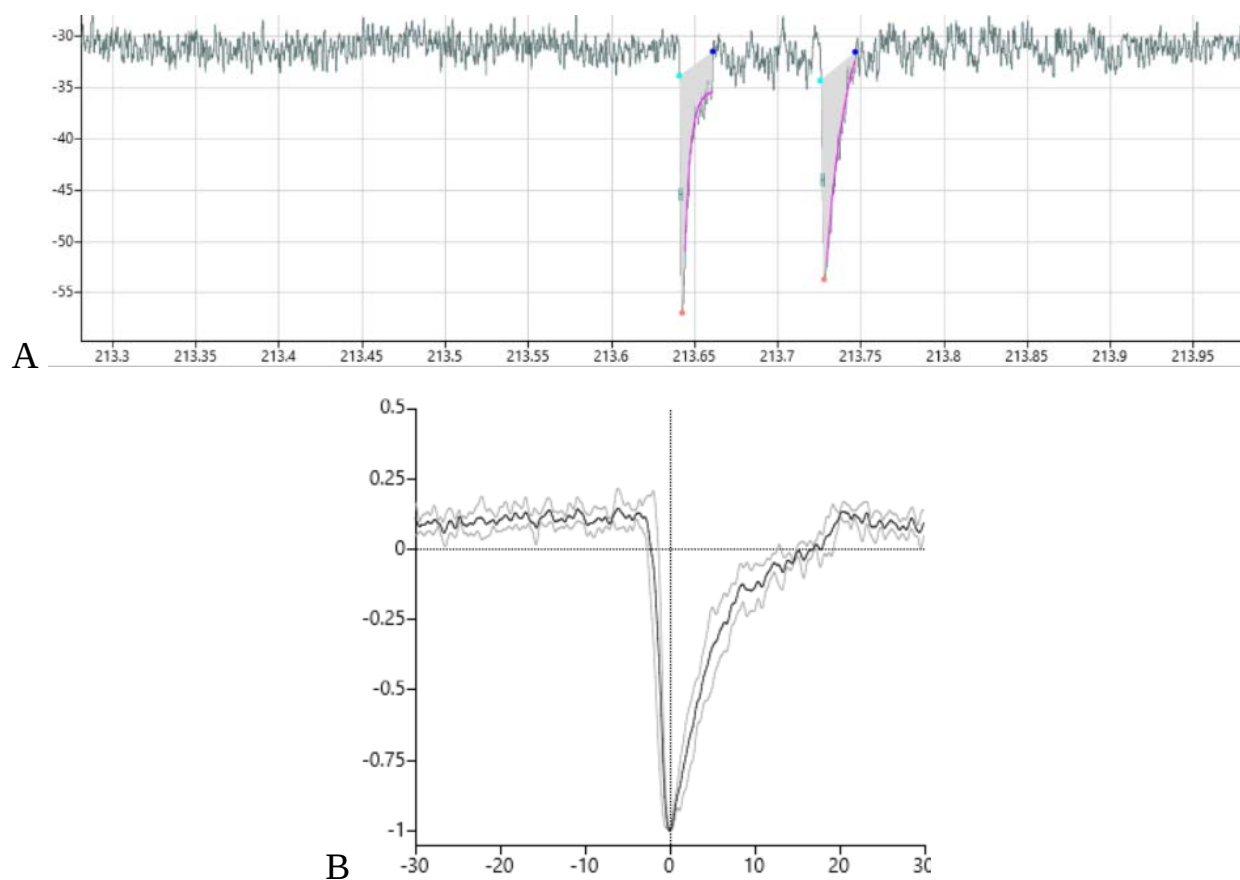


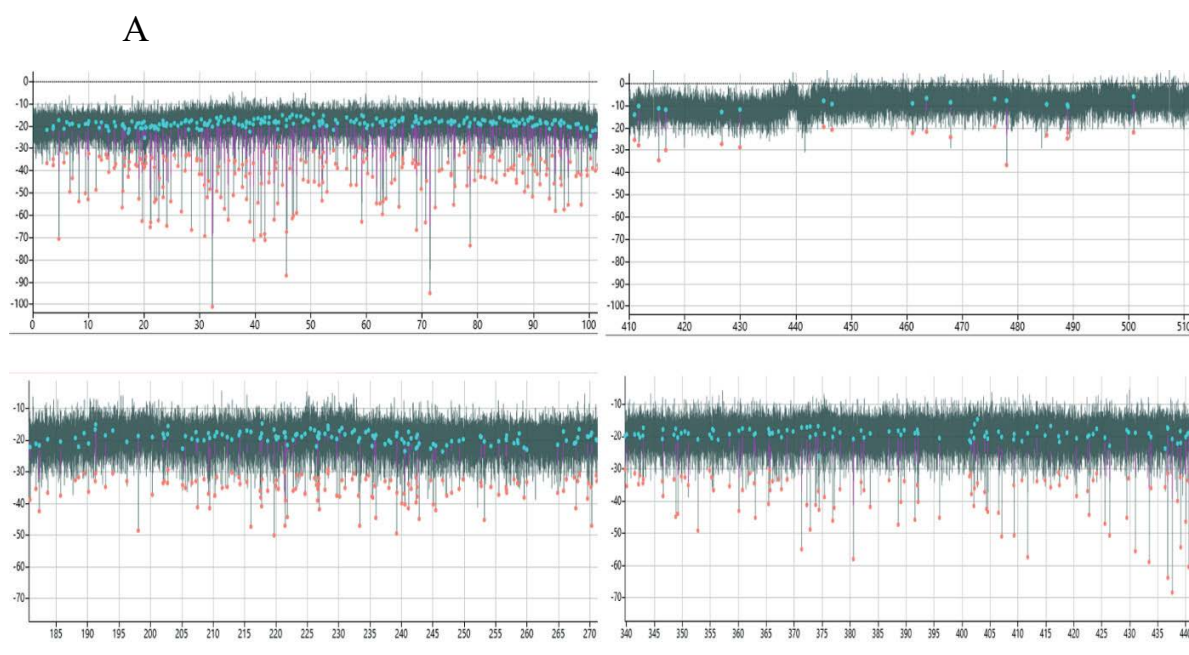
Рис. 3.15. Мініатюрні збуджувальні постсинаптичні події в нейронах пластинки X, ідентифіковані за допомогою програми NeuroExpress. Зображення взяті з інтерфейсу програми. А) фрагмент запису з двома ідентифікованими подіями, позначено автоматично визначені точки початку, пікового значення та закінчення синаптичної події, а також її площу (сірий) та підігнану під точки експоненційну криву спаду (пурпурний); В) приклад типових збуджувальних постсинаптичних подій, віднормованих за амплітудою.

Спочатку робили контрольний запис спонтанної активності, тривалістю мінімум 10 хв. Це потрібно в першу чергу для того, щоб переконатися, що клітина здатна стабільно тримати контакт з піпеткою впродовж реєстрації. Далі до розчину додавали тетродотоксин (TTX) у концентрації 500 нМ. TTX є блокатором потенціал-керованих йонних каналів, тому його прикладання

запобігає поширенню потенціалів дії (Lee & Ruben, 2008). Таким чином, ми зупиняємо спонтанну синаптичну активність, спричинену потенціалами дії, і залишаються лише мініатюрні синаптичні події. Оскільки нас цікавила саме мініатюрна активність, весь подальший запис проводився в присутності ТТХ.

В присутності ТТХ записували мініатюрну активність до прикладання капсаїцину – специфічного агоніста TRPV1 рецепторів. Після такого, контрольного запису мініатюрної активності в розчин додавали капсаїцин до фінальної концентрації 1мкМ. Запис вели протягом 10-20хв після додавання капсаїцину. Потім не менше десяти хвилин проводили відмивку, перемикаючи подачу перфузії на розчин без капсаїцину (але, так само з ТТХ у концентрації 500 нМ). Загалом послідовність додавання речовин зображена на рисунку 3.14.В.

Для візуалізації та статистичного аналізу даних мініатюрної активності було розроблено напівавтоматизований скрипт, написаний мовою програмування R. Для його написання використані пакети: tidyverse, readxl, plotly, PerformanceAnalytics, knitr, DT, heatmaply, ggmosaic. Дані спонтанних мініатюрних подій отримувались з програм MinyAnalysis або NeuroExpress. Програма включає в себе дві функції для імпорту даних: з excel таблиці, згенерованої у NeuroExpress та .csv файлу, отриманого з MinyAnalysis. Після імпорту дані з обох програм приводились до однакового вигляду. Також програма може обробляти багато послідовних файлів, для цього написано функцію, яка добавляє до часу кожної події з одного файлу введену користувачем різницю у часі реєстрації, порівняно з початком першого запису. Після цього, референсні дані часу кожної події з усіх файлів знаходяться в однаковій системі відліку, тому їх можна об'єднати у великий датафрейм (рис. 3.16).



Б

	TimeRef	Ref	IEI	Amp	Area	DecayTay	Group
1	2.3237	-22.17850494384766	0.8143999999999998	13.67673873901367	43.5689811706543	2.713677167892456	control
2	3.4599	-21.37518501281738	1.1365	11.16365242004395	29.13771629333496	2.191904544830322	control
3	3.4778	-21.86324882507324	0.017200000000000033	12.11448097229004	21.83245849609375	3.275990009307861	control
4	3.6356	-20.10051918029785	0.16179999999999999	6.973184585571289	20.68421936035156		control
5	4.476599999999999	-24.85657691955566	0.8370999999999995	45.15876770019531	131.3295288085938	2.66137170791626	control
6	4.706399999999999	-21.70075225830078	0.23030000000000006	8.295242309570312	44.39445495605469		control
7	5.3937	-21.4649600982666	0.6900999999999993	12.80332374572754	36.13494873046875	2.074587106704712	control
8	5.890899999999999	-20.64710807800293	0.49450000000000004	10.21107292175293	38.80951690673828	6.050901889801025	control
9	6.4513	-24.62774658203125	0.5598000000000001	23.70567321777344	115.621826171875		control
10	6.909699999999999	-23.15809440612793	0.4592000000000001	19.24289894104004	50.06795883178711	2.213096380233765	control

Showing 1 to 10 of 5,955 entries

Previous 1 2 3 4 5 ... 596 Next

Рис. 3.16. А) Приклад електрофізіологічних реєстрацій спонтанної та мініатюрної синаптичної активності в нейронах пластинки Х з ідентифікованими збуджувальними постсинаптичними подіями: спонтанна синаптична активність в контролі; мініатюрна синаптична активність (після прикладання 500 нМ ТТХ); мініатюрна синаптична активність під дією 1 мкМ капсаїцину; мініатюрна синаптична активність при відмивці від капсаїцину. Б) Приклад даних мініатюрної синаптичної активності в інтерактивній таблиці, згенерованій скриптом.

Далі для подальшого аналізу програма використовувала наступні параметри: референтне значення часу події, відстань у часі до попередньої події (inter-event interval), амплітуда струму, площа під кривою, константи наростання та спаду. Більшість параметрів, окрім часу, сильно скорельовані між собою, тому такий простір параметрів є дещо надлишковим і під час аналізу результатів слід використовувати лише ті із них, якій найбільш релевантні для завдань дослідження. Проте, програма лише дає можливість для такого вибору, адже робить можливою візуалізацію для будь-якого з них.

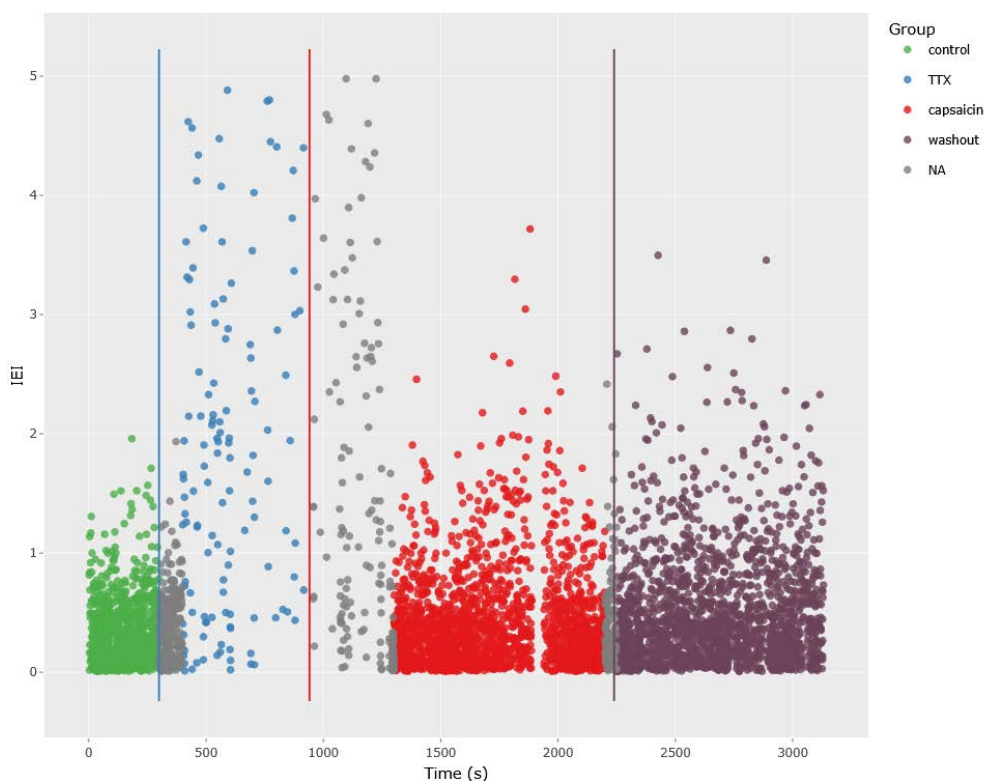


Рис 3.17. Розподіл інтервалів між подіями в часі. Точками відзначено кожне окреме значення. Зелений – контрольна реєстрація до прикладання, синій – після додавання ТТХ, червоний – під дією капсаїцину, фіолетовий – відмивка.

Перш за все, програма візуалізує значення обраного параметру для кожної події впродовж часу реєстрації (рис. 3.17). За наведеним графіком можна судити про зміну частоти подій у часі впродовж експерименту. Написаний скрипт здатний будувати аналогічні графіки за кожним з параметрів подій – амплітуда, площа події, константи наростання та спаду. Усі побудовані графіки є

інтерактивними, їх можна наближати, змінювати масштаб по кожній із осей, виводити події лише вибірково в залежності від розділення по групах та зберігати у вигляді .png.

Таке представлення дозволяє зразу на око оцінити масштаб і характер змін обраного параметру у часі, проте, воно має суттєвий недолік. Коли точок подій занадто багато, вони зливаються і стає важко наочно побачити їх кількість та значення. Тому, в скрипті також передбачена опція побудови аналогічних рисунків, але з усередненими значеннями параметру для коротких відрізків у часі (бінування по часу) (рис. 3.18).

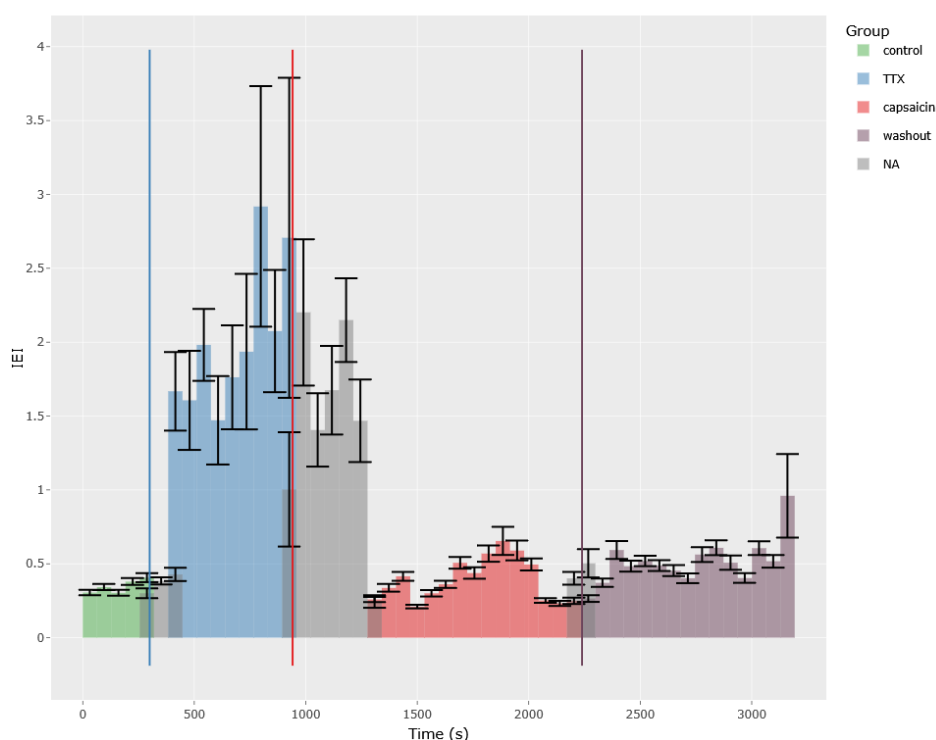


Рис 3.18. Зміни середніх інтервалів між подіями в часі. Зелений – контрольна реєстрація до прикладання, синій – після додавання ТТХ, червоний – під дією капсаїцину, фіолетовий – відмивка.

Іноді буває важливо порівняти, як змінюються в часі одразу два параметри, або оцінити, чи існують якісь зв'язки між різними параметрами подій, їх поділ на групи, тощо. Для такого експлоративного аналізу у програмі передбачена побудова інтерактивних 3Д графіків, де кожна подія відображена як точка в трьохвимірному просторі параметрів (рис. 3.19).

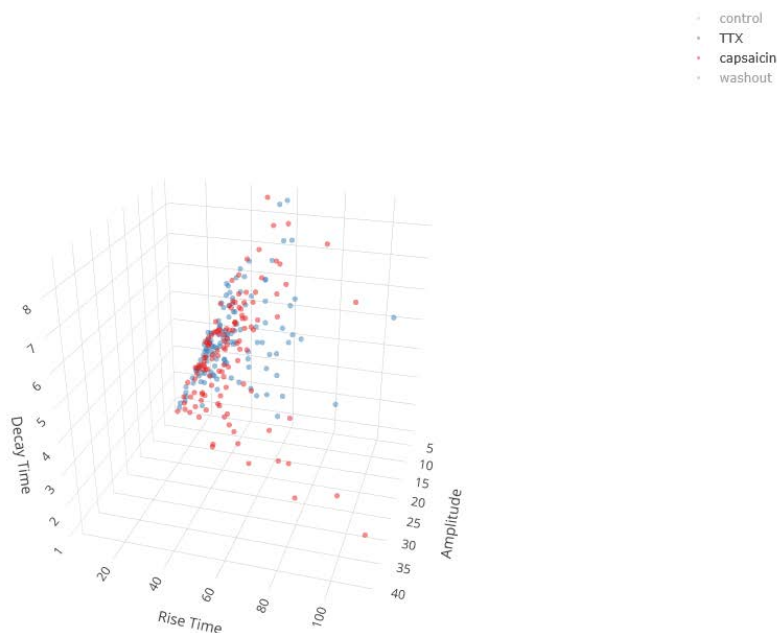


Рис. 3.19. Інтерактивна візуалізація окремих подій в трьохвимірному просторі параметрів.

Наступні частини скрипту присвячені порівняльному аналізу між групами подій та перевірці гіпотез.

Для порівняння груп у програмі використано два способи візуалізації – графік-«скрипка» (violin plot) (рис. 3.20) та кумулятивні розподіли (рис. 3.21). Скрипковий графік більш наочний та зручний для розуміння, адже він візуалізує форму розподілу значень параметру у кожній групі. Натомість, кумулятивні розподіли дозволяють швидко оцінити, наскільки сильно відмінні між собою кожна з груп. Особливо зручно використовувати кумулятивні розподіли, коли потрібно порівняти одразу багато груп. Проте, з такого графіка важко зразу оцінити розподіл обраного параметру, адже на ньому по осі ординат показана частка усіх подій, у яких параметр має значення, менше за значення абсциси.

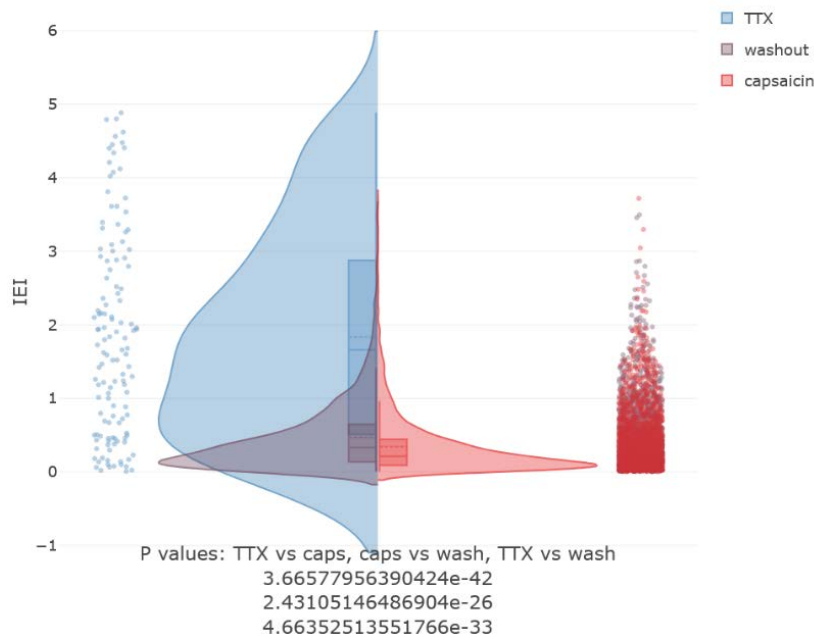


Рис 3.20. Порівняння груп – скрипковий графік. Розподіли інтервалів між постсинаптичними подіями в групах: синій – після прикладання ТХ, червоний – під дією капсаїцину, пурпурний – після відмивки.

Нарешті, для статистичного порівняння параметрів між групами подій програма виконує стандартні тести. Оскільки, у наших даних розподіли кожного з параметрів достовірно відрізнялись від нормальних, було застосовано непараметричний тест Манна-Уїтні.

Усі отримані у програмі графіки виводяться у згенерований .html файл, що доступний для перегляду у браузері. Це дозволяє зручно працювати з даними на різних платформах та операційних системах. Для зручності, всі візуалізації структуровані за вкладками в залежності від типу представлення. Усі графіки є інтерактивними, і також в будь-якому вигляді їх можна окремо зберегти у .png зображення.

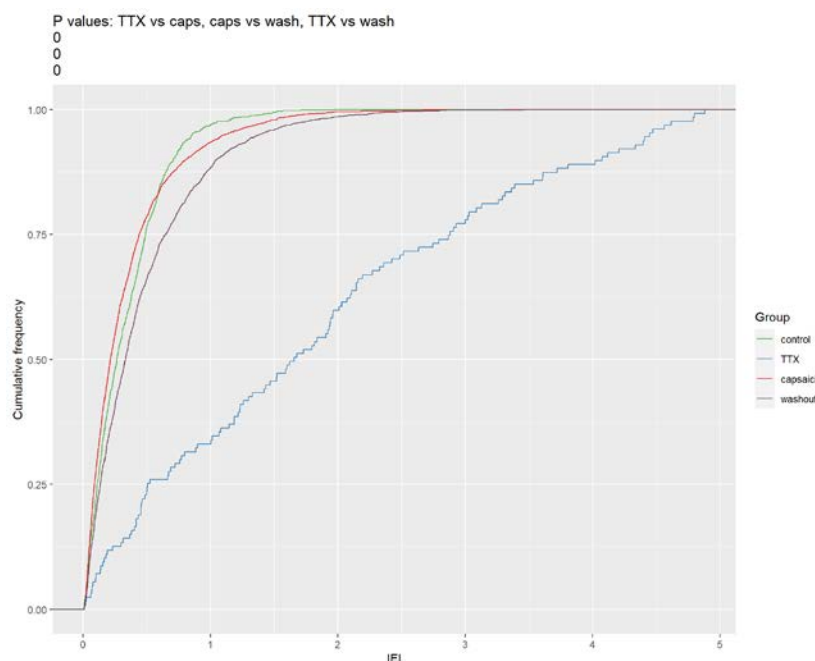


Рис. 3.21. Порівняння груп – кумулятивні розподіли. Зелений – до прикладання речовин, синій – після додавання ТТХ, червоний – під дією капсаїцину, фіолетовий – відмивка.

В результаті проведеного аналізу мініатюрної синаптичної активності у нейронах пластинки Х було показано, що активація TRPV1 рецепторів капсаїцином призводить до значного підвищення частоти мініатюрних збуджувальних постсинаптичних подій, а в окремих клітинах також спостерігається збільшення їх амплітуди. Такий результат можна пояснити активацією TRPV1-рецепторів на закінченнях ноцицептивних первинних аферентів, що спричиняє вхід кальцію в пресинаптичну терміналь і відповідно, збільшує ймовірність спонтанного викиду везикул нейромедіатора у синаптичну щілину. Ці дані підтверджують результати попередніх досліджень, що вказували на наявність прямих ноцицептивних входів до нейронів цієї зони (Krotov et al., 2019).

Проте, той факт, що в частині клітин при додаванні капсаїцину суттєве зростання спостерігалось не лише в частоті, а й у амплітудах мініатюрних постсинаптичних струмів, вказує на можливу залученість постсинаптичних механізмів – зміни у чутливості чи кількості AMPA рецепторів на

постсинаптичній мембрані. Це означає, що активація TRPV1 здатна не лише збільшувати ймовірність виникнення синаптичних подій, у зоні пластинки Х спинного мозку, а й суттєво посилювати їхню інтенсивність, що може бути важливим механізмом у розвитку центральної сенсibiliзації.

В результаті проведених досліджень щодо регуляції нейронів десятої пластинки низхідними шляхами в складі ЗБК нами були зроблені наступні висновки:

Активність низхідних шляхів у складі ЗБК, що нагадує патерни активності OFF клітин у РВДМ, здійснює повний пресинаптичний контроль над первинно-аферентними входами до нейронів пластинки Х.

Активність низхідних шляхів у складі ЗБК, що нагадує патерни активності OFF клітин у РВДМ, диференційно пресинаптично регулюють А- та С- входи від первинних аферентів на рівні окремих нейронів пластинки Х.

Активність низхідних шляхів у складі ЗБК, що нагадує патерни активності OFF клітин у РВДМ, здійснюють повний пресинаптичний контроль над збуджуючою активністю в локальних мережах нейронів пластинки Х.

Активність низхідних шляхів у складі ЗБК, що нагадує патерни активності OFF клітин у РВДМ, здійснює повний пресинаптичний контроль над можливістю нейронів пластинки Х генерувати ПД у відповідь на стимуляцію первинних аферентів.

Сильна та тривала активація низхідних шляхів спочатку призводить до майже повного блокування синаптичних сигналів до нейронів пластинки Х, а згодом до поступової втрати блоку, ймовірно, через виснаження везикул у пресинаптичних закінченнях низхідних волокон. Таким чином, ефективність низхідного контролю є компромісом між вивільненням нейромедіаторів та відновленням секреторних везикул.

Нейромедіатори низхідних шляхів вивільняються волюметрично та присутні у зовнішньоклітинному просторі у спинному мозку, регулюючи первинні входи та локальні мережі в Х пластинці. Під час тривалої активності

низхідних шляхів вони призводять до повільної поступової деполяризації первинних аферентів внаслідок активації пресинаптичних рецепторів цих аферентів. Саме ця деполяризація і призводить до довгого (десятки секунд) пресинаптичного гальмування ноцицептивних мереж десятої пластинки.

Результати, висвітлені у даній частині було опубліковано у статті (Koroid et al., 2024):

Koroid, K., Blashchak, I., & Romanenko, S. (2024). The role of TRPV1 and glutamate receptors in the synaptic activity of lamina X neurons of the rat spinal cord. *Fiziologičnij Žurnal*, 70(5), 49–55. <https://doi.org/10.15407/fz70.05.049>

Та представлено у тезах/виступах на конференціях:

I. Blashchak, S. V. Romanenko, O. Halaidych, K. Koroid, V. Krotov, B. V. Safronov, Y. M. Usachev, N. V. Voitenko, P. Belan, descending control of nociceptive processing in spinal lamina X, *SfN Neusoscience Meeting Planner*, 2024, Chicago, USA

Koroid K. V.; **Blaschak I. O.**; Romanenko S. V.; Belan P. V., Nociceptive signaling in lamina X neurons: impact of capsaicin and tetrodotoxin, *XVIII Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2024, Kyiv, Ukraine

К. В. Короїд , **І. О. Блащак** , С. В. Романенко , В. В. Кротов , К. С. Агашков , М. Є. Краснякова , П. В. Білан , Н. В. Войтенко, Сенсорна ноцицептивна активність в першій та десятій пластинці лямбарного відділу спинного мозку щурів в умовах норми та паталогії, *VII науково-практична конференція "Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція"*, 2024, Харків, Україна.

К. Короїд; **І. Блащак**; С. Романенко; П. Белан, Пластинка X: вплив капсаїцину та тетродотоксину, *XXIII Читання ім. В. В. Підвисоцького*, 2024, Одеса, Україна

Koroid K. V., Romanenko S. V., **Blashchak I. O.**, Belan P. V Functional diversity of lamina X neurons and their synaptic response to TRPV1 activation. *XIX Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2025, Kyiv, Ukraine

Blashchak I.O., Romanenko S.V., Halaidych O.V., Koroid K.V., Krotov V.V., Voitenko N.V. Belan P.V., Mechanisms of descending control of nociceptive networks in spinal lamina X. *XIX Ukrainian Conference of Young Scientists of IMBG of NAS of Ukraine*, 2025, Kyiv, Ukraine

3.2. Низхідний контроль ноцицептивної мережі в першій пластинці спинного мозку

3.2.1. Розробка методики для вивчення низхідної РВДМ-опосередкованої модуляції ноцицептивних мереж пластинки I дорсального рогу

Механізми низхідною модуляції залишається недостатньо вивченими, не в останню чергу, через ряд технічних труднощів у подібного роду дослідженнях. Спинномозкові та супраспинальні структури просторово розділені – навіть у мишей вони знаходяться на відстані кількох сантиметрів одна від одної – що ускладнює їх одночасне збереження для функціональних досліджень.

Для вирішення цієї проблеми було розроблено кілька різних підходів. Перший з них включає записи електричної активності спинномозкових нейронів, зареєстровані зовнішньоклітинними електродами, у поєднанні з електричною стимуляцією ділянок стовбура мозку (Fitzgerald & Koltzenburg, 1986). Хоча цей метод надає цінну інформацію про те, як низхідна регуляція впливає на генерацію потенціалів дії в спинномозкових нейронах, він не дає розуміння клітинних та синаптичних механізмів, що лежать в основі таких змін. Крім того, цей метод важко застосувати до пластинки I, оскільки це надзвичайно тонкий шар нейронів, що простягається лише приблизно на 30 мкм від поверхні дорсального рогу.

Другий підхід включає записи з використанням методу петч-клемп в препараті спинного мозку *ex vivo* у поєднанні з електричною стимуляцією різних

низхідних шляхів спинного мозку (Krotov et al., 2022). Саме його у цій роботі було використано для дослідження низхідної регуляції пластинки X спинного мозку (розділ 3.1). Хоча цей метод добре підходить для дослідження синаптичних та клітинних механізмів, головним його недоліком є той факт, що з його допомогою практично неможливо розрізнити вплив окремих супраспінальних структур, оскільки їхні волокна здебільшого спускаються в межах одного дорзолатерального канатика. Нарешті, третій підхід спирається на оптогенетику, тобто вірусно-опосередковану експресію світлочутливого білка ChR2 в аксонах і закінченнях низхідних волокон (François et al., 2017). Поєднання записів з використанням методу петч-клемп з поверхневих нейронів дорсального рогу з селективною, індукованою фотостимуляцією активацією низхідних волокон, що походять з одного супраспінального джерела, пропонує унікальну можливість визначити, як певні структури мозку здійснюють низхідний контроль. Однак цей метод вимагає розрізання спинного мозку, що пошкоджує пластинку I та порушує первинний аферентний вхід, що є великим недоліком, оскільки відомо, що низхідні волокна модулюють синаптичну передачу між первинними ноцицепторами та спинномозковими нейронами через пресинаптичні механізми.

Для вирішення цих проблем було розроблено методику, що поєднує петч-клемп записи з нейронів пластинки I інтактного препарату спинного мозку *ex vivo* з оптогенетичною стимуляцією низхідних волокон, що специфічно походять від ростровентромедіального довгастого мозку (РВДМ), ключової області стовбура мозку, що опосередковує низхідний контроль. Загальну схему розробленого протоколу наведено на рисунку 3.22.

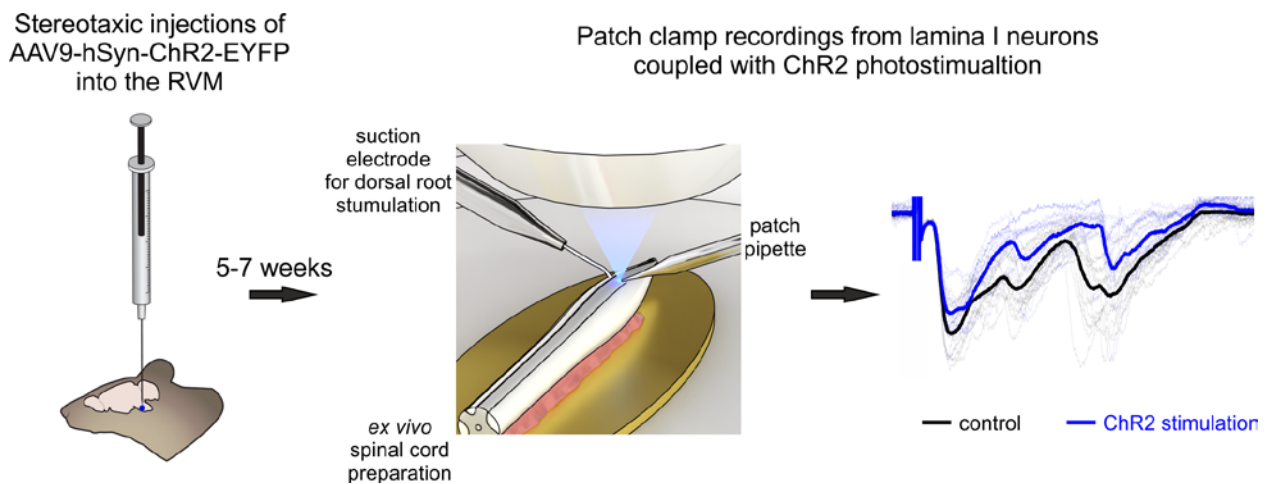


Рис. 3.22. Загальна схема розробленої методики: стереотаксична інєкція вірусного оптогенетичного конструкту в РВДМ, виділення *ex-vivo* препарату цілого спинного мозку миші, петч-клемп реєстрації викликаної активності з нейронів пластинки I лумбарного відділу спинного мозку

Основними перевагами запропонованої процедури є: 1) селективна активація волокон РВДМ; 2) збереження дендритної та аксональної арборизації нейронів пластинки I; та 3) збереження всієї ростокаудальної та медіолатеральної архітектури спинного мозку, включаючи всі первинно аферентні входи та розгалуження аксонів від РВДМ, що важливо для вивчення як пре-, так і постсинаптичних механізмів низхідної регуляції. В порівнянні з іншими методами, в яких використовують зрізи, препарат спинного мозку *ex vivo* є швидшим та надійнішим: препарат готовий протягом 30-40 хвилин після декапітації, не потребує додаткової інкубації та може використовуватися в експерименті до 6-8 годин. Крім того, візуалізація клітин виконується за допомогою бічного інфрачервоного світлодіодного освітлення (Safronov et al., 2007; Szűcs et al., 2009), яке не потребує складного обладнання для диференціального інтерференційного контрастування.

Розроблена методика добре підходить для дослідження низхідної модуляції, залежної від РВДМ, як за фізіологічних, так і за патологічних больових умов. Її також можна легко адаптувати для вивчення низхідного контролю, опосередкованого іншими супраспінальними структурами, такими як

дорзальне ретикулярне ядро та парабрахіальні ядра. Електрофізіологічні записи, отримані за такою методикою, можуть поєднуватися з фармакологічними дослідженнями, а також з одночасними вимірюваннями Ca^{2+} транзентів з використанням мембранно-непроникних або генетично-кодованих індикаторів Ca^{2+} .

Оскільки протокол використовує мишей як модельний організм, він сумісний з широким спектром трансгенних ліній, що забезпечує гнучкий дизайн експериментів. Зокрема, тварини, які експресують зелений флуоресцентний білок (GFP) у глутаматергічних, ГАМКергічних або гліцинергічних нейронах, можуть допомогти з'ясувати механізми низхідної модуляції в різних популяціях спинномозкових нейронів. Нарешті, ретроградне мічення нейронів проєкційної пластинки I може дати цінне розуміння того, як супраспінальні структури впливають на передачу ноцицептивних сигналів до вищих центрів мозку.

3.2.2. Експресія AAV9-hSyn-EGFP конструкту після ін'єкції в РВДМ

Для відпрацювання Першого етапу методики – стереотаксичної ін'єкції генетичного конструкту в зону РВДМ головного мозку мишей було використано маркерний конструкт AAV9-hSyn-EGFP. Він кодує лише зелений флуоресцентний білок, але не світлочутливі канали. Конструкт побуваний на основі адено-асоційованого вірусу дев'ятого серотипу, що забезпечує ефективну трансдукцію нейронів та подальшу експресію в них цільового білка (Dayton et al., 2012).

Щоб охарактеризувати просторово-часовий патерн експресії, ми ввели 50 нл AAV9-hSyn-EGFP у росто-вентромедіальну зону довгастого мозку. Через п'ять-сім тижнів головний та спинний мозки були фіксовані, зрізані та досліджені за допомогою лазерного конфокального мікроскопа.

Флуоресценція GFP була виявлена як у РВДМ (рис. 3.23), так і в спинному мозку (Рис. 3.24).

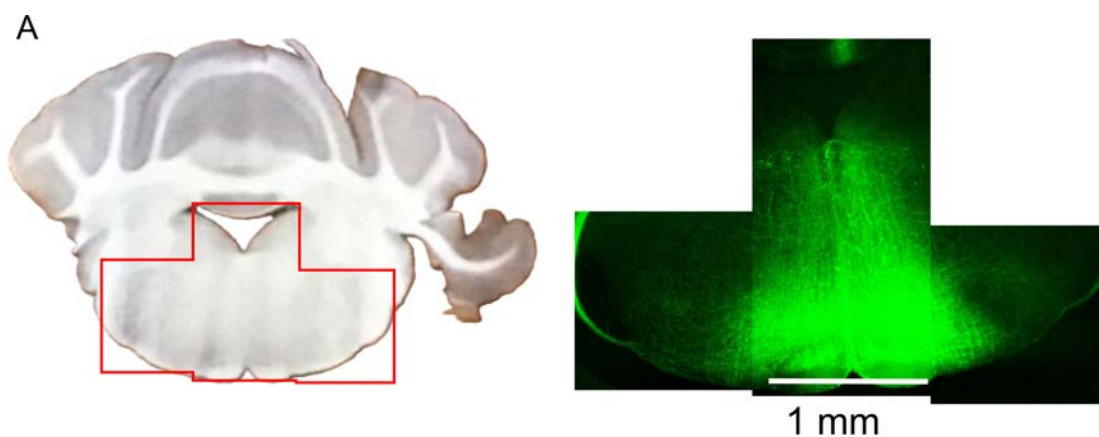


Рис. 3.23. Експресія GFP конструкту в головному мозку Патерни експресії EGFP після стереотаксичної ін'єкції відповідної вірусної конструкції в RVM. А. Вигляд коронарного зрізу головного мозку миші та експресія у ньому GFP в місці ін'єкції, яке відповідає розташуванню РВДМ.

У спинному мозку найсильніший сигнал GFP спостерігався в дорзолатеральному канатикулі, де, як і очікувалось, проходять низхідні волокна від РВДМ (рис. 3.24. А).

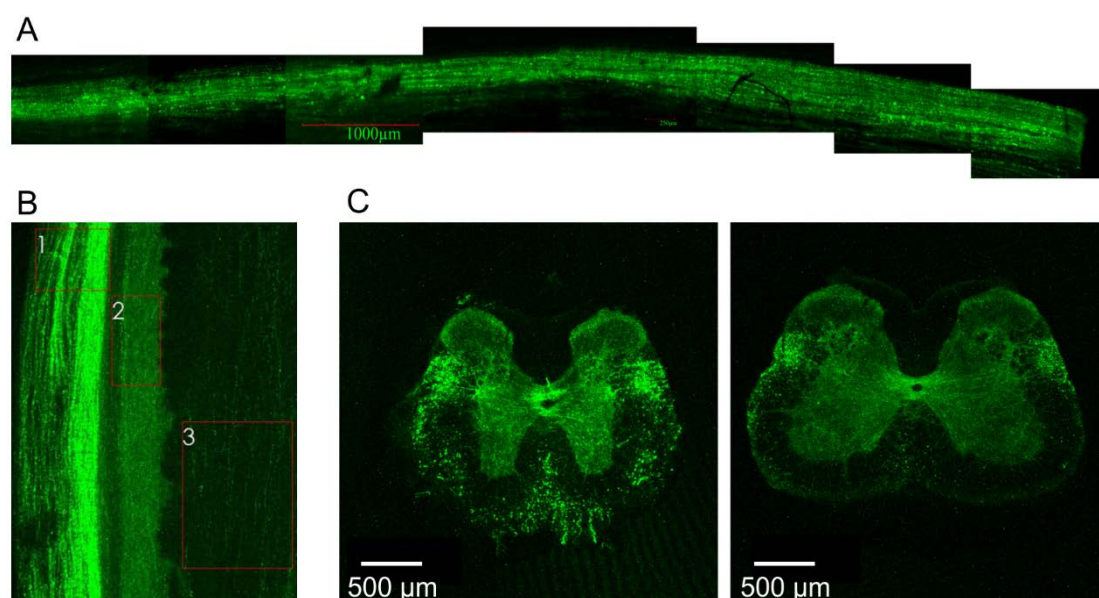


Рис. 3.24. Патерн експресії GFP у спинному мозку після стереотаксичної ін'єкції відповідної вірусної конструкції в РВДМ. А. Флуоресцентний сигнал EGFP від дорзолатерального канатика спинного мозку. В-С. Патерн експресії EGFP у спинному мозку. В. Бічний вигляд спинного мозку. 1 – дорзолатеральний

канатик, 2 – пластинка I, 3 – дорзальний стовпчик. С. Корональні зрізи, що показують флуоресценцію EGFP у грудному (лівому) та поперековому (правому) сегментах. Зверніть увагу, що найвища інтенсивність сигналу EGFP спостерігається для дорзолатерального канатика, поверхневого дорзального рогу (пластинка I-II) та області навколо центрального каналу (пластинка X).

У сірій речовині спинного мозку найвища інтенсивність сигналу була виявлена в поверхневому дорзальному розі (пластинки I–II) та навколо центрального каналу (пластинка X) – ділянках, що беруть участь в обробці ноцицептивної інформації. Хоча висока інтенсивність флуоресценції у зоні пластинки X може бути пов'язана з високою густиною волокон, які здійснюють комісуральний перехід. Але, зважаючи на дані (Krotov et al., 2019), а також результати, викладені в попередньому розділі, слід очікувати і функціональну активність низідних волокон від РВДМ, що знаходяться у цій зоні.

Експресія GFP залишалася постійною між 5 та 7 тижнями після стереотаксичної ін'єкції, без суттєвих відмінностей в інтенсивності сигналу. Ні стать експериментальних мишей, ні збільшення об'єму ін'єкції до 100 нл чи 150 нл в порівнянні з початковими 50 нл не мали значного впливу на експресію GFP (Kosiak, 2020).

3.2.3. Експресія AAV9-ChR2-YFP конструкту після ін'єкції в РВДМ

Після відпрацювання стереотаксичних ін'єкцій, для наступних дослідів використовували уже AAV9-ChR2-YFP конструкт, що кодує світлочутливий білок каналродопсин-2 (ChR2). У цьому варіанті він експресується зшитий разом з жовтним флуоресцентним білком-міткою, що дозволяє верифікувати експресію методами флуоресцентної мікроскопії.

Патерн експресії ChR2-EYFP на 4-8 тижнів після стереотаксичної ін'єкції відповідного вірусного конструкту в РВДМ був дуже схожим на аналогічний паттерн експресії GFP (рис. 3.24). Так, спостерігалась значна експресія флуоресцентного маркера YFP у задньобічному канатику (ЗБК), та

сірій речовині спинного мозку мишей. Зокрема, інтенсивна флуоресценція спостерігалась у пластинках I та X, нейрони яких беруть участь у обробці больової інформації (Krotov et al., 2019) (Allard, 2019). У тілах спинномозкових нейронів флуоресценція не спостерігалась, що вказує на відсутність транссинаптичної передачі вірусного конструкту.

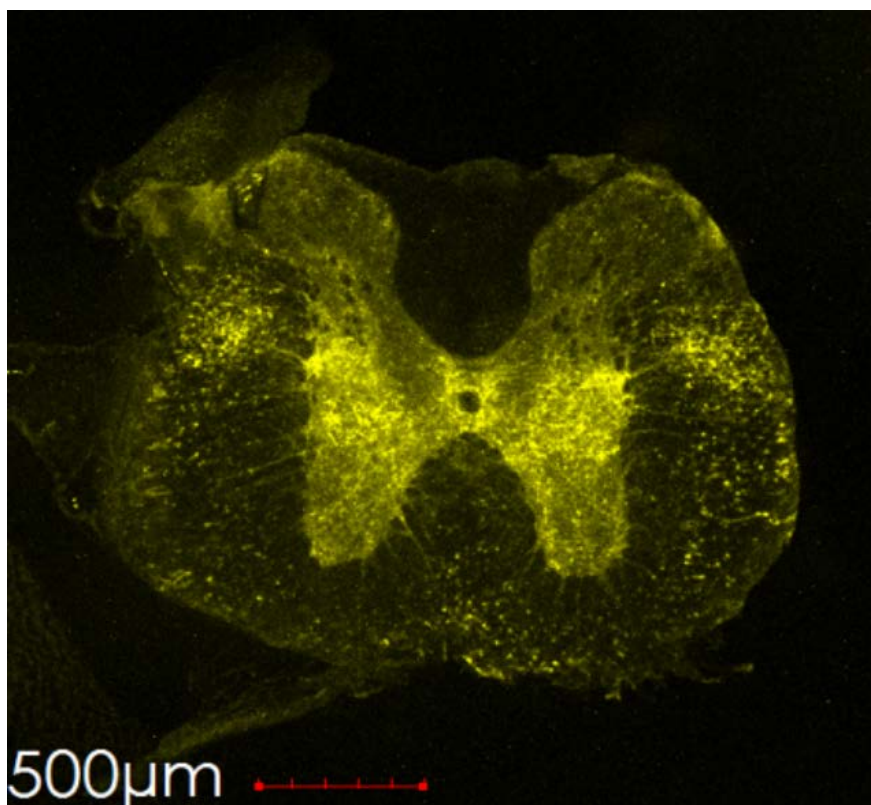


Рисунок 3.25. Флуоресценція жовтого флуоресцентного білка (YFP) у спинному мозку миші, ін'єктованої AAV9-ChR2-YFP в РВДМ. Коронарний вигляд.

За великого збільшення у поверхневому шарі дорзального рогу спостерігали густу мережу ChR2-EYFP-експресуючих аксонів з численними розширеннями, найімовірніше, пресинаптичними сайтами типу en passant boutons (рис. 3.26, рис. 3.27). Останні свідчать про імовірні численні синаптичні зв'язки між низхідними аксонами нейронів РВДМ та спинномозковими нейронами дорзального рогу. На користь цього вказує також той факт, що потовщення часто спостерігали в безпосередній близькості до силуетів сом нейронів поверхневого дорзального рогу сірої речовини спинного мозку.

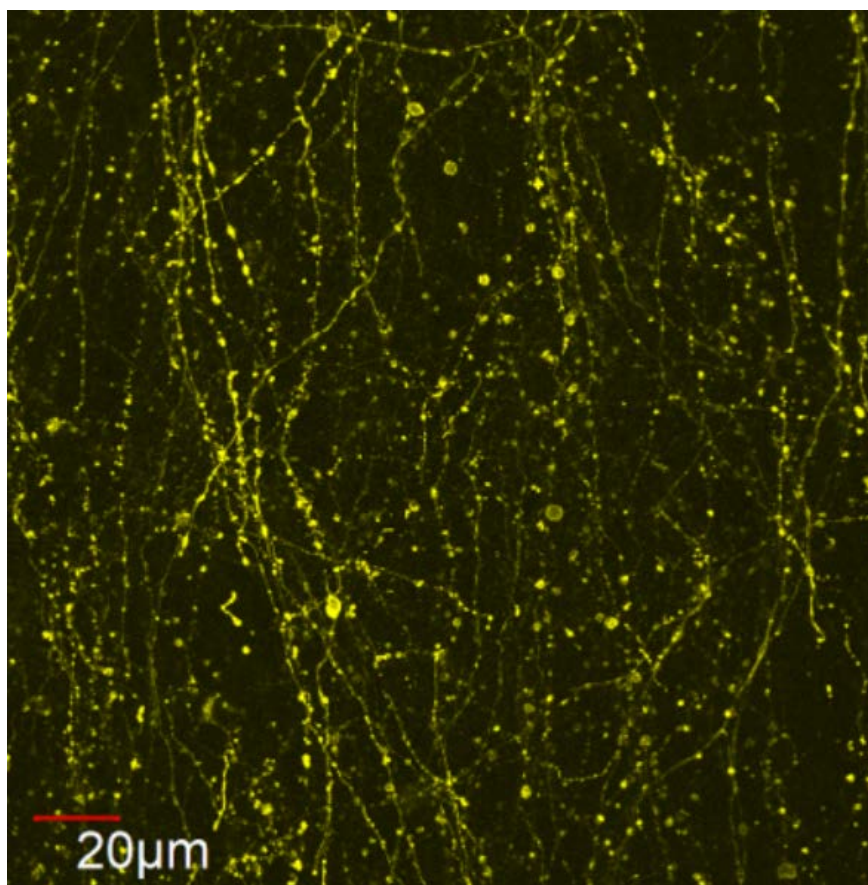


Рис. 3.26. YFP-позитивні аксони у пластинці I спинному мозку миші, ін'єксованої AAV9-ChR2-YFP в РВДМ

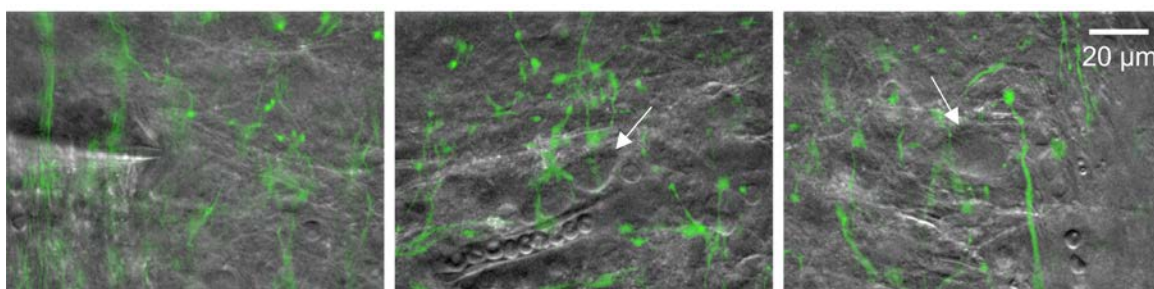


Рис. 3.27. Зображення поверхні дорзального рогу під бічним освітленням інфрачервоним світлодіодом (сірий), накладені на епіфлуоресцентні зображення ChR2-EYFP (зелений), що показують низхідні волокна, що походять з RVM, та en passant потовщення на них. Білі стрілки вказують на соми нейронів пластинки I. На лівому зображенні показано запетчений нейрон.

Слід відзначити, що методика дозволяє поєднувати флуоресцентну мікроскопію разом з електрофізіологічними реєстраціями, одночасно, на живому

зразку (рис. 3.27), або після фіксації використаного для реєстрацій *ex-vivo* препарату. Представлені зображення отримані з препаратів, які до цього брали участь в електрофізіологічних експериментах. Це дозволяє суттєво скоротити кількість використаних для експериментів тварин, як і час, необхідний для відпрацювання та верифікації методики.

3.2.4 Модуляція сенсорних входів у нейрони пластинки I стимуляцією низхідних аксонів РВДМ

Наступним етапом дослідження було виконано записи методом петч-клемп з нейронів пластинки I люмбарного відділу спинного мозку. Це дозволило оцінити ефективність фотостимуляції ChR2, та продемонструвати спроможність розробленої методики для дослідження низхідного контролю в спинному мозку. Спочатку ми дослідили постсинаптичні струми, викликані входами від первинних аферентів.

Як і в попередньому розділі (3.1), первинні аференти стимулювали прикладаючи електричний струм до підсмоктаного у скляну піпетку-електрод дорзального корінця. Низхідні аксони від РВДМ, які експресували ChR2, стимулювали оптично, використовуючи локальне прикладання монохроматичного світла через об'єктив мікроскопа. Для цього використовували доступну на установці систему, призначену для епіфлуоресцентного освітлення (POLYCHROME IV, TILL Photonix, США). Використовували імпульси світла з довжиною хвилі 470 нм та тривалістю 10 мс. Загальну картину експериментальної конфігурації представлено на рисунку 3.28.

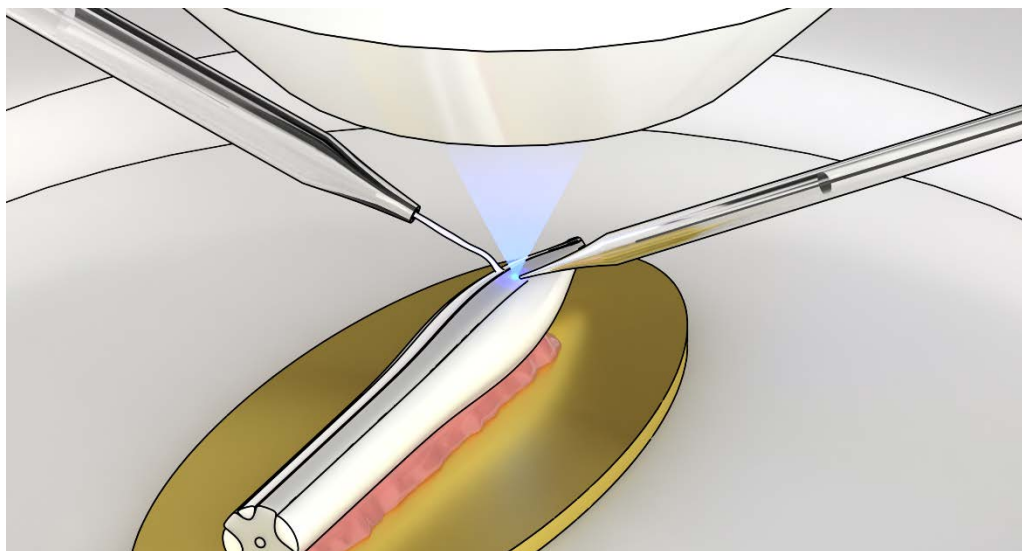


Рис. 3.28. Схематичне зображення препарату спинного мозку в експериментальній камері. Препарат спинного мозку *ex vivo* кріпиться до металевої пластини під кутом приблизно 45° так, щоб дорзальний ріг був спрямований вгору. Збережений дорзальний корінець фіксується у стимуляційній піпетці і злегка відтягується, щоб відкрити поверхню дорзального рогу під ним. Зображення модифіковано з (Krotov et al., 2017).

Збуджувальні постсинаптичні струми реєстрували, фіксуючи підтримуваний на мембрані потенціал на рівні -70 мВ. З п'яти нейронів, що демонстрували збуджувальні відповіді на стимуляцію корінця, у трьох з них спостерігались швидкі моносинаптичні А-відповіді. В усіх п'яти нейронів також спостерігалась полісинаптична компонента (рис. 3.29).

Локальна стимуляція низхідних аксонів з РВДМ викликала зменшення загального інтегралу ЗПСС у чотирьох із п'яти нейронів (рис. 3.29, рис. 3.30). При цьому, у двох із трьох нейронів з моносинаптичними відповідями спостерігалось зменшення їх амплітуд (рис. 3.30). Слід звернути увагу, що зміни загальної інтегралу ЗПСС та площі могли бути непропорційними між собою. Так, наприклад, у репрезентативній клітині (рис. 3.29) бачимо, що фотостимуляція низхідних волокон від РВДМ призвела до невеликого ($\approx 20\%$) зменшення моносинаптичного А-входу, натомість найбільші за амплітудою частини полісинаптичної С-відповіді були придушені майже повністю. Ця різниця в дії

РВДМ на функціонально різні входи від первинних аферентів може якраз лежати в механізмах селективного впливу РВДМ саме на ноцицептивну чутливість, і перебуватиме детальнішого вивчення.

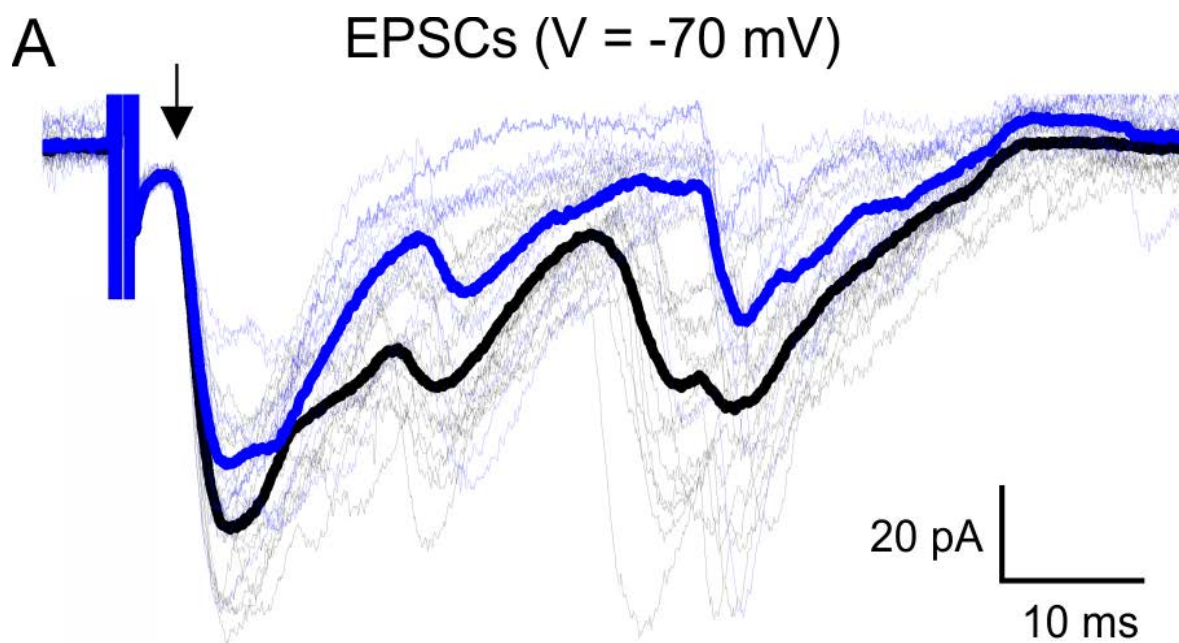


Рис 3.29. Оптична стимуляція волкон РВДМ пригнічує збуджувальні входи від первинних аферентів до нейронів пластинки I лумбарної частини спинного мозку. Петч-клемп записи збуджуючих постсинаптичних струмів (ЗПСС), викликаних електричною стимуляцією дорсального корінця. Чорні криві – за відсутності фотостимуляції. Сині криві – при безперервній фотостимуляції ChR2 з частотою 5 Гц та тривалістю імпульсів в 10 мс). Жирним показано усереднені криві з усіх повторень протоколу стимуляції. Стрілка вказує на моносинаптичний компонент первинного аферентного входу, викликаний А-волоком.

Зменшення амплітуди моносинаптичних ЗПСС можливо пояснити лише наявністю прямого або непрямого пресинаптичного інгибуванням первинних аферентів. У ряді досліджень було, що РВДМ здатна селективно впливати чутливість до механічного болю, але не до термального (François et al., 2017; Pertovaara, 1998; Porreca, 2002). Пресинаптичне інгибування волокон саме А-типу

(більшість з яких є механорецепторами) є можливим механізмом, що пояснює таку сенсорну селективність низхідної регуляції.

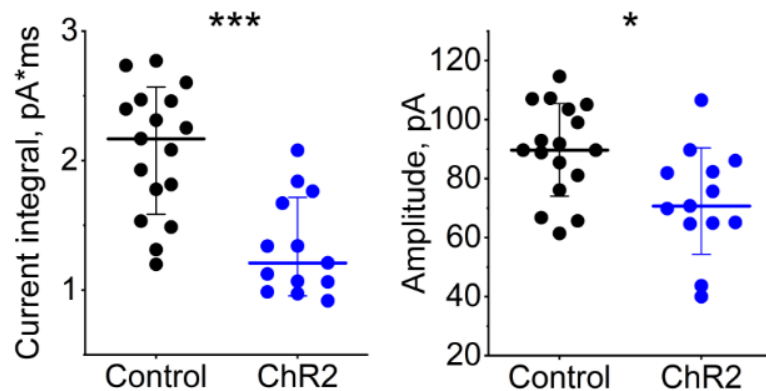


Рис. 3.30. Зменшення площі та амплітуд викликаних стимуляцією первинних аферентів ЗПСС, спричинене низхідним кондиціонуванням від РВДМ. Ліворуч – вплив фотостимуляції ChR2 на інтеграл ЗПСС, праворуч – вплив фотостимуляції ChR2 на амплітуду лише моносинаптичного компонента відповіді. * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$ тест Манна-Вітні

Гальмівні постсинаптичні струми реєстрували, фіксуючи підтримуваний на мембрані потенціал на рівні -10 мВ. Оскільки гальмівні відповіді від первинних аферентів були лише полісинаптичними, для оцінки величини відповіді вимірювали лише площу під реєстраційною кривою. Постійна стимуляція низхідних аксонів РВДМ за допомогою світла достовірно зменшувала величину гальмівної відповіді у трьох із чотирьох зареєстрованих нейронів з ГПСС (рис. 3.31, рис. 3.32).

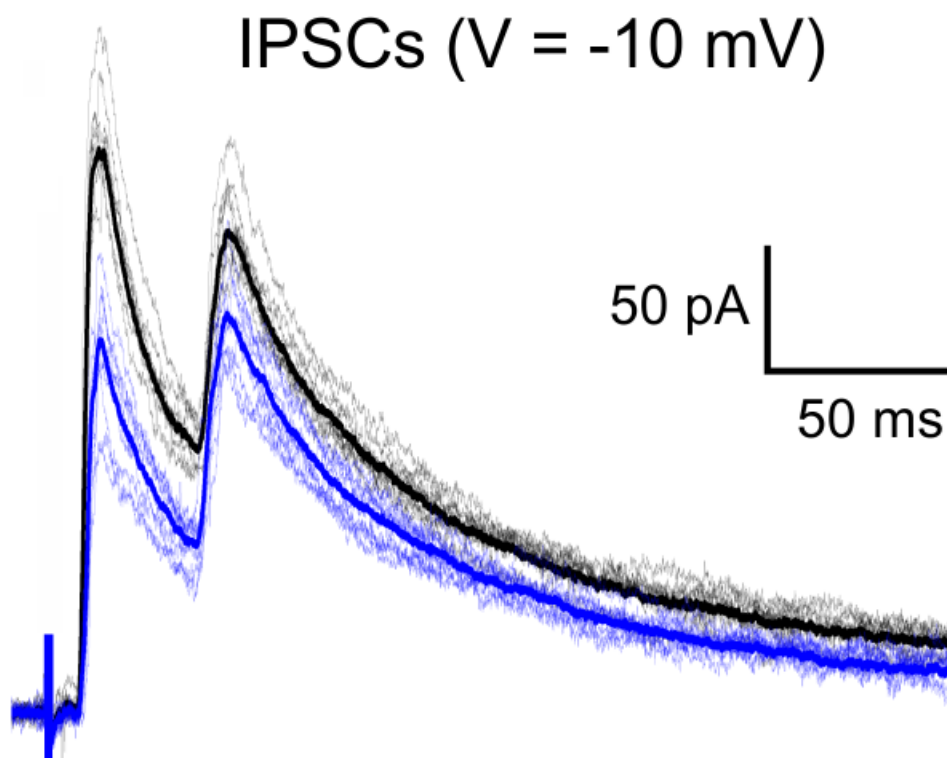


Рис 3.31. Оптична стимуляція волкон РВДМ пригнічує гальмівні входи первинних аферентів до нейронів пластинки І люмбарної частини спинного мозку. Петч-клемп записи гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС), викликаних електричною стимуляцією дорсального корінця. Чорні криві – за відсутності фотостимуляції. Сині криві – при безперервній фотостимуляції ChR2 з частотою 5 Гц та тривалістю імпульсів в 10 мс). Жирним показано усереднені криві з усіх повторень протоколу стимуляції.

При цьому у цих досліджених клітинах не спостерігалось збуджувальних чи гальмівних відповідей на саму стимуляцію низхідних аксонів світлом. Також, при стимуляції світлом не зменшувалась частота виникнення ГПСС у відповідь на стимуляцію корінця. Вищенаведені факти вказують на те, що вплив аксонів РВДМ здійснюється не безпосередньо на зареєстровану клітину, а пресинаптично по відношенню до неї.

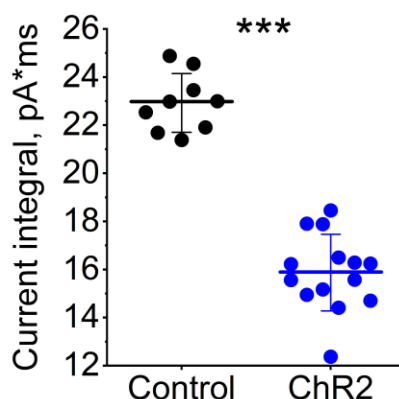


Рис 3.32. Зменшення площі викликаних стимуляцією первинних аферентів ГПСС, спричинене низхідним кондиціонуванням від РВДМ. * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$, тест Манна-Вітні.

На перший погляд, доволі несподіваним є те, що активація низхідних аксонів РВДМ зменшувала як гальмівні, так і збуджувальні сенсорні входи. Однак, цей результат є доволі очікуваним, адже РВДМ містить як ON-, так і OFF-клітини що мають протилежний вплив на ноцицепцію, а у кількох дослідженнях напряду була показана двонапрямлена дія РВДМ на больові пороги (Zhuo et al., 2002).

Загалом, отримані дані свідчать про те, що низхідні шляхи від РВДМ мають глибокий вплив на нейронні мережі дорзального рогу, що може як пригнічувати, так і сприяти ноцицепції.

3.2.5 Відповіді нейронів пластинки I на оптичну стимуляцію низхідних аксонів від РВДМ.

Для оцінки постсинаптичної активності, викликаній безпосередньо стимуляцією низхідних аксонів світлом було виконано безперервні записи з нейронів пластинки I дорзального рогу при значення підтримуваного потенціалу -70 мВ та -10 мВ (для реєстрації збуджувальних та гальмівних постсинаптичних струмів відповідно). При стимуляції низхідних аксонів РВДМ імпульсами світла

синього лазера було знайдено клітини, в яких спостерігались гальмівні відповіді на стимуляцію (рис. 3.33).

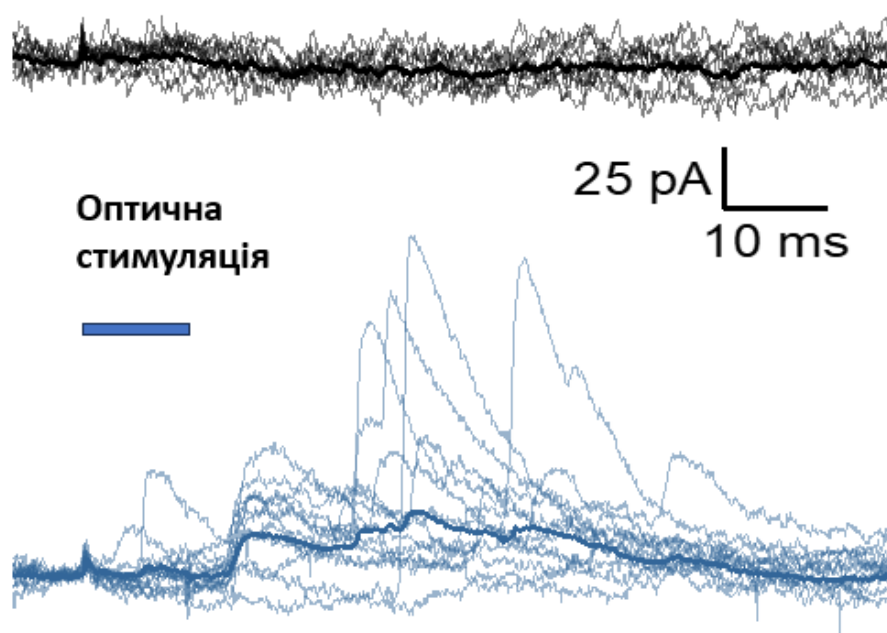


Рис. 3.33. Оптична стимуляція викликає відповіді у нейронах першої пластинки. Наведено реєстрації постсинаптичних гальмівних струмів, що викликаються у відповідь на 10 послідовних світлових імпульсів. Чорне – препарат з тварини, ін'єксованої GFP конструктором (негативний контроль), Сині – ін'єксованої ChR2 конструктором. Жирним показано усереднені криві з усіх повторень протоколу стимуляції.

З всього зареєстрованих 10 клітин такі відповіді спостерігались у двох. Приклад реєстрації гальмівних пост-синаптичних струмів (ГПСС) представлено на рисунку 3.33.

Цікаво, що зображена на рисунку відповідь клітини була двохкомпонентною – спочатку спостерігалась невелика (значення амплітуд 20-40 пА) відповідь з латентністю близько 14 мс від початку світлового імпульсу, за нею слідували більші за амплітудою, проте асинхронні ГПСС. Невеликий розкид в латентності першої відповіді (1–3 мс) свідчить про наявність моносинаптичних

прямих гальмівних синаптичних контактів між волокнами, що походять з РДВМ та нейронами пластинки I.

Оскільки інтенсивне світло саме по собі здатне викликати неспецифічні артефакти, такі як фотоелектричний ефект (Kozai & Vazquez, 2015), або природня чутливість деяких нейронів до світла (Hryciw et al., 2023) то для перевірки було проведено аналогічні досліди з використанням негативного контролю. Такі ж протоколи запису здійснювали з нейронів пластинки I у препаратах, виділених з тварин, ін'єкованих генетичним конструктом, що кодував лише флуоресцентний маркер, але не ChR2. У жодній із шести контрольних клітин, які вдалося перевірити таким чином, не було знайдено ні збуджувальних, ні гальмівних відповідей на стимуляцію за допомогою лазера (рис. 3.33). Спостерігались лише невеликі електричні артефакти в моменти увімкнення лазера, які, найімовірніше, були викликані наведеними електричними полями. Також, зважаючи на амплітуди та латентності гальмівних струмів, зареєстрованих у ChR2-позитивних тварин, неспецифічними ефектами важко пояснити складний характер спостережуваних відповідей, з чітко виділеними моно та полісинаптичними компонентами.

У існуючих дослідженнях різними колективами вже було показано існування прямих гальмівних входів від нейронів РВДМ до інтернейронів дорзального рогу (Aicher et al., 2012; François et al., 2017). Проте, наявність полісинаптичних гальмівних відповідей може свідчити про існування досі неохарактеризованої субпопуляції збуджувальних нейронів РВДМ, які проектується в спинний мозок.

В результаті проведених досліджень щодо регуляції нейронів першої пластинки низхідними волокнами, що походять від РВДМ, нами були зроблені наступні висновки:

Після введення генетичного конструкту AAV9-ChR2-YFP продукти його експресії антероградно транспортуються низхідними аксонами, та забезпечують експресію як ChR2 так і YFP. Флуоресцентні зображення підтвердили, що

паттерн розповсюдження відповідних білків в структурах спинного мозку відповідає анатомічним даним щодо будови цього низхідного шляху.

Оптична стимуляція низхідних шляхів при використанні ChR2 достовірно їх активує у порівнянні із аналогічними експериментами при використанні контрольних препаратів.

Активація низхідних аксонів РВДМ викликає моно- та полісинаптичні гальмівні відповіді у нейронах пластинки I.

Як збуджувальні, так і гальмівні події у нейронах пластинки I, викликані стимуляцією дорзального корінця, зменшуються при активації низхідних аксонів РВДМ.

Можливий селективний вплив активації низхідних аксонів РВДМ на окремі компоненти сенсорних входів в нейрони пластинки I, а саме, А- та С- входи.

Зменшення амплітуд збуджувальних моносинаптичних А β - аферентних входів під впливом активації аксонів РВДМ свідчить про пресинаптичний характер їх інгібування

Результати, висвітлені у даній частині було опубліковано у статті (Krotov et al., 2025):

Krotov, V., **Blashchak, I.**, Moore, J., Moore, A., Romanenko, S., Voitenko, N. and Belan, P. (2025). Optogenetic Approach for Investigating Descending Control of Nociception in Ex Vivo Spinal Cord Preparation. *Bio-protocol* 15(21): e5483. DOI: 10.21769/BioProtoc.5483.

Та представлено у тезах/виступах на конференціях:

Blashchak, I., Krotov, V., Voitenko, N., Belan, P., Descending control of lumbar spinal cord neurons by rostroventromedial medulla. *FENS Regional Meeting 2021*, Krakov, Poland, poster session

Blaschak I. O.; Krotov V. V.; Romanenko S. V.; Voitenko N.V.; Belan P. V., Descending control of dorsal horn neurons by rostral ventromedial medulla, *XVIII*

3.3. Роль нейромодуляторних систем у загальному пресинаптичному інгібуванні

3.3.1 Деполяризація первинних аферентів викликана стимуляцією дорзального корінця

У нашій попередній роботі ми виявили, що низхідна регуляція впливає на більшість нейронів пластинки Х, зменшуючи їхні первинні аферентні сигнали. Ми помітили, що безперервна стимуляція низхідних шляхів призводила до сильнішого гальмування цих сигналів, ніж їх одноразова стимуляція. Це вказує на кумулятивну низхідну дію, яку можна пояснити (ко)вивільненням нейромодуляторів, таких як моноаміни (норадреналін, серотонін та дофамін) або енкефаліни. Це припущення підтверджується гістохімічними дослідженнями, які показують наявність енкефалінів та норадреналіну в області навколо центрального каналу спинного мозку (Basbaum et al., 1987; Giroux et al., 1999).

Результати, викладені в попередніх частинах, переконливо доводять, що пресинаптичне інгібування первинних аферентів є важливим механізмом модуляції ноцицептивних мереж у спинному мозку. Як було описано в частині 3.1.2, Першочерговим механізмом цього процесу є активація GABA_A рецепторів на мембрані первинних аферентів, спричинена вивільненням ГАМК зі спинномозкових інтернейронів, які утворюють аксо-аксональні синапси з первинними аферентами. GABA_A рецептори є хлорними каналами, а їх відкриття призводить до виходу Cl⁻ назовні мембрани за електрохімічним градієнтом (Fernandes et al., 2020; Zimmerman et al., 2019). Тому пресинаптичне інгібування супроводжується деполяризацією первинних аферентів (ДПА), яку легко зареєструвати в умовах експерименту, вимірюючи потенціал дорзального корінця (ПДК).

Оскільки метод вимірювання ПДК є зручним способом оцінки загального пресинаптичного інгібування та добре відпрацьований на *ex-vivo* препаратах з збереженими дорзальними корінцями, його було обрано для початкової оцінки ролі нейромодуляторних систем у загальному пресинаптичному інгібуванні.

Для цього було проведено зовнішньоклітинні реєстрації викликаних ПДК в контролі та за умов прикладання нейромодуляторних речовин. Спочатку ми перевірили, чи викликають стимуляції аферентних та низхідних шляхів ДРП. У нашому препараті ДРП (пік при 100-150 мс) були надійно викликані стимуляцією того ж самого, або найближчого в каудальному напрямку корінця (рис. 3.34).

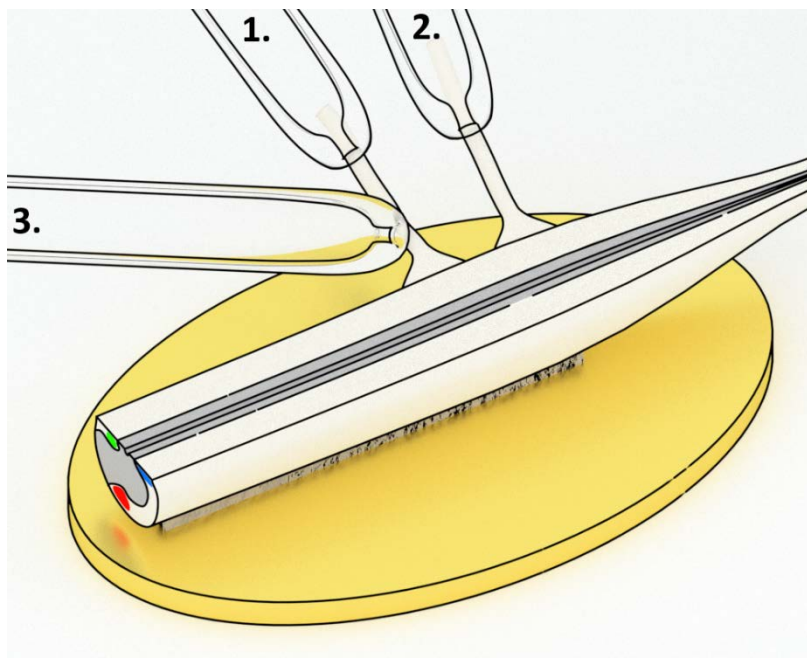


Рис. 3.34. Схематичне зображення експериментальної конфігурації електродів для запису ДРП. 1,2 – підсмоктувальні електроди для стимуляції того ж самого (1) або сусіднього (2) дорзального корінця, 3 – реєструючий електрод.

При стимуляції заднього корінця реєстрували позитивну зміну потенціалу, яка наростала до пікового значення на 100мс, і поступово згасала в межах секунди (рис. 3.35)

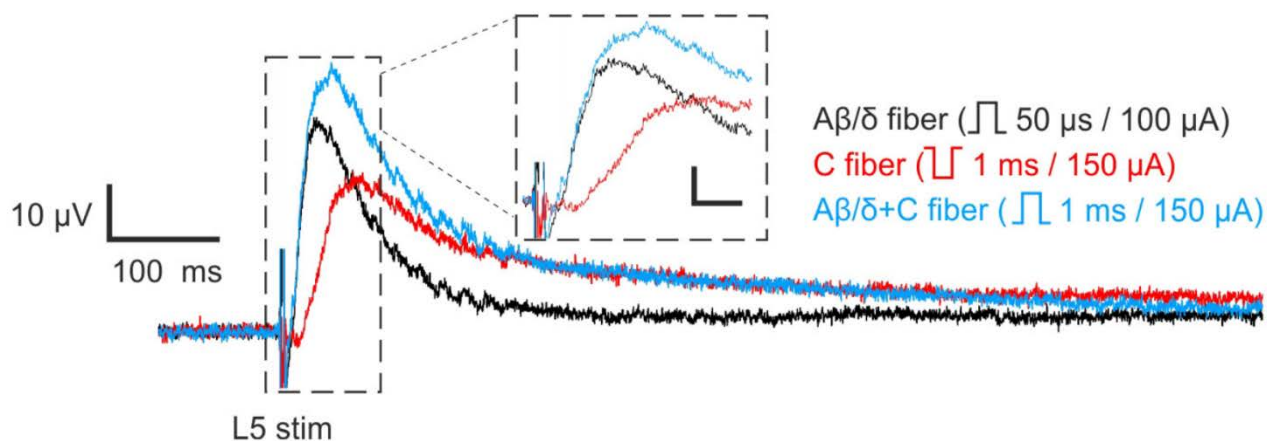


Рис 3.35. ДРП, викликані стимуляцією А, С та А+С волокон

Всього було здійснено 13 експериментів, в яких було проаналізовано вплив одного чи декількох нейромодуляторів (норадреналін ($n = 6$), серотонін ($n = 7$), допамін ($n = 5$), DAMGO ($n = 7$)). При перевірці дії декількох нейромодуляторів на одному препараті, після кожного прикладання проводилась тривала (близько 5 хв) відмивка свіжим розчином, а час між прикладаннями різних медіаторів становив не менше 20 хв.

3.3.2 Вплив норадреналіну на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК)

На рисунку 3.36 наведені типові криві реєстрацій потенціалу дорзального корінця (ПДК), викликаного супрамаксимальною стимуляцією дорзального корінця. У відповідь на таку стимуляцію спостерігали деполяризацію первинних аферентів (ДПА) що реєструвалась як зростання вимірюваного потенціалу, яке досягало максимуму близько 100 мс після стимуляції, далі потенціал дорзального корінця протягом декількох секунд повертався до початкового значення. У репрезентативному препараті були зареєстровані площі ПДК $0,31 \pm 0,09$ для контролю ($n=10$), $0,14 \pm 0,02$ після прикладання норадреналіну ($n = 8$) та $0,31 \pm 0,03$ після відмивки ($n=10$).

Бачимо, що норадреналін суттєво ($\approx 56\%$) зменшив величину ПДК ($p < 0,001$).

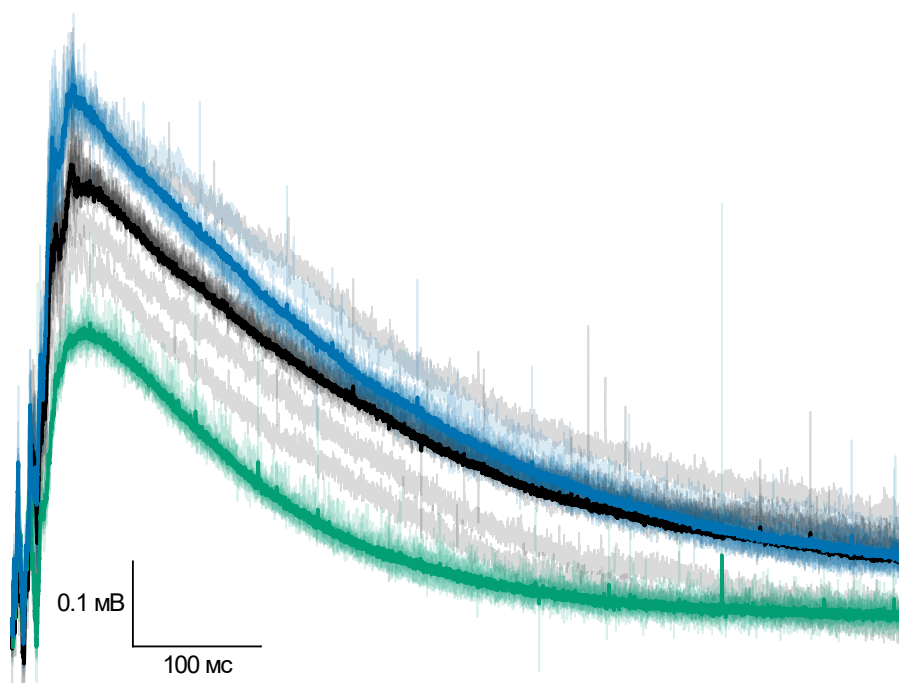


Рис. 3.36. Норадреналін-залежне зменшення ПДК, викликаних супрамаксимальною (+150 мкА 1 мс) стимуляцією дорзального корінця. Чорним зображено викликані ПДК в контролі, зеленим – після прикладання норадреналіну, синім – після відмивки. Жирним показано усереднені криві з усіх повторень протоколу стимуляції.

Подібні результати спостерігались і в інших повтореннях досліду. Оскільки спостережувані амплітуди та площі ДРП залежать від опору підсмоктуального електрода, якості та місця розташування контакту з корінцем і можуть більш, ніж на порядок відрізнятись між конкретними експериментами, для коректного їх порівняння величини площ ДРП було нормалізовано відносно середніх значень контролю. На рисунку 3.37 наведено лише середні значення по всіх повтореннях протоколу стимуляції для кожного препарату.

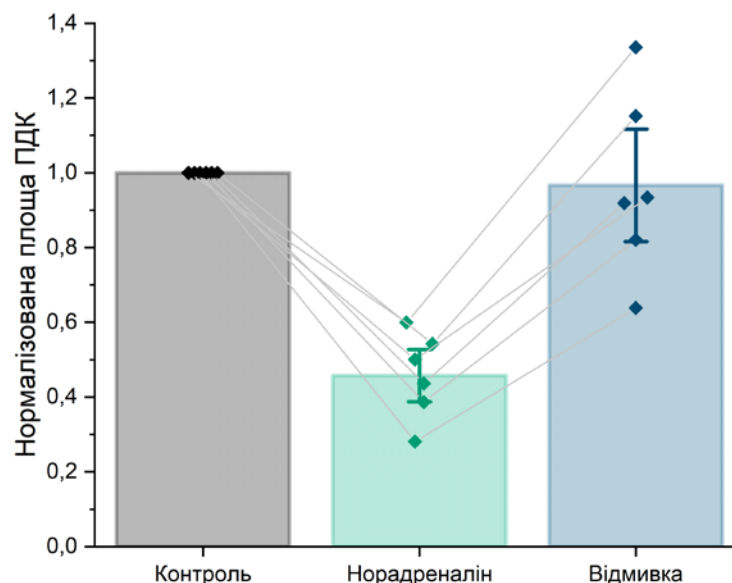


Рис 3.37. Зменшення площі викликаного супрамаксимальною (+150 мкА 1 мс) стимуляцією дорзального корінця ПДК під дією норадреналіну. Чорний – контроль до прикладання, зелений – після прикладання норадреналіну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

В середньому норадреналін зменшував площі ПДК у 2.33 рази. Оскільки адренергічні рецептори за відсутності патології експресує невелика частка первинних аферентів (Birder & Perl, 1999), спостережуване зменшення пресинаптичного інгібування найімовірніше, пояснюється дією норадреналіну на гальмівні інтернейрони.

Також було перевірено дію норадреналіну на ПДК, викликані окремо стимуляцією лише С або А-волокон. Для селективної стимуляції А-волокон до дорзального корінця прикладали струм меншої амплітуди та тривалості (100 мкА 50 мкс), що викликало лише стимуляцію низькопорогових волокон. Для селективної стимуляції С-волокон використовували струм негативної полярності, що спричиняло анодний блок потенціалів дії на швидких А-волокнах, залишаючи

лише ПД на повільних С-волокнах. Детальніше цей метод описано у відповідній частині розділу 2.

На рисунку 3.38 наведені типові криві реєстрацій ПДК, викликаного С-стимуляцією дорзального корінця.

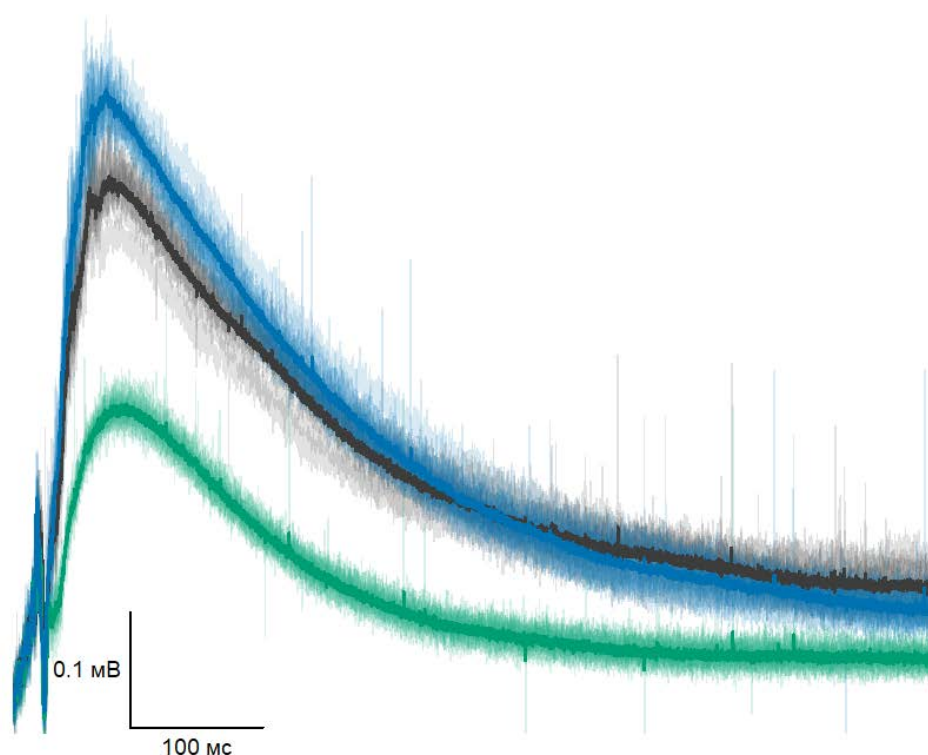


Рис 3.38. ПДК викликані С-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця. Чорним зображено викликані ПДК в контролі, зеленим – після прикладання норадреналіну, синім – після відмивки. Жирним показано усереднені криві з усіх повторень протоколу стимуляції.

У репрезентативному препараті були зареєстровані площі викликаних С-стимуляцією ПДК у $0,22 \pm 0,04$ мВ*с для контролю ($n=10$), $0,07 \pm 0,01$ мВ*с після прикладання норадреналіну ($n = 8$) та $0,20 \pm 0,02$ мВ*с після відмивки ($n=10$). Аналогічні результати спостерігали і в інших повтореннях досліджу.

На рисунку 3.39 наведено усереднені нормалізовані значення по всіх повтореннях протоколу стимуляції для кожного препарату

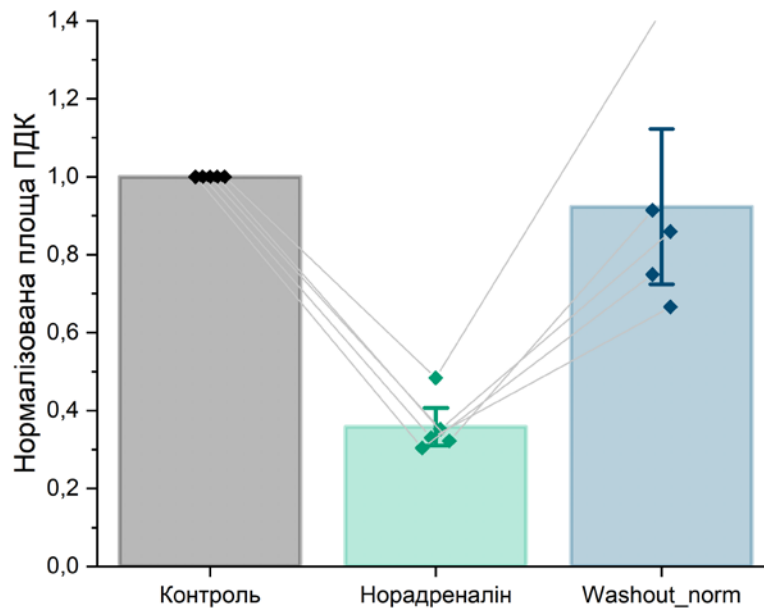


Рис. 3.39. Зменшення площі викликаного С-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією норадреналіну. Чорний – контроль до прикладання, зелений – після прикладання норадреналіну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

В середньому норадреналін зменшував площі С-викликаних ПДК у 2,87 рази.

На рисунку 3.40 наведені типові криві реєстрацій ПДК, викликаного А-стимуляцією дорзального корінця.

У репрезентативному препараті були зареєстровані площі викликаних А-стимуляцією ПДК $0,20 \pm 0,04$ мВ*с для контролю (n=10), $0,07 \pm 0,02$ мВ*с після прикладання норадреналіну (n = 8) та $0,17 \pm 0,02$ мВ*с після відмивки (n=10)

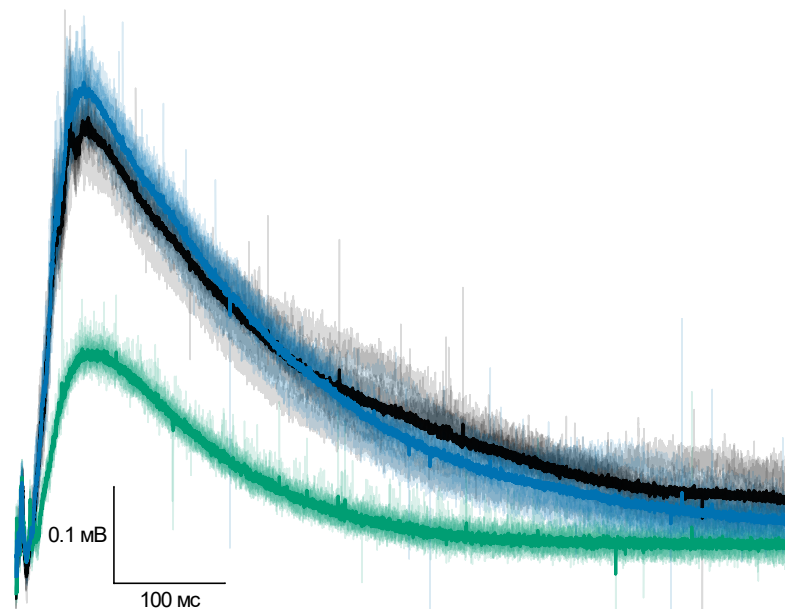


Рис. 3.40. ДПА викликана А-стимуляцією (+100 мкА 50 мкс) дорзального корінця. Зелений – контрольна група, червоний – група при прикладанні норадреналіну, синя – група після відмивки.

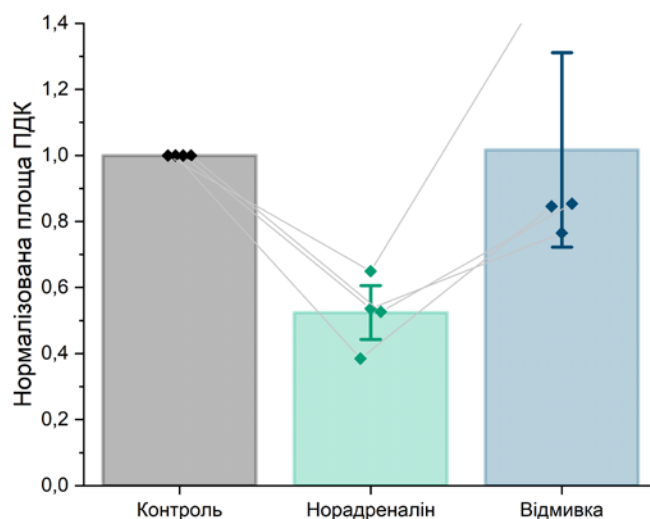


Рис. 3.41. Зменшення площі викликаного А-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією норадреналіну. Чорний – контроль до

прикладання, зелений – після прикладання норадреналіну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

В середньому норадреналін зменшував площі А-викликаних ПДК у 1,98 рази.

Порівнюючи ефект норадреналіну окремо на А- та С-викликані ПДК, ми бачимо, що норадреналін ймовірно сильніше впливає на С-викликаний ПДК ніж на А-викликаний. Це може свідчити про його специфічну роль саме в контролі пресинаптичного інгібування при ноцицепції.

3.3.3 Вплив допаміну на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК)

Аналогічно до норадреналіну (розділ 3.3.2), було проведено подібні дослідження і для інших нейромодуляторів – допаміну, серотоніну, а також при додаванні DAMGO, який є селективним блокатором μ -опіїдних рецепторів. Так само, як і в попередньому розідіді, вимірювали їхній вплив на пресинаптичне інгібування первинних аферентів, шляхом реєстрації ПДК.

Для допаміну далі приведено лише нормалізовані діаграми усереднених площ за усіма експериментами. Попередні етапи аналізу повністю відповідали таким для норадреналіну.

Результати впливу допаміну на площу загального ПДК, викликаного стимуляцією первинних аферентів зображено на рисунках 3.42, 3.43, 3.44.

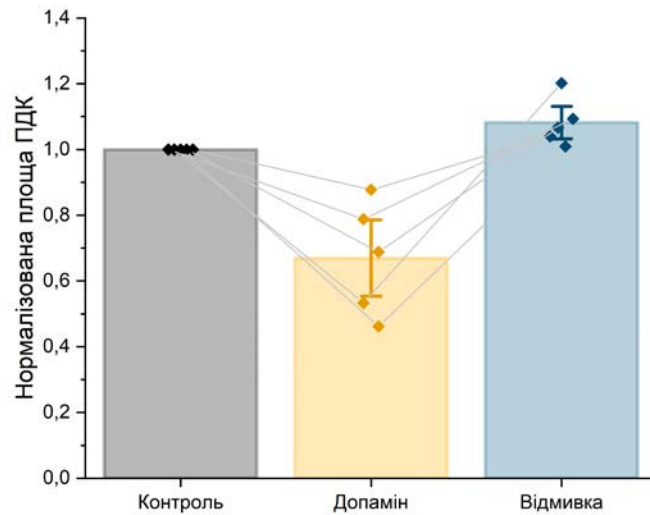


Рис 3.42. Зменшення площі викликаного супрамаксимальною (+150 мкА 1 мс) стимуляцією дорзального корінця ПДК під дією допаміну. Чорний – контроль до прикладання, жовтий – після прикладання допаміну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

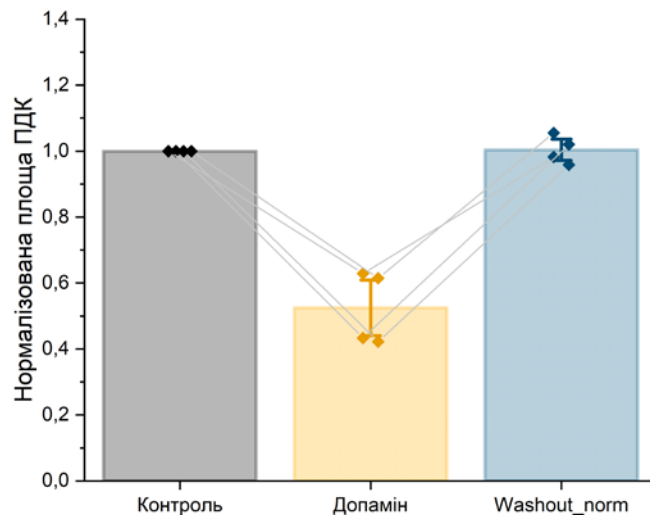


Рис 3.43. Зменшення площі викликаного С-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією допаміну. Чорний – контроль до прикладання,

жовтий – після прикладання допаміну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

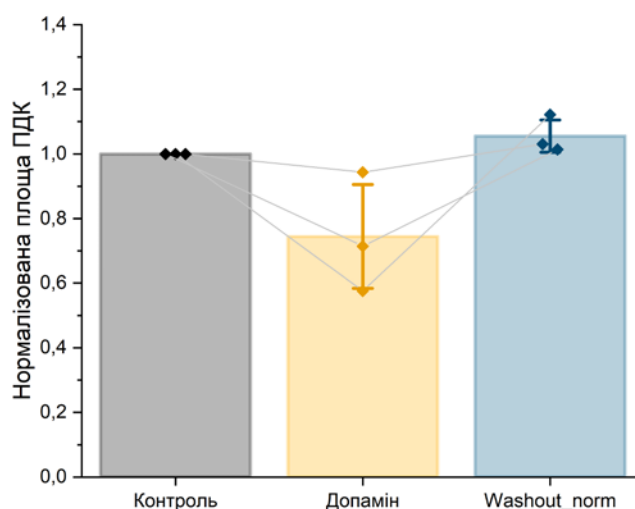


Рис 3.44. Зменшення площі викликаного А-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією допаміну. Чорний – контроль до прикладання, жовтий – після прикладання допаміну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

В середньому допамін зменшував площі ПДК, викликаного супрамаксимальною стимуляцією дорзального корінця у 1,58 разів. Схоже, що величина ефекту від допаміну значно менша, ніж для норадреналіну, проте доступна на даний момент вибірка даних занадто мала, щоб точно це визначити.

Якщо є порівнювати величини окремо для ПДК, викликаного селективною стимуляцією С- та А-волокон, то в середньому допамін зменшував площі С-викликаних ПДК у 1,97 разів, натомість А-викликаних ПДК лише в 1,4 рази.

Таким чином, можемо припустити, що дія допаміну на загальний ДРП викликана в першу чергу його впливом на С-індуковану деполяризацію первинних аферентів.

3.3.4 Вплив серотоніну на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК)

Наступним нейромедіатором, для якого ми визначали вплив на пресинаптичне інгібування первинних аферентів, був серотонін. Для серотоніну, як і для допаміну та норадреналіну далі приведено лише нормалізовані діаграми усереднених площ за усіма експериментами. Попередні етапи аналізу були аналогічними до тих, що представлені для норадреналіну.

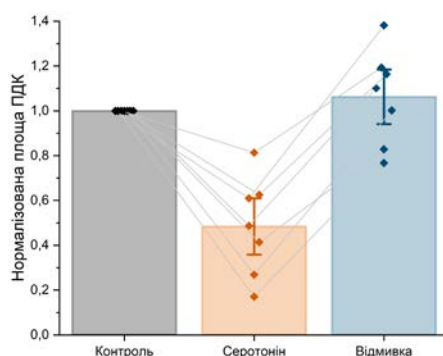


Рис. 3.45. Зменшення площі викликаного супрамаксимальною (+150 мкА 1 мс) стимуляцією дорзального корінця ПДК під дією серотоніну. Чорний – контроль до прикладання, помаранчевий – після прикладання серотоніну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

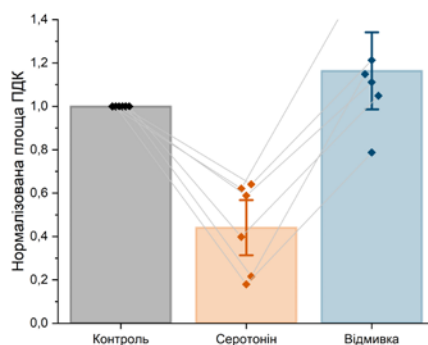


Рис. 3.46 Зменшення площі викликаного С-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією серотоніну. Чорний – контроль до прикладання, помаранчевий – після прикладання серотоніну, синій – після

відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

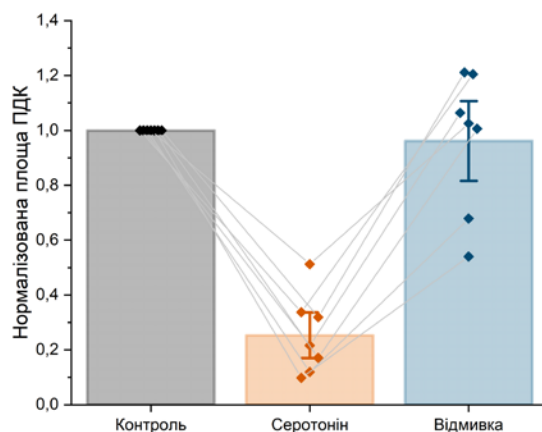


Рис. 3.47 Зменшення площі викликаного А-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією серотоніну. Чорний – контроль до прикладання, помаранчевий – після прикладання серотоніну, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

Результати впливу серотоніну на площу загального ПДК, викликаного стимуляцією первинних аферентів зображено на рисунках 3.45, 3.46, 3.47.

В середньому серотонін зменшував площі ПДК, викликаного супрамаксимальною стимуляцією дорзального корінця у 2,65 разів

Якщо ж порівнювати величини окремо для ПДК, викликаного селективною стимуляцією С- та А-волокон, то в середньому серотонін зменшував площі С-викликаних ПДК у 2,92 разів, натомість А-викликаних ПДК – аж в 5,3 рази.

На відмінну від норадреналіну, та допаміну серотонін навпаки, більше подіяв на А-викликані ДРП, де його вплив був найсильніший з поміж розглянутих нейромодуляторів.

3.3.5 Вплив DAMGO на викликані потенціали дорзального корінця (ПДК)

Нарешті, також було визначено вплив енкефалінів на пресинаптичне інгібування первинних аферентів. Для цього було використано DAMGO – специфічний агоніст μ -опіоїдних рецепторів (Handa et al., 1981).

Далі приведено лише нормалізовані діаграми усереднених площ за усіма експериментами. Попередні етапи аналізу були аналогічними до тих, що представлені для норадреналіну.

Результати впливу DAMGO на площу загального ПДК, викликаного стимуляцією первинних аферентів зображено на рисунках 3.45, 3.46, 3.47.

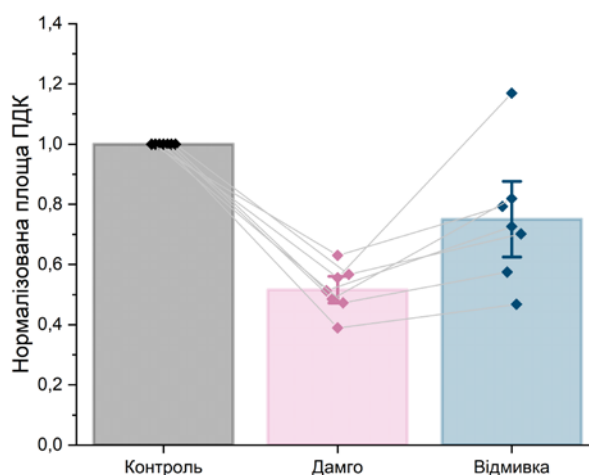


Рис. 3.48. Зменшення площі викликаного супрамаксимальною (+150 мкА 1 мс) стимуляцією дорзального корінця ПДК під дією DAMGO. Чорний – контроль до прикладання, рожевий – після прикладання DAMGO, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

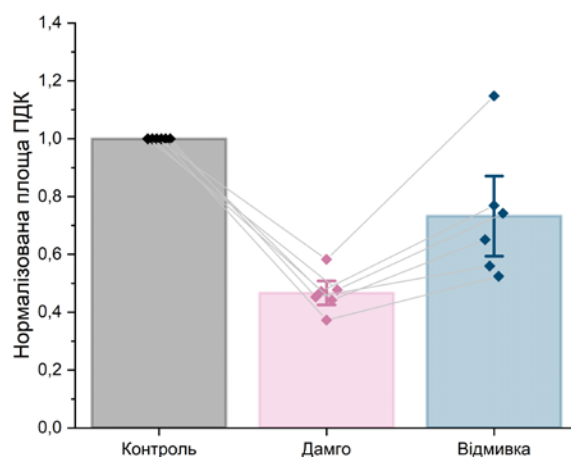


Рис. 3.49. Зменшення площі викликаного С-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією DAMGO. Чорний – контроль до прикладання, рожевий – після прикладання DAMGO, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

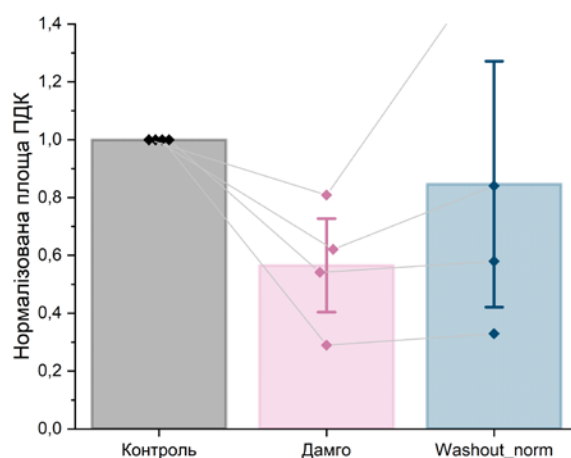


Рис. 3.50. Зменшення площі викликаного А-стимуляцією (-150 мкА 1 мс) дорзального корінця ПДК під дією DAMGO. Чорний – контроль до прикладання, рожевий – після прикладання DAMGO, синій – після відмивки. Наведено середні значення по кожному окремому експерименту, нормалізовані відносно контролю.

В середньому під дією DAMGO площі ПДК, викликаних супрамаксимальною стимуляцією дорзального корінця зменшувались у 1,98 разів.

Якщо є порівнювати величини окремо для ПДК, викликаного селективною стимуляцією С- та А-волокон, то в середньому під впливом DAMGO площі С-викликаних ПДК зменшувались у 2,18 разів, а площі А-викликаних ПДК – в 2,04 рази.

DAMGO вплинув як на С- так і на А- викликані ПДК. Результати потребують доповнення та більшої вибірки. Аналіз даних ускладнює те, що навіть після тривалої відмивки площі ПДК не повертались до своїх початкових значень. Це наімовірніше можна пояснити тим, що DAMGO здатний неспецифічно адсорбуватись і затримуватись на поверхні ряду полімерів (Alluisetti et al., 2025), що спричиняє труднощі у його відмивці. Проте, не слід виключати і можливі пластичні зміни, індуковані внаслідок активації μ -опіоїдних рецепторів.

3.3.6 Комбінована дія нейромодуляторів

Після встановлення окремого ефекту кожного з нейромодуляторів постає запитання, наскільки їхні ефекти здійснюються через окремі, або спільні механізми. Для оцінки цього було проведено декілька реєстрацій потенціалу дорзального корінця з послідовним прикладанням декількох нейромодуляторів поверх один одного.

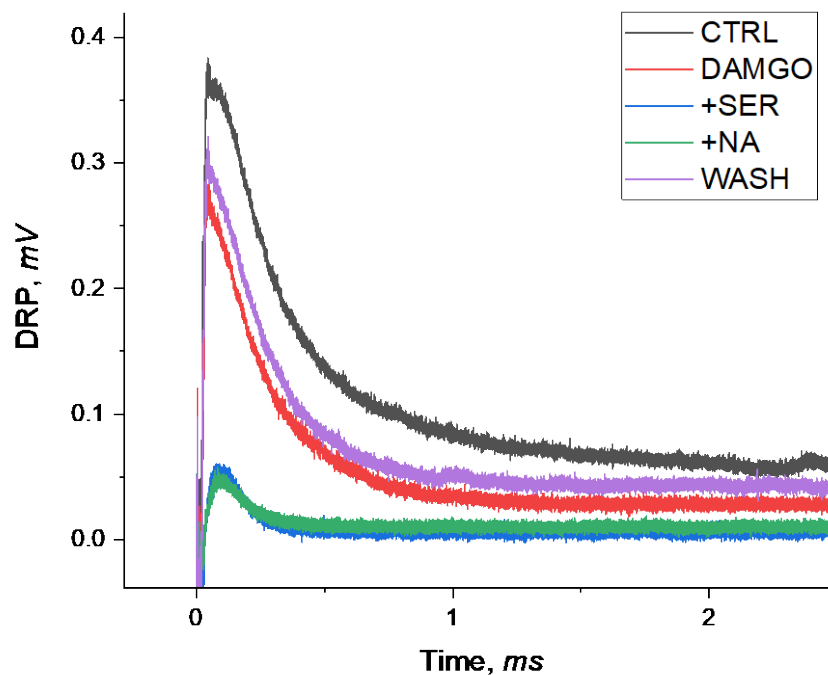


Рис. 3.51. ПДК при послідовному прикладанні DAMGO, серотоніну та норадреналіну.

На рисунку 3.51 зображено результат дослідження, де послідовно прикладали DAMGO, серотонін та норадреналін. Прикладання серотоніну на фоні DAMGO спричинило значне (% від контролю) додаткове зменшення площі ПДК. Це свідчить про те, що значна частина ефекту серотоніну забезпечується механізмами, незалежними від енкефалінової системи. Натомість, прикладання норадреналіну не спричинило жодних додаткових змін, а це свідчить про те, що він впливає на ПДК через ті ж механізми, що й енкефаліни та/або серотонін. Після відмивки препарату розчином без внесених нейромедіаторів площа під кривою виросла, але все ще залишилась менше початкового значення. Це можна пояснити як недостатньою тривалістю відмивки (особливо для DAMGO потрібно більше часу щоб повністю відмитись), так і ймовірними нейропластичними змінами.

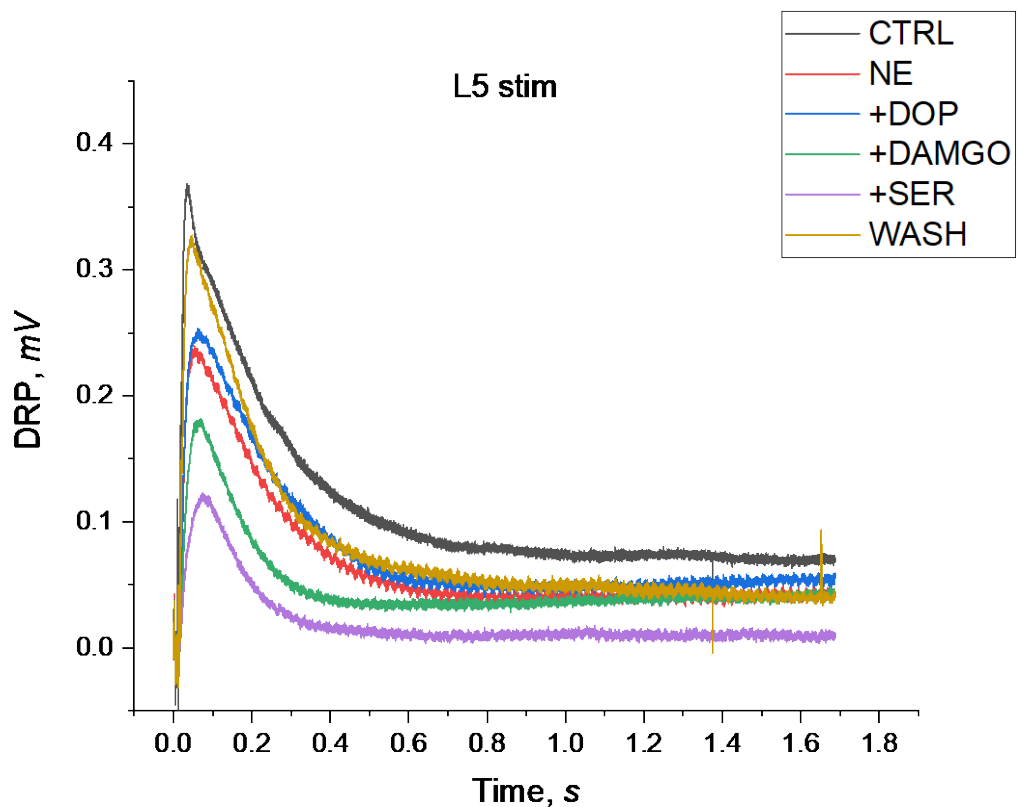


Рис.3.52 ПДК при послідовному прикладанні норадреналіну, допаміну, DAMGO та серотоніну.

На рисунку 3.52 зображено записи потенціалу дорзального корінця з іншою послідовністю прикладання нейромодуляторів, а саме: норадреналін, допамін, DAMGO та серотонін. Бачимо, що допамін не зменшив ПДК на фоні норадреналіну, а отже, механізм впливу допаміну на пресинаптичне інгібування ПДК пов'язаний з аналогічним впливом норадреналіну.

Отримані результати щодо взаємодії між різними нейромодуляторними системами є попередніми, і потребують додаткової верифікації. Тим не менш, навіть такі неповні дані проливають світло на спільні механізми впливу відмінних нейромодуляторних систем на сенсорні входи, та дозволяють побудувати певну картину їх попарної взаємодії (рис).

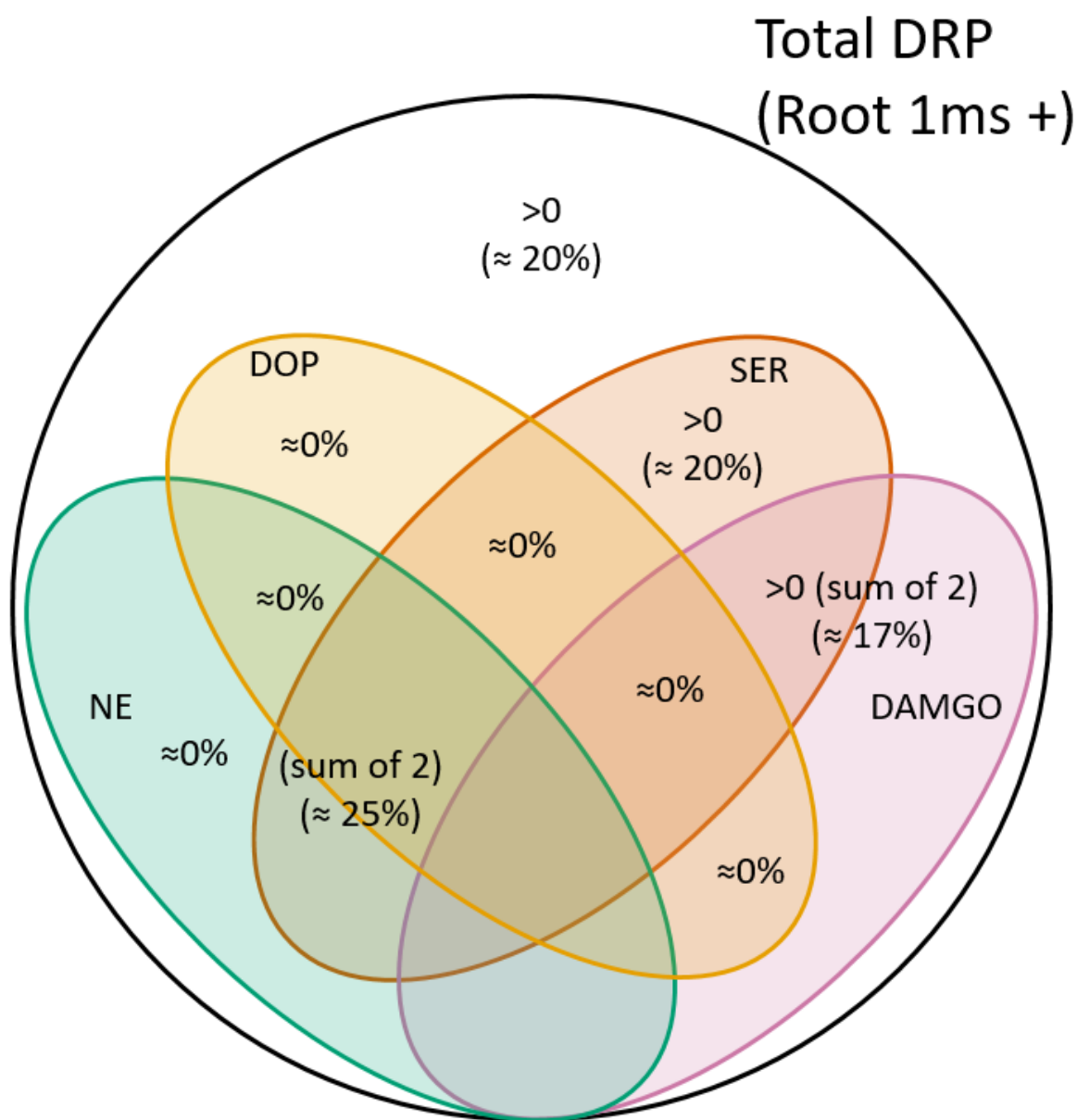


Рис. 3.53. Попередня схема конвергенції між впливом розглянутих нейромодуляторних систем на пресинаптичне інгібування сенсорних входів.

Майбутні дослідження зможуть доповнити карту взаємодій між нейромодуляторними системами. В контексті низхідної регуляції ноцицептивних входів особливої уваги заслуговує порівняння взаємодії окремо між А- та С-викликаними відповідями.

В результаті проведених досліджень щодо ролі нейромодуляторних систем у низхідній регуляції ноцицептивних мереж спинного мозку, нами були зроблені наступні висновки:

Вимірювання потенціалів дорзального корінця доводять, що норадреналін, допамін, серотонін та ендogenous опіоїди беруть участь в пресинаптичному гальмуванні первинних аферентів та відіграють важливу роль у низхідному контролі ноцицептивної сигналізації

Механізми дії вищезгаданих медіаторів на клітинному рівні значною мірою перетинаються між собою.

Результати, висвітлені у даній частині було представлено у тезах/виступах на конференціях:

А. Андрієвська, **І. Блащак**, О. Галайдич, А. Нечай, В. Кротов, П. Білан, Роль низхідних шляхів у регуляції нейронних мереж десятої пластинки спинного мозку, *IX Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології»*, 2025, Київ, Україна

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У цій роботі ми використали *ex-vivo* препарат спинного мозку з збереженими дорзальними корінцями та низхідними шляхами задньобічного канатика для реєстрації активності нейронів пластини І та пластини Х, які зберегли свою дендритну структуру, первинні аферентні входи, синаптичне забезпечення від внутрішніх спінальних мереж і низхідних трактів із РВДМ, а також інших супраспінальних структур. Такий підхід вперше дозволив нам ідентифікувати різні аспекти низхідної модуляції ноцицептивного входу в цих ділянках поперекового спинного мозку, що відповідають за обробку соматосенсорної та вісцеральної ноцицепції. Зокрема, наші результати свідчать про диференційований пресинаптичний об'ємний контроль первинних аферентів і локальної мережі в поперековій пластині Х з боку низхідних проєкцій у дорзолатеральному канатику. Використовуючи оптогенетичні методи, ми також продемонстрували потужний контроль активності нейронів пластини І та первинних аферентних входів до цієї частини спинного мозку, що здійснюється низхідними шляхами, які походять із ростровентромедіальної медули (RVM). Загалом, наші результати свідчать про сильну та точну низхідну модуляцію соматосенсорної та вісцеральної ноцицепції у відповідних ділянках локальних мереж спинного мозку та проливають світло на конкретні молекулярні й клітинні механізми такої модуляції.

4.1 Низхідні шляхи дорзолатерального канатика

Низхідний контроль ноцицепції, що здійснюється структурами стовбура мозку, зокрема ростровентромедіальним довгастим мозком (РВДМ), периакведуктальною сірою речовиною та блакитною плямою, привернув значну увагу завдяки своїй ролі в модуляції болю та регуляції передачі ноцицептивних сигналів у дорзальному розі. Ці області містять нейрони, які активуються або пригнічуються під дією ноцицептивних стимулів і відомі як клітини ON та OFF.

Вони беруть участь у реалізації аналгезії, викликаній стресом, і здатні спричинити знеболювальний ефект при прямій електричній стимуляції. Останні дослідження виявили специфічні популяції спінальних проєкційних нейронів у складі РДВМ, які залучені до сенсорної, моторної та автономної регуляції. Ці нейрони можуть частково перекриватися з класично визначеними клітинами ON та OFF, беручи участь у низхідному контролі ноцицепції. Варто зазначити, що нещодавнє дослідження виявило інгібуючий низхідний шлях, що походить із парамедіанної кори і чинить потужний контроль над ноцицептивним сенсорним входом до мозку, розширюючи відомі схеми низхідної регуляції болю.

Дорзолатеральний канатик є основним шляхом для цих трактів, що потенційно модулюють біль, і забезпечує низхідні входи до ноцицептивних пластинок I та X у складі люмбарної частини спинного мозку. Згідно з сучасними дослідженнями на гризунах (мишах і щурах), тракти, які безпосередньо іннервують нейрони цих пластин і проходять через дорзолатеральний канатик, включають ГАБА- та енкефалінергічні, серотонергічні, норадренергічні та допамінергічні волокна (Bullitt & Light, 1989; Fauss et al., 2022).

4.2. Низхідна модуляція у десятій пластинці люмбарної частини спинного мозку

Як було вказано вище нейрони ростровентромедіальної медули (РВДМ) та періакведуктальної сірої речовини, що проєктуються до спинного мозку через задньобічний канатик, мають у своєму складі ON та OFF нейрони, які відповідно активуються або пригнічуються під дією ноцицептивних стимулів. OFF нейрони суттєво кількісно переважають ON нейрони і тому ми вважаємо, що стимуляція задньобічного канатика повинна призводити до модуляції мереж спинного мозку, яка характерна саме для активності OFF клітин, а саме до інгібування ноцицепції. Крім того, відомо, що OFF нейрони постійно генерують пачки потенціалів дії з частотою 5-20 Hz та тривалістю близько 10 секунд. Попередні результати інших лабораторій (Bullitt & Light, 1989; Fauss et al., 2022), а також наші власні результати з міченням низхідних шляхів з РВДМ за допомогою

аденоасоційованих вірусів безпосередньо демонструють наявність аксонів низхідних шляхів у пластинці X лумбарного спинного мозку. Саме тому ми вирішили стимулювати низхідні аксони задньобічного канатика безпосередньо перед однократною ноцицептивною стимуляцією дорзального корінця, що призводить до активації первинних аферентів у десятій пластинці. На нашу думку такий дизайн експерименту вперше дозволив безпосередньо симулювати ендогенну низхідну модуляцію ноцицептивних входів до спинного мозку. Крім того, ми використали *ex-vivo* препарат половинного спинного мозку розроблений у нашій лабораторії разом з бічним інфрачервоним освітленням, що дозволив нам візуалізувати нейрони для проведення патч-клеп досліджень та вперше зареєстрували постсинаптичні струми і потенціали дії нейронів поперекової пластинки X на електричну стимуляцію первинних аферентів за природніх патернів низхідної активності OFF клітин.

Ми виявили, що стимуляція задньобічного канатика з патерном, подібним до активності OFF клітин у РВДМ, викликала майже повне пресинаптичне інгібування входів первинних аферентів і значний інгібуючий вплив на збуджувальну та гальмівну активність мережі нейронів в пластині X. Крім того, стимуляція задньобічного канатика майже повністю подавляла генерацію потенціалів дії нейронів пластинки X у відповідь на стимуляцію дорзальних корінців через пресинаптичну дію на термінали первинних аферентів та локальних інтернейронів. Входи первинних аферентів та збуджувальна активність, зумовлена мережею, поступово та диференційовано модулюються частотою та тривалістю розрядів задньобічного канатика у часовому вікні 10–50 с. Таким чином, розряди OFF клітин РВДМ, ймовірно, визначають чутливість нейронів пластинки X до активації як первинних аферентів, так і входів від локальних нейронів, регулюючи тим самим ноцицепцію. Сильна та тривала активація низхідних шляхів спочатку призводила до майже повного блокування входу первинних аферентів до нейронів пластинки X, а потім до поступового зменшення цього блокування, ймовірно, через виснаження везикул у пресинаптичних терміналях низхідних волокон. Ми також вважаємо, що

активність низхідних шляхів призводить до поступового накопичення вивільнених нейромоделюляторів у позаклітинному просторі пластинки Х, що здійснює пресинаптичний контроль над локальними мережами. Вивільнені нейромоделюлятори залишаються в позаклітинному просторі протягом багатьох десятків секунд після припинення низхідної активності. Таким чином, вивільнення, дифузія, зворотне захоплення та розщеплення нейромедіаторів визначають просторово-часові закономірності їхньої дії в пластинці Х у часовому масштабі десятків секунд. Отже, ефективність низхідного контролю є компромісом між вивільненням, дифузією та повторним захопленням нейромоделюляторів і відновленням резерву секреторних везикул.

Нами також було показано, що застосування норадреналіну, одного з нейромедіаторів, які виділяються у спинному мозку при стимуляції задньобічного канатика, викликало в частини нейронів пластинки Х ефекти, подібні до тих, що спричинені його прямою стимуляцією. Водночас, прикладання норадреналіну приводило до значної оклюзії дії стимуляції задньобічного канатика. Все це свідчить про важливу роль адренергічної системи в низхідному контролі, опосередкованому РВДМ. Таким чином, ми дійшли до висновку, що активність низхідних шляхів призводить до поступового накопичення вивільнених нейромоделюляторів в позаклітинному середовищі пластинки Х, що спричиняє повільну пресинаптичну деполяризацію, яка забезпечує потужний контроль над первинними аферентами та локальною мережею (Рис. 4.1).

Загалом ефекти нейромедіаторів, що виділяються низхідними шляхами у спинному мозку доцільно досліджувати, як електрофізіологічними так і флуоресцентними методами. Останні дозволяють визначати як концентрацію внутрішньоклітинного кальцію, так і кальцієві транзйенти, що повинні виникати в первинних аферентах (Huang et al., 2019) та нейронах десятої пластинки (Krotov et al., 2017) під час деполяризацій викликаних виділенням нейромедіаторів низхідних шляхів (François et al., 2017). Дослідження змін внутрішньоклітинного кальцію у декількох сотнях первинних аферентів в одному досліді з

використанням флуоресцентних підходів дозволить швидко і суттєво поглибити наші знання щодо нейромедіаторних механізмів низхідної регуляції та механізмів, які опосередковують гострий, нейропатичний, запальний та інші види болю. Попередні результати отримані в нашій лабораторії (Andrianov et al., 2025; Krotov et al., 2017) та результати даної роботи безперечно підтримують необхідність подальшого запровадження цих підходів.

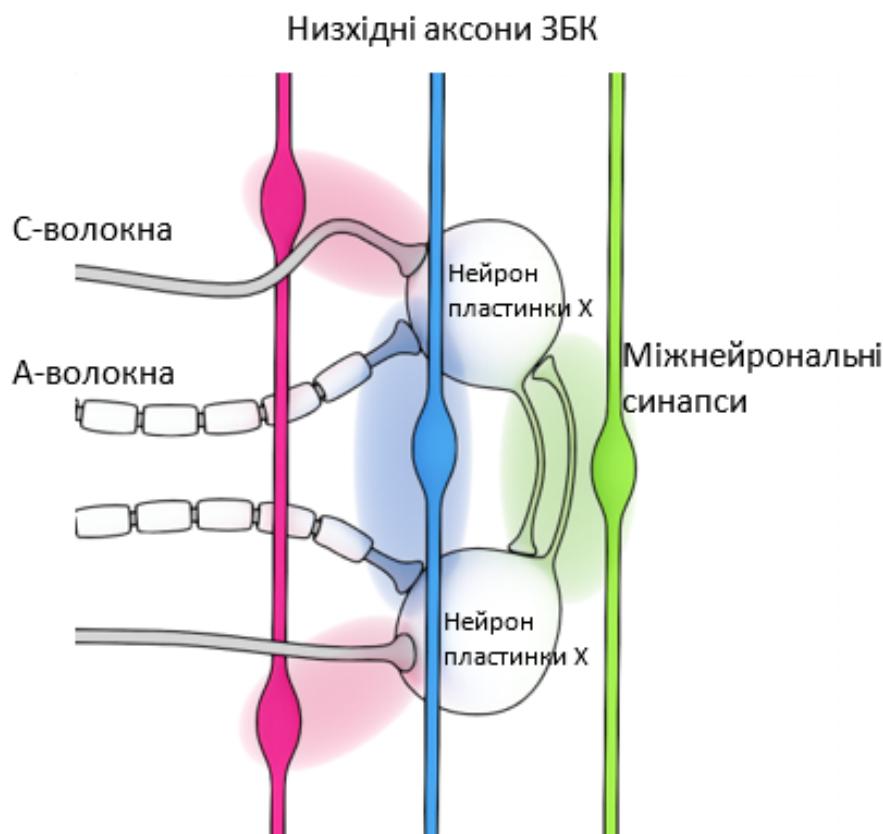


Рис. 4.1. Загальна схема механізму низхідної модуляції ноцицепції в пластинці X лумбарного відділу спинного мозку

На рисунку 4.1 зображена схема механізму низхідної модуляції ноцицепції в пластинці X лумбарного відділу спинного мозку, запропонована на основі проведених нами досліджень. В попередніх дослідженнях (Krotov et al., 2019) нами було показано, що нейрони пластинки X мають прямі синаптичні входи сенсорних (А-волокна) та ноцицептивних (С-волокна) первинних аферентів. Сама мережа нейронів пластинки X має потужну сітку міжнейронних синаптичних контактів. Ці міжнейронні синапси є основою для довготривалого

(багато секунд) підвищення мережевої активності після однієї короткої (1 мс) стимуляції дорзальних корінців вперше показаній у цій роботі у більшості досліджених нейронів. Нами було показано, що як синапси первинних аферентів, так міжнейронні синапси знаходяться під потужним диференційним пресинаптичним контролем з боку низхідних шляхів у складі дорзолатерального канатика (показані, як аксони різних кольорів). Різна залежність інгібування моно-/полісинаптичних входів первинних аферентів та мережевої активності нейронів пластинки X від частоти та кількості стимуляцій низхідних волокон прямо демонструє те що, різні, найбільш вірогідно синаптичні механізми, опосередковують це інгібування (зелений колір позначає модуляцію міжнейронних синаптичних контактів, в той час як червоний і синій позначають модуляцію первинних аферентів). Самі первинні аферентні входи також модулюються окремо. В експериментах це вперше було продемонстровано, як різна за величиною та іншими параметрами залежність інгібування А- та С-моносинаптичних струмів, що зареєстровані в одних і тих же нейронах пластинки X від частоти та кількості стимуляцій низхідних волокон (синій колір показує модуляцію А-волокон, в той час, як червоний демонструє модуляцію С-волокон). Наші результати також демонструють накопичувальний характер ефекту модуляції та дуже поступове (десятки секунд) його припинення, що повністю узгоджується з моделлю поступового накопичення нейромодуляторів низхідних шляхів навколо нейронів та синапсів у мережах пластинки X за рахунок їх вивільнення з бутонів аксонів низхідних волокон та повільного зниження концентрації нейромодуляторів за рахунок дифузії після закінчення стимуляції низхідних волокон. Таким чином, волюметричні синаптичні механізми найбільш вірогідно задіяні у низхідній регуляції вісцеральної ноцицепції у люмбарному відділі спинного мозку щурів.

4.3 Низхідна модуляція у першій пластинці люмбарної частини спинного мозку

На жаль, дослідження низхідної регуляції спинномозкових мереж залишається методологічно складною проблемою. Спинномозкові та супраспинальні структури просторово розділені – навіть у мишей вони знаходяться на відстані кількох сантиметрів одна від одної – що ускладнює збереження обох для функціональних досліджень.

Для дослідження низхідної модуляції болю у першій пластинці люмбарної частини спинного мозку, опосередкованої структурами стовбура мозку нами було запропоновано та розроблено новітній підхід заснований на використанні оптогенетики у поєднанні з ex-vivo препаратом спинного мозку. Нами було показано, що запропонований підхід дозволяє досліджувати низхідну модуляцію, залежну від РВДМ, у різноманітних моделях болю, зокрема при периферичному запаленні, індукованому повним ад'ювантом Фройнда, та при невропатії, спричиненій частковим ушкодженням периферичного нерва. Цей підхід також легко адаптується для вивчення модуляції, опосередкованої іншими надспинальними структурами, такими як дорзальне ретикулярне ядро та парабрахіальне ядро.

Важливою перевагою новітнього підходу є можливість інтеграції методів маркування специфічних популяцій нейронів. Наприклад, використання трансгенних мишей із GFP-міткою, експресованою під різними промоторами (Bockamp et al., 2008), дозволяє дослідити низхідну модуляцію, залежну від РВДМ, глутаматергічних, ГАМК-ергічних та гліцинергічних нейронів пластинки I. Крім того, ретроградне маркування за допомогою Fluorogold (Mondello et al., 2016; Wessendorf, 1991) відкриває можливість вивчення модуляції проєкційних нейронів пластинки I, специфічної популяції, що передає ноцицептивну інформацію зі спинного мозку до надспинальних центрів.

Електрофізіологічні записи з нейронів пластинки I можуть бути доповнені вимірюванням кальцієвих транзієнтів із використанням як

мембранонепроникних, так і генетично закодованих червоних флуоресцентних кальцієвих індикаторів. Це розширює можливості аналізу активності нейронів у реальному часі.

Новітній підхід також може бути адаптований для використання у молодих щурах. Оскільки записи з пластинки I можливі лише у тварин віком до P30, це потребує стереотаксичного введення конструктів у зону РВДМ в новонароджених щурів (P5–P7), що становить значні технічні труднощі, але відкриває перспективи для дослідження ранніх етапів формування низхідних механізмів контролю болю.

РВДМ містить кілька класів нейронів, що проєктуються до спинного мозку, і вважається критично важливою для низхідної регуляції ноцицептивних шляхів (De Preter & Heinricher, 2024), однак механізми цієї регуляції залишаються недостатньо вивченими. У цьому дослідженні ми вивчали механізми такої модуляції, використовуючи запропонований новітній підхід. Дорослим мишам у РВДМ було введено вектор AAV9-YFP-ChR2, що призвело до сильної експресії ChR2 в аксонах у межах дорзолатерального канатика та сірої речовини поперекового спинного мозку, з найвищою експресією у пластинах I та X. Ми проводили петч-клемп записи нейронів пластинки I в інтактному препараті спинного мозку під час стимуляції дорзальних корінців. Аксони РВДМ що експресують ChR2, стимулювалися оптично (10 мс @480 нм, 5 Гц) через об'єктив мікроскопа. Такий підхід дозволив дослідити входи від низхідних волокон і їхній вплив на відповіді, зумовлені стимуляцією первинних аферентів. Ми виявили, що частина нейронів пластинки I отримує моно- та полісинаптичні гальмівні входи від аксонів РВДМ. У попередніх дослідженнях різних наукових груп підтверджено наявність прямих гальмівних сигналів від нейронів РВДМ до інтернейронів дорзального рогу (Aicher et al., 2012; François et al., 2017). Водночас виявлення полісинаптичних гальмівних відповідей свідчить про можливе існування ще неописаної субпопуляції збуджувальних нейронів РВДМ, що проєктуються в спинний мозок.

Важливо, що полісинаптичні збуджувальні постсинаптичні струми, викликані стимуляцією дорзального корінця, значно зменшувалися при фотостимуляції аксонів РВДМ. Крім того, спостерігалось зниження амплітуди моносинаптичних EPSC, викликаних стимуляцією первинних аферентів, що вказує на можливий механізм прямої пресинаптичної інгібіції в рамках низхідного контролю. Таким чином, наше дослідження свідчить про складні та різноманітні шляхи низхідної модуляції нейронів пластинки I з боку РВДМ, опосередковані як пресинаптичними, так і постсинаптичними механізмами (Рис. 4.2).

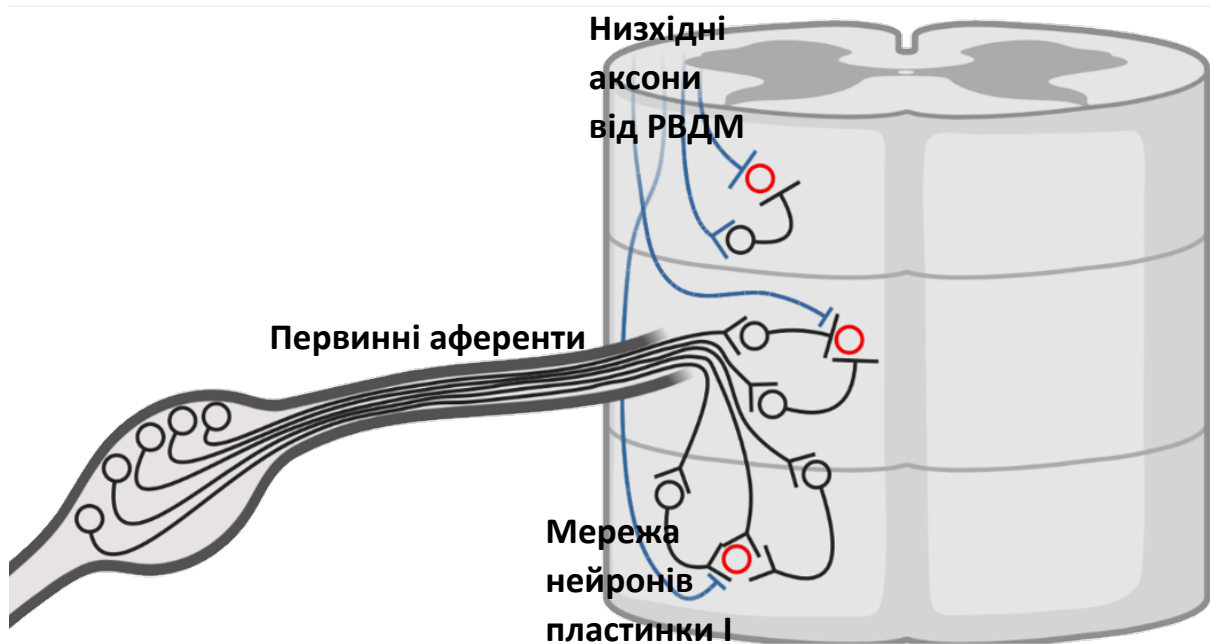


Рис. 4.2. Загальна схема механізму низхідної модуляції ноцицепції в пластинці I лумбарного відділу спинного мозку

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до мети та поставлених завдань був розроблений новітній підхід щодо досліджень низхідної регуляції у ноцицептивних пластинах лямбарної частини спинного мозку гризунів, що вперше дозволив дослідити дану регуляцію у препараті, який зберігає дендритні структури, первинні аферентні входи, синаптичні входи від внутрішніх спинальних мереж та низхідних трактів із ростровентромедіального довгастого мозку, а також інших супраспинальних структур. За допомогою цього підходу та оптогенетичних, електрофізіологічних і флуоресцентних методів проведено дослідження низхідної регуляції нейронних мереж першої та десятої пластин лямбарного відділу спинного мозку гризунів. За результатами проведених експериментів було зроблено наступні висновки.

- Нейрони ноцицептивних мереж пластинки X спинного мозку перебувають під значним низхідним контролем з боку шляхів у складі ЗБК.
- Модуляторна дія низхідних шляхів ЗБК на ноцицептивні входи до нейронів пластинки X залежить від частоти та тривалості їх активності.
- Розроблена методика специфічної експресії ChR2-кодуючого конструкту в ростровентромедіальних нейронах довгастого мозку (РВДМ), яка дозволяє селективно активувати аксони та терміналі низхідних волокон РВДМ у ex-vivo препараті цілого спинного мозку.
- Активація низхідних аксонів від РВДМ викликає моно- та полісинаптичні гальмівні відповіді у нейронах пластинки I.
- Активація низхідних аксонів від РВДМ пресинаптично контролює як збудження, так і гальмування у мережах нейронів пластинки I.
- Показано, що нейромедіатори, які виділяються низхідними шляхами у спинному мозку, а саме норадреналін, допамін, серотонін та ендogenous опіоїди, конвергентно залучені до пресинаптичного інгібування первинних аферентів.

Таким чином нами показано, що активність низхідних шляхів, що відповідає ендогенній, опосередковує потужний контроль нейронних мереж спинного мозку гризунів за допомогою одночасного пре- та постсинаптичного інгібування, що свідчить про точну низхідну модуляцію соматосенсорної та вісцеральної ноцицепції у першій та десятій пластинках спинного мозку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abaira, V. E., & Ginty, D. D. (2013). The Sensory Neurons of Touch. *Neuron*, 79(4), 618–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.051>
2. 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), 19231. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55462-7>
3. Aicher, S. A., Hermes, S. M., Whittier, K. L., & Hegarty, D. M. (2012). Descending projections from the rostral ventromedial medulla (RVM) to trigeminal and spinal dorsal horns are morphologically and neurochemically distinct. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 43(2), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.11.002>
4. Alexander, G. M., Rogan, S. C., Abbas, A. I., Armbruster, B. N., Pei, Y., Allen, J. A., Nonneman, R. J., Hartmann, J., Moy, S. S., Nicolelis, M. A., McNamara, J. O., & Roth, B. L. (2009). Remote Control of Neuronal Activity in Transgenic Mice Expressing Evolved G Protein-Coupled Receptors. *Neuron*, 63(1), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.014>
5. Allard, J. (2019). Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the mouse. *The Journal of Physiology*, 597(7), 2097–2113. <https://doi.org/10.1113/JP277447>
6. Alluisetti, G., Van Impe, E., Weinmann, W., & Grafinger, K. E. (2025). Material matters: Evaluating polymer 96-well plates to reduce DAMGO loss in LC-MS/MS-based in vitro μ -opioid structure affinity assay. *Talanta Open*, 12, 100543. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2025.100543>
7. Andrianov, Y. E., Keyes, A. L., Warwick, C. A., McDonough, M. C., Shutov, L. P., Solanki, K. S., Resch, J. M., Bassuk, A. G., Voitenko, N., Belan, P., & Usachev, Y. M. (2025). Activation of TRPA1 and TRPM3 triggers Ca^{2+} waves in central terminals of sensory neurons and facilitates synaptic activity in the spinal dorsal horn. *The Journal of Physiology*, JP286407. <https://doi.org/10.1113/JP286407>
8. Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S., & Roth, B. L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 5163–5168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700293104>

9. Bandler, R., Keay, K. A., Floyd, N., & Price, J. (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. Passive emotional coping. *Brain Research Bulletin*, 53(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00313-0)
10. Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1979). The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: Further studies on the anatomy of pain modulation. *Journal of Comparative Neurology*, 187(3), 513–531. <https://doi.org/10.1002/cne.901870304>
11. Basbaum, A. I., Godefroy, F., & Weil-Fugazza, J. (1987). A new microdissection technique for regional biochemical analysis of the rat spinal cord: Serotonin, norepinephrine, dopamine and uric acid. *Brain Research*, 419(1–2), 229–238. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90588-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90588-9)
12. Benarroch, E. E. (2012). Periaqueductal gray: An interface for behavioral control. *Neurology*, 78(3), 210–217. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdee>
13. Birder, L. A., & Perl, E. R. (1999). Expression of alpha2-adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. *The Journal of Physiology*, 515 (Pt 2)(Pt 2), 533–542. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.533ac.x>
14. Bockamp, E., Sprengel, R., Eshkind, L., Lehmann, T., Braun, J. M., Emmrich, F., & Hengstler, J. G. (2008). Conditional Transgenic Mouse Models: From the Basics to Genome-Wide Sets of Knockouts and Current Studies of Tissue Regeneration. *Regenerative Medicine*, 3(2), 217–235. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.2.217>
15. Bouchet, C. A., & Ingram, S. L. (2020). Cannabinoids in the descending pain modulatory circuit: Role in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 209, 107495. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107495>
16. Boyle, P. M., Williams, J. C., Ambrosi, C. M., Entcheva, E., & Trayanova, N. A. (2013). A comprehensive multiscale framework for simulating optogenetics in the heart. *Nature Communications*, 4(1), 2370. <https://doi.org/10.1038/ncomms3370>
17. Bradaia, A., & Trouslard, J. (2002). Nicotinic receptors regulate the release of glycine onto lamina X neurones of the rat spinal cord. *Neuropharmacology*, 43(6), 1044–1054. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00121-1)
18. Brassai, A., Suvanjeviev, R.-G., Bán, E.-Gy., & Lakatos, M. (2015). Role of synaptic and nonsynaptic glutamate receptors in ischaemia induced

neurotoxicity. *Brain Research Bulletin*, 112, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.12.007>

19. Brodin, E., Ernberg, M., & Olgart, L. (2016). Neurobiology: General considerations - from acute to chronic pain. *Den norske tannlegeforenings Tidende*, 126(1), 28–33. <https://doi.org/10.56373/2016-1-6>
20. Browne, T. J., Smith, K. M., Gradwell, M. A., Iredale, J. A., Dayas, C. V., Callister, R. J., Hughes, D. I., & Graham, B. A. (2021). Spinoparabrachial projection neurons form distinct classes in the mouse dorsal horn. *Pain*, 162(7), 1977–1994. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002194>
21. Bullitt, E., & Light, A. R. (1989). Intraspinous course of descending serotonergic pathways innervating the rodent dorsal horn and lamina X. *Journal of Comparative Neurology*, 286(2), 231–242. <https://doi.org/10.1002/cne.902860208>
22. Carlson, J. D., Maire, J. J., Martenson, M. E., & Heinricher, M. M. (2007). Sensitization of pain-modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(48), 13222–13231. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3715-07.2007>
23. Cervero, F., & Laird, J. M. A. (2004). Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 45–54. <https://doi.org/10.1002/neu.20084>
24. Chen, Q., & Heinricher, M. M. (2019). Descending Control Mechanisms and Chronic Pain. *Current Rheumatology Reports*, 21(5), 13. <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0813-1>
25. Chojnowski, K., Opielka, M., Nazar, W., Kowianski, P., & Smolenski, R. T. (2021). Neuroprotective Effects of Guanosine in Ischemic Stroke—Small Steps towards Effective Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6898. <https://doi.org/10.3390/ijms22136898>
26. Chung, G., Shim, H. G., Kim, C. Y., Ryu, H.-H., Jang, D. C., Kim, S. H., Lee, J., Kim, C.-E., Kim, Y. K., Lee, Y.-S., Kim, J., Kim, S. K., Worley, P. F., & Kim, S. J. (2020). Persistent Activity of Metabotropic Glutamate Receptor 5 in the Periaqueductal Gray Constrains Emergence of Chronic Neuropathic Pain. *Current Biology*, 30(23), 4631–4642.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.008>
27. Cui, M., Honore, P., Zhong, C., Gauvin, D., Mikusa, J., Hernandez, G., Chandran, P., Gomtsyan, A., Brown, B., Bayburt, E. K., Marsh, K., Bianchi, B., McDonald, H., Niforatos, W., Neelands, T. R., Moreland, R. B., Decker, M.

- W., Lee, C.-H., Sullivan, J. P., & Faltynek, C. R. (2006). TRPV1 Receptors in the CNS Play a Key Role in Broad-Spectrum Analgesia of TRPV1 Antagonists. *The Journal of Neuroscience*, 26(37), 9385–9393.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1246-06.2006>
28. Das Gupta, R. R., Scheurer, L., Pelczar, P., Wildner, H., & Zeilhofer, H. U. (2021). Neuron-specific spinal cord translatomes reveal a neuropeptide code for mouse dorsal horn excitatory neurons. *Scientific Reports*, 11(1), 5232.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84667-y>
29. Dayton, R. D., Wang, D. B., & Klein, R. L. (2012). The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(6), 757–766.
<https://doi.org/10.1517/14712598.2012.681463>
30. De Preter, C. C., & Heinricher, M. M. (2024). The ‘in’s and out’s’ of descending pain modulation from the rostral ventromedial medulla. *Trends in Neurosciences*, S016622362400064X.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2024.04.006>
31. Deng, J., Zhou, H., Lin, J.-K., Shen, Z.-X., Chen, W.-Z., Wang, L.-H., Li, Q., Mu, D., Wei, Y.-C., Xu, X.-H., & Sun, Y.-G. (2020). The Parabrachial Nucleus Directly Channels Spinal Nociceptive Signals to the Intralaminar Thalamic Nuclei, but Not the Amygdala. *Neuron*, 107(5), 909-923.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.06.017>
32. Drake, R. A. R., Leith, J. L., Almahasneh, F., Martindale, J., Wilson, A. W., Lumb, B., & Donaldson, L. F. (2016). Periaqueductal Grey EP3 Receptors Facilitate Spinal Nociception in Arthritic Secondary Hypersensitivity. *Journal of Neuroscience*, 36(35), 9026–9040.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4393-15.2016>
33. Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S., & Kandori, H. (2014). Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews*, 114(1), 126–163.
<https://doi.org/10.1021/cr4003769>
34. Everaerts, W., Gees, M., Alpizar, Y. A., Farre, R., Leten, C., Apetrei, A., Dewachter, I., Van Leuven, F., Vennekens, R., De Ridder, D., Nilius, B., Voets, T., & Talavera, K. (2011). The Capsaicin Receptor TRPV1 Is a Crucial Mediator of the Noxious Effects of Mustard Oil. *Current Biology*, 21(4), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.031>
35. Fauss, G. N. K., Hudson, K. E., & Grau, J. W. (2022). Role of Descending Serotonergic Fibers in the Development of Pathophysiology after Spinal Cord

- Injury (SCI): Contribution to Chronic Pain, Spasticity, and Autonomic Dysreflexia. *Biology*, 11(2), 234. <https://doi.org/10.3390/biology11020234>
36. Fernandes, E. C., Pechincha, C., Luz, L. L., Kokai, E., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2020). Primary afferent-driven presynaptic inhibition of C-fiber inputs to spinal lamina I neurons. *Progress in Neurobiology*, 188, 101786. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101786>
 37. Fields, H., Bry, J., Hentall, I., & Zorman, G. (1983). The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *The Journal of Neuroscience*, 3(12), 2545–2552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-12-02545.1983>
 38. Fields, H. L., & Heinricher, M. M. (1985). Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 308(1136), 361–374. <https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0037>
 39. Fields, H. L., Malick, A., & Burstein, R. (1995). Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *Journal of Neurophysiology*, 74(4), 1742–1759. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.4.1742>
 40. Fitzgerald, M., & Koltzenburg, M. (1986). The functional development of descending inhibitory pathways in the dorsolateral funiculus of the newborn rat spinal cord. *Developmental Brain Research*, 24(1–2), 261–270. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(86\)90194-X](https://doi.org/10.1016/0165-3806(86)90194-X)
 41. François, A., Low, S. A., Sypek, E. I., Christensen, A. J., Sotoudeh, C., Beier, K. T., Ramakrishnan, C., Ritola, K. D., Sharif-Naeini, R., Deisseroth, K., Delp, S. L., Malenka, R. C., Luo, L., Hantman, A. W., & Scherrer, G. (2017). A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins. *Neuron*, 93(4), 822-839.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.008>
 42. Giroux, N., Rossignol, S., & Reader, T. A. (1999). Autoradiographic study of alpha1- and alpha2-noradrenergic and serotonin1A receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *The Journal of Comparative Neurology*, 406(3), 402–414.
 43. Gomez, J. L., Bonaventura, J., Lesniak, W., Mathews, W. B., Sysa-Shah, P., Rodriguez, L. A., Ellis, R. J., Richie, C. T., Harvey, B. K., Dannals, R. F., Pomper, M. G., Bonci, A., & Michaelides, M. (2017). Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*, 357(6350), 503–507. <https://doi.org/10.1126/science.aan2475>

44. Gutierrez-Mecinas, M., Furuta, T., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2016). A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I-III of the mouse spinal cord. *Molecular Pain*, 12, 1744806916629065. <https://doi.org/10.1177/1744806916629065>
45. Hachisuka, J., Omori, Y., Chiang, M. C., Gold, M. S., Koerber, H. R., & 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>
46. Handa, B. K., Lane, A. C., Lord, J. A. H., Morgan, B. A., Rance, M. J., & Smith, C. F. C. (1981). Analogues of β -LPH61–64 possessing selective agonist activity at μ -opiate receptors. *European Journal of Pharmacology*, 70(4), 531–540. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(81\)90364-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(81)90364-2)
47. Hao, S., Shi, W., Liu, W., Chen, Q.-Y., & Zhuo, M. (2023). Multiple modulatory roles of serotonin in chronic pain and injury-related anxiety. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 15, 1122381. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2023.1122381>
48. Hayashida, K., & Obata, H. (2019). Strategies to Treat Chronic Pain and Strengthen Impaired Descending Noradrenergic Inhibitory System. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 822. <https://doi.org/10.3390/ijms20040822>
49. Heinricher, M. M. (2016). Pain Modulation and the Transition from Acute to Chronic Pain. In C. Ma & Y. Huang (Eds.), *Translational Research in Pain and Itch* (Vol. 904, pp. 105–115). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7537-3_8
50. Heinricher, M. M., & Ingram, S. L. (2008). The Brainstem and Nociceptive Modulation. In *The Senses: A Comprehensive Reference* (pp. 593–626). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012370880-9.00183-3>
51. Heinricher, M. M., Morgan, M. M., & Fields, H. L. (1992). Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience*, 48(3), 533–543. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90400-V](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90400-V)
52. Heinricher, M. M., Morgan, M. M., Tortorici, V., & Fields, H. L. (1994). Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, 63(1), 279–288. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90022-1)
53. Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*, 60(1), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009>

54. Holstege, J. C., & Bongers, C. M. H. (1991). Ultrastructural aspects of the coeruleo-spinal projection. In *Progress in Brain Research* (Vol. 88, pp. 143–156). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63804-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63804-2)
55. Hryciw, G., Wong, J., & Heinricher, M. M. (2023). Brainstem pain-modulating neurons are sensitized to visual light in persistent inflammation. *Neurobiology of Pain*, 13, 100111. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2022.100111>
56. Huang, J., Gadotti, V. M., Chen, L., Souza, I. A., Huang, S., Wang, D., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Zhang, Z., & Zamponi, G. W. (2019). A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. *Nature Neuroscience*, 22(10), 1659–1668. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0481-5>
57. Iwasaki, M., Lefevre, A., Althammer, F., Clauss Creusot, E., Łapies, O., Petitjean, H., Hilfiger, L., Kerspern, D., Melchior, M., Küppers, S., Krabichler, Q., Patwell, R., Kania, A., Gruber, T., Kirchner, M. K., Wimmer, M., Fröhlich, H., Dötsch, L., Schimmer, J., ... Charlet, A. (2023). An analgesic pathway from parvocellular oxytocin neurons to the periaqueductal gray in rats. *Nature Communications*, 14(1), 1066. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36641-7>
58. James, S. (2013). Human pain and genetics: Some basics. *British Journal of Pain*, 7(4), 171–178. <https://doi.org/10.1177/2049463713506408>
59. Keay, K. A., & Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(7–8), 669–678. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00049-5)
60. Kim, E. J., Kong, M.-S., Park, S., Cho, J., & Kim, J. J. (2024). Periaqueductal gray activates antipredatory neural responses in the amygdala of foraging rats. *eLife*, 12, RP88733. <https://doi.org/10.7554/eLife.88733.4>
61. Koroid, K. V., Blashchak, I. O., & Romanenko, S. V. (2024). The Role of TRPV1 and Glutamate Receptors in the Synaptic Activity of Lamina X Neurons of the Rat Spinal Cord. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 70(5), 49–55. <https://doi.org/10.15407/fz70.05.049>
62. Kosiak, V. (2020). *Visualization of descending pain regulation pathways in mice. Master thesis* [Master thesis]. Kiev Academic University.
63. Kozai, T. D. Y., & Vazquez, A. L. (2015). Photoelectric artefact from optogenetics and imaging on microelectrodes and bioelectronics: New challenges and opportunities. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(25), 4965–4978. <https://doi.org/10.1039/C5TB00108K>

64. Krotov, V., Agashkov, K., Krasniakova, M., Safronov, B. V., Belan, P., & Voitenko, N. (2022). Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X. *Pain*, 163(10), 2014–2020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002597>
65. Krotov, V., Agashkov, K., Romanenko, S., Halaidych, O., Andrianov, Y., Safronov, B. V., Belan, P., & Voitenko, N. (2023). Elucidating afferent-driven presynaptic inhibition of primary afferent input to spinal laminae I and X. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 1029799. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1029799>
66. Krotov, V., Belan, P., & Voitenko, N. (2024). Approach for Electrophysiological Studies of Spinal Lamina X Neurons. *Bio-Protocol*, 14(14), e5035. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5035>
67. Krotov, V., Blashchak, I., Moore, J., Moore, A., Romanenko, S., Voitenko, N., & Belan, P. (2025). Optogenetic Approach for Investigating Descending Control of Nociception in Ex Vivo Spinal Cord Preparation. *BIO-PROTOCOL*, 15(1383). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5483>
68. Krotov, V., Tokhtamysh, A., Kopach, O., Dromaretsky, A., Sheremet, Y., Belan, P., & Voitenko, N. (2017). 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>
69. 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>
70. Lantéri-Minet, M., Isnardon, P., De Pommery, J., & Menétrey, D. (1993). Spinal and hindbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins. *Neuroscience*, 55(3), 737–753. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90439-M](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90439-M)
71. Lee, C. H., & Ruben, P. C. (2008). Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels*, 2(6), 407–412. <https://doi.org/10.4161/chan.2.6.7429>
72. Lele, P. P., Weddell, G., & Williams, C. M. (1954). The relationship between heat transfer, skin temperature and cutaneous sensibility. *The Journal of Physiology*, 126(2), 206–234. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005204>
73. Lin, J. Y., Lin, M. Z., Steinbach, P., & Tsien, R. Y. (2009). Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics.

Biophysical Journal, 96(5), 1803–1814.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.034>

74. Linnman, C., Moulton, E. A., Barmettler, G., Becerra, L., & Borsook, D. (2012). Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the field. *NeuroImage*, 60(1), 505–522.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.095>
75. Lopez-Canul, M., Palazzo, E., Dominguez-Lopez, S., Luongo, L., Lacoste, B., Comai, S., Angeloni, D., Frascini, F., Boccella, S., Spadoni, G., Bedini, A., Tarzia, G., Maione, S., Granados-Soto, V., & Gobbi, G. (2015). Selective melatonin MT2 receptor ligands relieve neuropathic pain through modulation of brainstem descending antinociceptive pathways. *Pain*, 156(2), 305–317.
<https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460311.71572.5f>
76. Loyd, D. R., Wang, X., & Murphy, A. Z. (2008). Sex Differences in μ -Opioid Receptor Expression in the Rat Midbrain Periaqueductal Gray Are Essential for Eliciting Sex Differences in Morphine Analgesia. *The Journal of Neuroscience*, 28(52), 14007–14017. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4123-08.2008>
77. Lumb, B. M. (2004). Hypothalamic and Midbrain Circuitry That Distinguishes Between Escapable and Inescapable Pain. *Physiology*, 19(1), 22–26.
<https://doi.org/10.1152/nips.01467.2003>
78. 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. *The Journal of Physiology*, 588(22), 4489–4505. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197012>
79. Mason, P. (2005). DECONSTRUCTING ENDOGENOUS PAIN MODULATIONS. *Journal of Neurophysiology*, 94(3), 1659–1663.
<https://doi.org/10.1152/jn.00249.2005>
80. Mei, Y., & Zhang, F. (2012). Molecular Tools and Approaches for Optogenetics. *Biological Psychiatry*, 71(12), 1033–1038.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.02.019>
81. Melzack, R., & Wall, P. D. (1965). Pain Mechanisms: A New Theory: A gate control system modulates sensory input from the skin before it evokes pain perception and response. *Science*, 150(3699), 971–979.
<https://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>
82. Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00009-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00009-6)

83. Moayedi, M., & Davis, K. D. (2013). Theories of pain: From specificity to gate control. *Journal of Neurophysiology*, 109(1), 5–12.
<https://doi.org/10.1152/jn.00457.2012>
84. Mondello, S. E., Jefferson, S. C., O'Steen, W. A., & Howland, D. R. (2016). Enhancing Fluorogold-based neural tract tracing. *Journal of Neuroscience Methods*, 270, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.004>
85. Morrison, S. F., & Nakamura, K. (2019). Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annual Review of Physiology*, 81(1), 285–308.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114546>
86. Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., & Hegemann, P. (2002). Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae. *Science*, 296(5577), 2395–2398.
<https://doi.org/10.1126/science.1072068>
87. Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., & Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13940–13945.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>
88. Naser, P. V., & Kuner, R. (2018). Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience*, 387, 135–148.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.049>
89. Nashold, B. S., Wilson, W. P., & Slaughter, D. G. (1969). Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. *Journal of Neurosurgery*, 30(1), 14–24.
<https://doi.org/10.3171/jns.1969.30.1.0014>
90. Neubert, M. J., Kincaid, W., & Heinricher, M. M. (2004). Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. *Pain*, 110(1), 158–165.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.03.017>
91. Nguyen, E., Chiang, M. C., Nguyen, C., & Ross, S. E. (2023). Brainstem Modulation of Nociception by Periaqueductal Gray Neurons Expressing the μ -Opioid Receptor in Mice. *Anesthesiology*, 139(4), 462–475.
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000004668>
92. Nicholson, B. (2006). Differential diagnosis: Nociceptive and neuropathic pain. *The American Journal of Managed Care*, 12(9 Suppl), S256–262.
93. Oliva, V., Hartley-Davies, R., Moran, R., Pickering, A. E., & Brooks, J. C. (2022). Simultaneous brain, brainstem, and spinal cord pharmacological-fMRI

- reveals involvement of an endogenous opioid network in attentional analgesia. *eLife*, 11, e71877. <https://doi.org/10.7554/eLife.71877>
94. Peng, W.-H., Kan, H.-W., & Ho, Y.-C. (2022). Periaqueductal gray is required for controlling chronic stress-induced depression-like behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 593, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.01.025>
 95. Perl, E. R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 71–80. <https://doi.org/10.1038/nrn2042>
 96. Pertovaara, A. (1998). A Neuronal Correlate of Secondary Hyperalgesia in the Rat Spinal Dorsal Horn Is Submodality Selective and Facilitated by Supraspinal Influence. *Experimental Neurology*, 149(1), 193–202. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6688>
 97. Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, 80(2), 53–83. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.08.001>
 98. Pinto, V., Szûcs, P., Derkach, V. A., & Safronov, B. V. (2008). Monosynaptic convergence of C- and A δ -afferent fibres from different segmental dorsal roots on to single substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *The Journal of Physiology*, 586(17), 4165–4177. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154898>
 99. Pinto, V., Szucs, P., Lima, D., & Safronov, B. V. (2010). Multisegmental A δ - and C-Fiber Input to Neurons in Lamina I and the Lateral Spinal Nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 30(6), 2384–2395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3445-09.2010>
 100. Poe, G. R., Foote, S., Eschenko, O., Johansen, J. P., Bouret, S., Aston-Jones, G., Harley, C. W., Manahan-Vaughan, D., Weinshenker, D., Valentino, R., Berridge, C., Chandler, D. J., Waterhouse, B., & Sara, S. J. (2020). Locus coeruleus: A new look at the blue spot. *Nature Reviews. Neuroscience*, 21(11), 644–659. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0360-9>
 101. Porreca, F. (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends in Neurosciences*, 25(6), 319–325. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02157-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02157-4)
 102. Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>

103. Reynolds, D. V. (1969). Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. *Science*, 164(3878), 444–445.
<https://doi.org/10.1126/science.164.3878.444>
104. Ribeiro-da-Silva, A., & Coimbra, A. (1982). Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I-III of the rat spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 209(2), 176–186.
<https://doi.org/10.1002/cne.902090205>
105. Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*, 89(4), 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>
106. Ruder, L., Takeoka, A., & Arber, S. (2016). Long-Distance Descending Spinal Neurons Ensure Quadrupedal Locomotor Stability. *Neuron*, 92(5), 1063–1078. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.032>
107. Rudomin, P., & Schmidt, R. F. (1999). Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research*, 129(1), 1–37.
<https://doi.org/10.1007/s002210050933>
108. 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>
109. Samineni, V. K., Grajales-Reyes, J. G., Copits, B. A., O'Brien, D. E., Trigg, S. L., Gomez, A. M., Bruchas, M. R., & Gereau, R. W. (2017). Divergent Modulation of Nociception by Glutamatergic and GABAergic Neuronal Subpopulations in the Periaqueductal Gray. *Eneuro*, 4(2), ENEURO.0129-16.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0129-16.2017>
110. Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the Locus Coeruleus-Norepinephrine System. *Current Biology*, 25(21), R1051–R1056.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.039>
111. Shimizu-Okabe, C., Kobayashi, S., Kim, J., Kosaka, Y., Sunagawa, M., Okabe, A., & Takayama, C. (2022). Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 834.
<https://doi.org/10.3390/ijms23020834>
112. Sikandar, S., & Dickenson, A. H. (2012). Visceral pain: The ins and outs, the ups and downs. *Current Opinion in Supportive & Palliative Care*, 6(1), 17–26. <https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e32834f6ec9>

113. Sinclair, D. C. (1958). THE ANATOMY OF PAIN¹ Read at the Seventh Biennial Congress of the Australian Physiotherapy Association, May, 1958. *Australian Journal of Physiotherapy*, 4(3), 150–155. [https://doi.org/10.1016/S0004-9514\(14\)60945-4](https://doi.org/10.1016/S0004-9514(14)60945-4)
114. Sneddon, L. U. (2018). Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology*, 33(1), 63–73. <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2017>
115. Sutter Instrument. (2008). *Pipette Cookbook*. Sutter Instrument, Novato, CA.
116. Szűcs, 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>
117. Thompson, R. E., Lindau, M., & Webb, W. W. (2001). Robust, High-Resolution, Whole Cell Patch-Clamp Capacitance Measurements Using Square Wave Stimulation. *Biophysical Journal*, 81(2), 937–948. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75752-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75752-9)
118. Todd, A. J. (1996). GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *The European Journal of Neuroscience*, 8(12), 2492–2498. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01543.x>
119. Todd, A. J. (2002). Anatomy of Primary Afferents and Projection Neurones in the Rat Spinal Dorsal Horn with Particular Emphasis on Substance P and the Neurokinin 1 Receptor. *Experimental Physiology*, 87(2), 245–249. <https://doi.org/10.1113/eph8702351>
120. Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>
121. Todd, A. J. (2022). An Historical Perspective: The Second Order Neuron in the Pain Pathway. *Frontiers in Pain Research*, 3, 845211. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.845211>
122. Urban, D. J., & Roth, B. L. (2015). DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs): Chemogenetic Tools with Therapeutic Utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55(1), 399–417. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124803>
123. Vardy, E., Robinson, J. E., Li, C., Olsen, R. H. J., DiBerto, J. F., Giguere, P. M., Sassano, F. M., Huang, X.-P., Zhu, H., Urban, D. J., White, K. L., Rittiner, J. E., Crowley, N. A., Pleil, K. E., Mazzone, C. M., Mosier, P. D.,

- Song, J., Kash, T. L., Malanga, C. J., ... Roth, B. L. (2015). A New DREADD Facilitates the Multiplexed Chemogenetic Interrogation of Behavior. *Neuron*, 86(4), 936–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.065>
124. Vazey, E. M., & Aston-Jones, G. (2014). Designer receptor manipulations reveal a role of the locus coeruleus noradrenergic system in isoflurane general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10), 3859–3864. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310025111>
 125. Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., Valencia-Flores, K., & Sánchez-Castillo, H. (2023). Defensive and Emotional Behavior Modulation by Serotonin in the Periaqueductal Gray. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(4), 1453–1468. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01262-z>
 126. Vianna, D. M. L., Allen, C., & Carrive, P. (2008). Cardiovascular and behavioral responses to conditioned fear after medullary raphe neuronal blockade. *Neuroscience*, 153(4), 1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.033>
 127. Wang, L.-H., Ding, W.-Q., & Sun, Y.-G. (2022). Spinal ascending pathways for somatosensory information processing. *Trends in Neurosciences*, 45(8), 594–607. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.05.005>
 128. WeiWei, Y., WenDi, F., Mengru, C., Tuo, Y., & Chen, G. (2021). The cellular mechanism by which the rostral ventromedial medulla acts on the spinal cord during chronic pain. *Reviews in the Neurosciences*, 32(5), 545–558. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0121>
 129. Wessendorf, M. W. (1991). Fluro-Gold: Composition, and mechanism of uptake. *Brain Research*, 553(1), 135–148. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90241-M](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90241-M)
 130. Whitwam, J. G. (1976). Classification of peripheral nerve fibres: An historical perspective. *Anaesthesia*, 31(4), 494–503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.1976.tb12354.x>
 131. Willis Jr., W. D. (1985). Central Nervous System Mechanisms for Pain Modulation. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 48(1–6), 153–165. <https://doi.org/10.1159/000101121>
 132. Willis Jr., W. D. (1999). Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: A double-edged sword. *Experimental Brain Research*, 124(4), 395–421. <https://doi.org/10.1007/s002210050637>
 133. Willis, W. D., & Coggeshall, R. E. (2004). Sensory Pathways in the Dorsal Funiculus. In W. D. Willis & R. E. Coggeshall, *Sensory Mechanisms of*

the Spinal Cord (pp. 597–664). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0035-3_9

134. Wilson, L., Yang, Q., Szustakowski, J. D., Gullicksen, P. S., & Halse, R. (2007). Pyruvate induces mitochondrial biogenesis by a PGC-1 α -independent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(5), C1599–C1605. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00428.2006>
135. Wilson-Poe, A. R., Wiese, B., Kibaly, C., Lueptow, L., Garcia, J., Anand, P., Cahill, C., & Morón, J. A. (2021). Effects of inflammatory pain on CB1 receptor in the midbrain periaqueductal gray. *PAIN Reports*, 6(1), e897. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000897>
136. Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3742–3744. <https://doi.org/10.1172/JCI45178>
137. Xu, A., Hilton, E., Arkema, R., Tintle, N. L., & Helming, L. M. (2019). Epidemiology of chronic pain in Ukraine: Findings from the World Mental Health Survey. *PLOS ONE*, 14(10), e0224084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224084>
138. Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Khadijah Adam, S., Abdul Manan, N., & Basir, R. (2018). General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms19082164>
139. Yu, W., Pati, D., Pina, M. M., Schmidt, K. T., Boyt, K. M., Hunker, A. C., Zweifel, L. S., McElligott, Z. A., & Kash, T. L. (2021). Periaqueductal gray/dorsal raphe dopamine neurons contribute to sex differences in pain-related behaviors. *Neuron*, 109(8), 1365-1380.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.03.001>
140. Zhang, H., Zhu, Z., Ma, W.-X., Kong, L.-X., Yuan, P.-C., Bu, L.-F., Han, J., Huang, Z.-L., & Wang, Y.-Q. (2024). The contribution of periaqueductal gray in the regulation of physiological and pathological behaviors. *Frontiers in Neuroscience*, 18, 1380171. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1380171>
141. Zhuo, M., Sengupta, J. N., & Gebhart, G. F. (2002). Biphasic Modulation of Spinal Visceral Nociceptive Transmission From the Rostroventral Medial Medulla in the Rat. *Journal of Neurophysiology*, 87(5), 2225–2236. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.87.5.2225>
142. Zimmerman, A. L., Kovatsis, E. M., Pozsgai, R. Y., Tasnim, A., Zhang, Q., & Ginty, D. D. (2019). Distinct Modes of Presynaptic Inhibition of Cutaneous Afferents and Their Functions in Behavior. *Neuron*, 102(2), 420-434.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.002>