

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОРОЇД КОСТЯНТИН ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК :612.813:612.085

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВЛАСТИВОСТІ НОЦИЦЕПТИВНОГО АФЕРЕНТНОГО ВХОДУ В
ПЕРШУ І ДЕСЯТУ ПЛАСТИНИ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРІВ**

091 «Біологія та біохімія»

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

 К.В.Короїд

Науковий керівник: Романенко Сергій Вячеславович, кандидат біологічних наук

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Короїд К. В. Властивості ноцицептивного аферентного входу в першу і десятю пластини спинного мозку щурів. – 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.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню електрофізіологічних реакцій нейронів першої та десятої пластинок спинного мозку, що мають зв'язки із первинними аферентами поперекового відділу спинного мозку щурів, в нормі і за модельних патологічних станів. В роботі вперше виявлено, що активація TRPV1 у пластинці X зумовлює суттєве зростання частоти й, у частині нейронів, підвищення амплітуди збуджувальних постсинаптичних струмів, а окремі клітини демонструють додатковий повільний вхідний струм. Також в ході дисертаційного дослідження були зафіксовані зміни в електрофізіологічних типах нейронів І пластинки за патологічних станів і встановлені патологічні типи які можуть бути асоційовані з алодинією, гіпералгезією та спонтанним болем

На сьогодні проблема ефективного лікування болю різного етіології залишається одним із актуальних викликів для сучасної медицини. Хронічний біль часто супроводжується центральною сенсibiliзацією, тож навіть найсучасніші фармакологічні підходи виявляються недостатньо дієвими, оскільки не враховують усього спектра змін, що відбуваються в нервовій системі. Розробка нових знеболювальних стратегій ускладнюється тим, що наше розуміння організації та регуляції сенсорної системи за нормальних умов, а також змін, які відбуваються під час патологічних процесів, досі є неповним. Саме це стоїть на перешкоді в пошуку і впровадженні новітніх методів купування больового відчуття.

Згідно з сучасними уявленнями, больові сигнали проходять крізь багатоетапну систему, яка охоплює як периферичну ланку (периферичні нерви, рецептори в шкірі, м'язах, суглобах), так і складні мережі спинного та головного мозку. Особливої уваги заслуговують спинномозкові нейрони, адже вони є проміжною ланкою між первинними аферентами і вищими центрами больової обробки, передаючи сигнали про потенційно шкідливі подразники. Ці нейрони розташовані переважно в пластинці I дорсального рогу, мають специфічні електрофізіологічні властивості і відіграють важливу роль у формуванні адекватної больової реакції.

Важливим напрямом досліджень стає і пластинка X, що, серед іншого, інтегрує соматичну та вісцеральну ноцицептивну інформацію. Наявність у цій пластинці рецепторних систем, залучених до больової модуляції, зокрема TRPV1-рецепторів, вказує на те, що ця зона може брати активну участь у процесах центральної сенсibiлізації. Вивчення пластинки X разом з пластинкою I відкриває нові перспективи в пошуку мішеней для терапевтичного втручання, адже розуміння механізмів, що визначають перехід гострого болю в хронічний, дає змогу розробляти більш таргетні та ефективні методи лікування больових синдромів.

Нейропатичний біль є виснажливим станом, який погіршує якість життя й виникає внаслідок патологічних змін в соматосенсорній нервовій системі. Його клінічними ознаками є гіпералгезія (надмірна реакція на шкідливі подразники), алодинія (болісна відповідь на нешкідливі подразники) та спонтанний біль. Наявні методи лікування обмежені через відсутність повного розуміння клітинних механізмів, що лежать в основі патологічних станів. Для з'ясування патологічних змін та ролі нейронів пластинки I у формування хронічного болю було використано модель нейропатичного болю з частковим пошкодженням нерва.

Аналіз отриманих у даному дослідженні даних показав, що у тварин із частковим пошкодженням нерва помітно змінюються характеристики відповідей

спинномозкових-парабрахіальних нейронів які виникають при стимуляції первинних аферентів. Зокрема спостерігається поява нехарактерних за їх електрофізіологічними характеристиками для контрольних тварин типів нейронів, які реагують на стимуляцію суббольового діапазону, що може свідчити про їх залученість в формування алодинії. Крім того, за умов нейропатичного болю, виникають інші підтипи нейронів які у відповідь на больовий стимул переходять в стан тривалої генерації потенціалів дії, що може зумовлювати розвиток гіпералгезії. Понад те, більше третини клітин досліджених в у умовах індукованого патологічного стану демонстрували стан тривалої генерації потенціалів дії без стимуляції аферентів, що, імовірно, свідчить про розвиток спонтанного болю. Таким чином, виявлені зміни електрофізіологічної поведінки нейронів пластинки I підтверджують їх залученість у патогенез хронічного болю.

У проведеному дослідженні отримано експериментальні докази безпосередньої участі нейронів пластинки X спинного мозку щурів у регуляції больової сигналізації. Зокрема, у пластинці X виявлено три основні типи нейронів: односпайкові, тонічні та відтерміновані. Тонічні клітини (близько 43% популяції) підтримують тривалу генерацію потенціалів дії й запобігають надмірній збудливості за патологічних станів, оскільки вважаються переважно, гальмівними. Односпайкові нейрони характерно відповідають одиночним потенціалом дії у відповідь на внутрішньоклітинну стимуляцію струмом та, імовірно, відповідають за швидку передачу больових сигналів, а відтерміновані, генеруючи потенціали дії з часовою затримкою яка залежить від інтенсивності стимулу, можуть кодувати інтенсивність стимулу, ставлячи їй у відповідність кількість потенціалів дії.

У механізмах центральної сенсibiliзації суттєву роль відіграє TRPV1, чия активація в пластинці X стимулює посилений викид глутамату й стимулює активність мережі в цій зоні. Блокування AMPA–рецепторів майже повністю придушує капсаїцин-індуковану активність, тоді як пригнічення NMDA–рецепторів лише знижує її інтенсивність. Така взаємодія TRPV1 із глутаматними

рецепторами різних типів може потенційно розглядається як мішень для терапевтичного впливу на патологічний біль.

Ключові слова: Спинний мозок, ноцицепція, біль, капсаїцин, гостра травма, кальцієва сигналізація, нейрони головного мозку та нейрозапальні клітини, NMDA, ушкодження периферичних нервів, інвазивна електрична стимуляція, електростимуляція, TRP–канали, електрофізіологія, нейрони, петч-клемп, спайки.

ANNOTATION

Koroid Kostiantyn. Properties of nociceptive afferent input into the first and tenth lamina of the rat spinal cord. –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 dissertation is dedicated to studying the neurons electrophysiological responses in the first and tenth laminae of the spinal cord, which are connected to primary afferents in the lumbar spinal cord of rats, under normal and modeled pathological conditions. For the first time, the study revealed that TRPV1 activation in lamina X significantly increases the frequency and, in some neurons, the amplitude of excitatory postsynaptic currents, while certain cells demonstrate an additional slow inward current. Furthermore, changes in the electrophysiological types of neurons in lamina I under pathological conditions were recorded, and pathological types potentially associated with allodynia, hyperalgesia, and spontaneous pain were identified.

Today, the problem of effective treatment of pain of various etiologies remains one of the urgent challenges for modern medicine. Chronic pain is often accompanied by central sensitization, making even the most advanced pharmacological approaches insufficiently effective as they fail to address the full spectrum of changes occurring in the nervous system. The development of new analgesic strategies is complicated by the fact that our understanding of the organization and regulation of the sensory system under normal conditions, as well as the changes that occur during pathological processes, is still incomplete. This gap hinders the search and implementation of novel methods for alleviating pain.

According to current concepts, pain signals pass through a multi-stage system that includes both the peripheral components (peripheral nerves, receptors in the skin, muscles, and joints) and complex networks of the spinal cord and brain. Spinal cord neurons deserve special attention as they act as intermediaries between primary

afferents and higher pain processing centers, transmitting signals about potentially harmful stimuli. These neurons are primarily located in lamina I of the dorsal horn, possess specific electrophysiological properties, and play a crucial role in forming appropriate pain responses.

Lamina X, which, among other things, integrates somatic and visceral nociceptive information is becoming an important area of research. The presence of receptor systems, that involved in pain modulation, in this lamina, in particularly TRPV1 receptors, suggests that this region may actively participate in central sensitization processes. Investigating lamina X alongside lamina I opens new perspectives for identifying therapeutic targets, as understanding the mechanisms underlying the transition from acute to chronic pain enables the development of more targeted and effective treatments for pain syndromes.

Neuropathic pain is a debilitating condition that impairs the quality of life and arises from pathological changes in the somatosensory nervous system. Its clinical manifestations include hyperalgesia (exaggerated response to harmful stimuli), allodynia (painful response to non-harmful stimuli), and spontaneous pain. Current treatment methods are limited due to the lack of complete understanding of the cellular mechanisms underlying these pathological states. To clarify the pathological changes and the role of lamina I neurons in the formation of chronic pain, a model of neuropathic pain with partial nerve damage was used.

Analysis of the data obtained in this study demonstrated significant changes in the response characteristics of spinoparabrachial neurons to primary afferent stimulation in animals with partial nerve injury. Specifically, the appearance of neuron types with atypical electrophysiological characteristics compared to control animals was observed. These neurons responded to subthreshold stimuli, suggesting their involvement in the formation of allodynia. Additionally, under neuropathic pain conditions, other neuron subtypes emerged that transitioned into a state of prolonged action potential generation in response to painful stimuli, potentially leading to hyperalgesia. Moreover, over one-third of the cells examined under induced pathological conditions exhibited sustained

action potential generation without afferent stimulation, likely indicating the development of spontaneous pain. Thus, the identified changes in the electrophysiological behavior of lamina I neurons confirm their involvement in the pathogenesis of chronic pain.

The study provided experimental evidence of the direct involvement of lamina X neurons in the rat spinal cord in pain signal regulation. Specifically, three main types of neurons were identified in lamina X: single-spike, tonic, and delayed neurons. Tonic cells (about 43% of the population) support sustained generation of action potentials and prevent excessive excitability in pathological conditions, since they are considered predominantly inhibitory. Single-spike neurons typically respond with a single action potential to intracellular current stimulation and are likely responsible for the rapid transmission of pain signals, while delayed neurons generate action potentials with a time delay dependent on stimulus intensity, potentially encoding stimulus intensity by the number of action potentials.

TRPV1 plays a significant role in the mechanisms of central sensitization, as its activation in lamina X enhances glutamate release and stimulates network activity in this area. Blocking AMPA receptors almost completely suppresses capsaicin-induced activity, whereas inhibiting NMDA receptors only moderately reduces it. The interaction of TRPV1 with different types of glutamate receptors can potentially be considered a target for therapeutic intervention in pathological pain.

Keywords: Spinal cord, nociception, pain, capsaicin, Acute injury, Ca²⁺ signalling, brain neurons and neuroinflammatory cells, NMDA, peripheral nerve injury, invasive electrical stimulation, electrostimulation, TRP channels, electrophysiology, neurons, patch-clamp, spiking patterns.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

В яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. Volodymyr Krotov , Kirill Agashkov, Sergii Romanenko, **Kostiantyn Koroid**, Marharyta Krasniakova, Pavel Belan, Nana Voitenko. (2023) Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. BBA Advances. 3. 100081. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100081> (Q3)
2. **K.V. Koroid**, I.O. Blashchak, S.V. Romanenko (2024) The Role of TRPV1 and Glutamate Receptors in the Synaptic Activity of Lamina X Neurons of the Rat Spinal Cord. Fiziol. Zh. 2024; 70(5): 49-55. <https://doi.org/10.15407/fz70.05.049>

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. К. Короїд; І. Блащак; С. Романенко; П. Белан, Пластинки X: вплив капсаїцину та тетродотоксину, XXIII читання ім. В. В. Підвисоцького, 2024, Одеса, Україна.
2. **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 люмбального 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.
3. 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
4. **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.

5. **К. В. Короїд**, І. О. Блащак, С. В. Романенко, В. В. Кротов, К. С. Агашков, М. Є. Краснякова, Сенсорна сигналізація в першій і десятій пластинці спинного мозку щурів у нормі та патології, Міжнародна конференція з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології, на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 19-21 листопада 2024 року, Київ, Україна.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	11
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	13
ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1 Біль та ноцицепція	23
1.2 Хронічний нейропатичний біль і його механізми	24
1.3 Особливості передачі ноцицептивної інформації в спинному мозку – роль глутаматергічної сигналізації.....	26
1.4 Загальні відомості про організацію спинного рогу спинного мозку ...	29
1.5 Особливості первинних аферентних проекцій у структурах дорсального рогу спинного мозку: пластинка X.....	33
1.6 Особливості нейронів пластинки X: типи інтернейронів і проєкційні нейрони.....	35
1.7 Порівняльний аналіз методів дослідження функціональної активності нейронів	37
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	43
2.1 Піддослідні тварини.....	43
2.2 Метод ретроградного мічення спинномозкових-парабрахіальних нейронів флюорисцентним барвником	44
2.3 Модель хронічного нейропатичного болю	47
2.4 Поведінковий тести для оцінки механічної больової чутливості з використанням каліброваних за тиском філаментів фон Фрея.....	48

2.5 Поведінковий тест для оцінки термічної больової чутливості методом Харгрівса	50
2.6 Методики отримання цілісних <i>ex vivo</i> препаратів спинного мозку для дослідження І та Х пластинок.....	53
2.7 Використання бічного інфрачервоного освітлення для візуалізації нейронів в І та Х пластинках спинного мозку.....	55
2.8 «Patch-clamp» методика для реєстрації іонних струмів від нейронів І та Х пластинок.....	58
2.9 Стимуляція дорсальних корінців спинного мозку	60
2.10 Статистична обробка результатів дослідження.....	61
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	63
3.1 Типи спинномозкових-парабрахіальних нейронів в пластинці І та їх електрофізіологічні зміни в моделі нейропатичного болю	63
3.2 Різні популяції нейронів в Х пластинці спинного мозку	73
3.3 Роль TRPV1 рецепторів у синаптичній активності нейронів пластинки Х спинного мозку щурів.....	77
3.4 Роль глутаматних рецепторів у капсаїцин-індукованій синаптичній активності нейронів пластинки Х.....	95
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	100
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	112

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

AMPA — α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

NMDA — N-метил-D-аспартат

ГАМК — γ -аміномасляна кислота

ЦНС — центральна нервова система

СПН — Спинно-парабрахіальні нейрони

ПД — потенціал дії

SNI — часткове ушкодження сідничного нерву

TRPV — транзйєнтний рецепторний потенціал ванілоїдного рецептору

TRPA — транзйєнтний рецепторний потенціал анкіринового рецептору

EPSC — збуджуючі постсинаптичні струми

mEPSC — мініатурні збуджувальні постсинаптичні струми

sEPSC — спонтанні збуджувальні постсинаптичні струми

PF — стан тривалої генерації потенціалів дії

LT — низькопороговий

ВСТУП

Актуальність теми

Біль є явищем, яке виконує важливу захисну функцію, повідомляючи про реальні або потенційні пошкодження тканин. За визначенням Міжнародної асоціації з вивчення болю, це неприємний сенсорний і водночас емоційний досвід, який є суб'єктивним, багатовимірним і відчутно впливає на якість життя людини. На фізіологічному рівні біль ініціюється активацією ноцицепторів — рецепторних закінчень, здатних реагувати на інтенсивні механічні, термічні чи хімічні подразники, що зазвичай супроводжують ушкодження тканин. Ці рецептори розташовані в шкірі, м'язах, суглобах та внутрішніх органах і поділяються на А-дельта-волокна, які відповідають за швидку передачу гострого болю, та С-волокна, що забезпечують повільніший, триваліший і більш «тупий» біль [1]. Після активації ноцицепторів больові сигнали надходять у спинний мозок, де в дорзальному розі утворюють синапси з нейронами другого порядку, а далі прямують висхідними шляхами (спіноталамічним, спіноретиккулярним) до вищих відділів центральної нервової системи, включно з таламусом та соматосенсорною корою [2]. Тут формується усвідомлене сприйняття болю, модульоване когнітивними та емоційними чинниками.

Суттєву роль у регуляції больових сигналів мають низхідні шляхи, що прямують від вищих центрів головного мозку й можуть гальмувати або посилювати передачу больових імпульсів. Задіяні при цьому нейромедіатори та нейропептиди (серотонін, норадреналін, ендогенні опіоїди, субстанція Р) істотно впливають на інтенсивність і характер больових відчуттів [3]. Емоційні та психологічні фактори, такі як страх, тривога чи депресія, здатні посилювати або, навпаки, зменшувати відчуття болю. Тож біль є комплексним феноменом, який відображає взаємодію сенсорних, емоційних і когнітивних компонентів.

У більшості випадків біль виконує захисну функцію, проте якщо він триває довше від прийнятного періоду загоєння (6–12 тижнів), то вважається хронічним

[4]. Патофізіологічні фактори, що сприяють переходу гострого болю в хронічний, можуть бути біологічними (запальні процеси, дисфункція нервових волокон), психологічними (депресивні розлади, хронічний стрес) або соціальними (нестача підтримки, проблеми адаптації) [5]. Хронічні больові стани охоплюють мільйони людей у всьому світі, викликаючи значні обмеження фізичної активності та завдаючи суттєвого соціально-економічного тягаря [6]. Зазвичай виділяють три основні типи хронічного болю: ноцицептивний (пов'язаний із пошкодженням тканин та запаленням), нейропатичний (спричинений ушкодженням або дисфункцією нервової системи) та ноципластичний (зумовлений зміненою ноцицепцією без очевидного структурного ушкодження) [7].

Центральна сенсibilізація вважається однією з головних причин формування хронічного болю і полягає у посиленій збудливості нейронів та нейронних мереж уздовж усієї нервової системи [8]. Вона може виникати тоді, коли повторювані або надмірні больові подразники призводять до довготривалого підвищення чутливості ноцицепторів, порушення функції гальмівних механізмів і посиленої передачі збудження у спинному мозку. На додаток до центральної форми сенсibilізації, розглядають периферичну, коли під дією запальних медіаторів і зміною експресії іонних каналів поріг активації ноцицепторів знижується настільки, що навіть слабкий подразник може сприйматися як болісний [9]. У результаті спостерігається алодинія (біль від зазвичай неболючих впливів) та гіпералгезія (надмірна больова реакція на подразники, які раніше викликали лише помірний біль).

Велику увагу приділяють анатомічним та молекулярним засадам обробки болю в спинному мозку. Дорзальний ріг складається з декількох пластинок, куди надходять первинні аферентні волокна Aδ і C, що проводять больову та температурну інформацію [10–12]. Особливу роль відіграють нейрони пластинок I та II, які беруть участь у передачі ноцицептивних сигналів до вищих центрів [13]. Ці волокна часто експресують рецептори TRPA1 і TRPV1, активація яких призводить до вивільнення прозапальних нейропептидів, посилення кровотоку та

розвитку нейрогенного запалення [14]. Блокування таких рецепторів у експериментальних умовах пригнічує больову реакцію, що робить їх перспективними мішенями для розробки нових анальгетиків [15–18].

У деяких регіонах спинного мозку, зокрема в пластинці Х, також було виявлено висхідні та низхідні зв'язки, залучені в обробку больової інформації та регуляцію рухових функцій [19–23]. Нейрони цієї ділянки отримують сигнали від високопорогових аферентів, а також від супраспінальних структур, що беруть участь у модуляції больової чутливості, локомоції та вісцеральних реакцій [24,25]. Деякі дослідження вказують, що ця пластинка може суттєво впливати на процеси соматосенсорної інтеграції та підтримувати хронічні больові стани за рахунок зміни балансу збудження й гальмування [26,27].

Гетерогенність морфофункціональних властивостей нейронів у дорзальному розі та різноманіття рецепторних систем (іонотропні, метаботропні, глутаматні, ГАМКергічні, гліцинергічні) зумовлюють складні механізми передачі больового сигналу [27,28]. Зокрема, іонотропні глутаматні рецептори, такі як AMPA, NMDA та кайнатні, забезпечують швидку передачу збудження, а NMDA-рецептори пов'язані з явищем синаптичної пластичності, що може призвести до посилення больових відчуттів у випадку їхньої гіперактивації [28]. Пресинаптичні NMDA-рецептори можуть регулювати вивільнення глутамату і тим самим впливати на загальний рівень збудливості, а пресинаптична активація цих рецепторів часто лежить в основі персистуючих больових синдромів [29]. Деякі дослідження вказують, що механізми, за якими розвивається хіміотерапевтично індукований біль (який виникає як наслідок дії агентів хіміотерапії), суттєво відрізняються від механізмів нейропатичного болю при травмі нерва, адже при першому більша роль належить пресинаптичним NMDA-рецепторам, тоді як при другому домінує постсинаптична складова [30].

Метаботропні глутаматні рецептори також роблять свій внесок у модуляцію больових сигналів. Рецептори групи I (mGluR1, mGluR5) зазвичай підсилюють передачу збудження, а групи II і III (mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR6, mGluR7,

mGluR8) можуть інгібувати вивільнення медіаторів. У нормі це забезпечує тонкий контроль над ноцицептивними потоками, однак у разі патології може відбуватися зсув у бік надлишкової активації збуджувальних механізмів [31]. У подібних умовах особливу цінність становлять стратегії, спрямовані на корекцію надмірної активності NMDA- чи mGlu-рецепторів, що дає змогу впливати на центральну сенситизацію та стійкість болю.

Баланс між збуджувальними та гальмівними механізмами в спинному мозку є надзвичайно важливим для підтримання адекватної реакції на больові стимули. ГАМКергічні та гліцинергічні інтернейрони обмежують поширення надмірної збудливості, проте за умов хронічного болю їхня регуляторна функція може бути порушена [8]. Активація NMDA-рецепторів здатна впливати на гальмівну передачу, як посилюючи, так і пригнічуючи її, залежно від типу та розташування рецепторів [13]. Це створює додаткову складність у розумінні патофізіології болю й диктує потребу в індивідуалізованому підході до терапії.

Пошук нових методів лікування хронічного болю включає вивчення блокаторів TRPA1 і TRPV1, здатних інгібувати розвиток нейрогенного запалення, а також селективних інгібіторів NMDA- або mGlu-рецепторів, які можна застосовувати залежно від етіології та механізмів формування болю [15–17].

Такий міждисциплінарний характер проблеми підкреслює необхідність комплексного розуміння больових синдромів. Вчасне виявлення можливих причин болю, правильна діагностика його виду й адекватно підібрана терапія допомагають уповільнити розвиток патологічної сенсibiliзації та суттєво покращити якість життя пацієнтів. Це особливо актуально, коли біль втрачає свою первинну захисну функцію і перетворюється на хронічний, адже в такому стані йому часто властива складна мережа взаємодій, що охоплює не лише периферичні рецептори та спинномозкові центри, а й вищі відділи центральної нервової системи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

«Дослідження низхідної регуляції активності сенсорних нейронів різних типів поверхневих ламін дорсального рогу та ламіни X, 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 дослідження

Метою дослідження було визначення механізмів передачі і обробки ноцицептивної інформації в I і X пластинці поперекового відділу спинного мозку щурів в нормі та при хронічному болю.

Згідно з метою були поставлені **завдання:**

1. Визначити характерні патерни генерації потенціалів дії спинно-парабрахіальних нейронів I пластинки та їх зміни в моделі нейропатичного болю.
2. Вивчити функціональну гетерогенність нейронів пластинки X спинного мозку щура за патерном генерації потенціалів дії у відповідь на зміну мембранного потенціалу.
3. Довести залученість TRPV1 рецепторів у модуляцію спонтанної синаптичної активності нейронів X пластинки.
4. Визначити внесок глутаматних рецепторів у капсаїцин-індуковану активність нейронів X пластинки.

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

Предмет досліджень: Клітинні і мережеві механізми обробки і передачі ноцицептивної інформації у спинному мозку в нормі і патології.

Методи досліджень: Поведінкові тести для визначення порогу механічної і термічної больової чутливості щурів; метод стереотаксичних інтратекальних ін'єкцій флуоресцентного ретроградного барвника в парабрахіальну область для селективного маркування спинномозкових-парабрахіальних нейронів; електрофізіологічний метод локальної фіксації потенціалу клітинної мембрани patch-clamp в конфігураціях cell-attach та whole-cell для реєстрації електричної активності нейронів ті іонних струмів у пластинках I і X; метод стимуляції первинних аферентних волокон і одночасній реєстрації методом patch-clamp для фіксації патернів відповіді нейронів на стимуляцію дорсального корінця; метод часткового ушкодження сідничного нерву для моделювання хронічного нейропатичного болю; метод отримання цілісних *ex vivo* препаратів спинного мозку для отримання доступу до нейронів I та X пластинок; метод бічного освітлення інфрачервоним світлом для візуалізації клітин в глибині препарату; методи математичної статистики (непараметричні тести Манна-Вітні або Колмогорова-Смірнова, тест Шапіро-Вілка, t-тест Ст'юдента, для аналізу категорійних даних використовували точний тест Фішера, метод кластеризації К-середніх та метод силуету для оцінки кластеризації).

Наукова новизна одержаних результатів

В даній роботі вперше показано зміни пропорцій електрофізіологічних типів нейронів у моделі нейропатичного болю. Також були встановлені нові типи нейронів за їх електрофізіологічними відповідями, які характерні для патології. Продемонстровано, що деякі ноцицептивні нейрони пластинки I стають чутливими до низькопорогових невольових стимулів. Було показано, що у щурів в моделі часткового ушкодження сідничного нерву в пластинці I з'являються нейрони, які здатні спонтанно переходити в стан тривалої генерації потенціалів дії.

Було експериментально підтверджено, що ноцицептивні первинні аференти іннервують нейрони пластинки X. За електрофізіологічними характеристиками вперше було показано що TRPV1 рецептори експресуються як на пресинаптичний, так і на постсинаптичній мембранах.

Вперше показано, що активація ванілоїдних рецепторів призводить до збільшення загальної фонові активності в мережі пластинки X на прикладі мініатюрної постсинаптичної активності. Виявлено, що існує два типи нейронів в пластинці X за їх реакціями на активацію TRPV1-рецепторів. Показано складний двофазний характер змін в мініатюрній постсинаптичній активності у відповідь на активацію TRPV1.

Вперше було експериментально продемонстровано домінуючу роль AMPA-рецепторів у формуванні змін спонтанної постсинаптичної активності при застосуванні агоніста ванілоїдного рецептора.

Практичне значення отриманих результатів

Практичне значення отриманих результатів полягає у їхньому потенційному застосуванні для створення нових підходів до лікування хронічного болю. Встановлено, що функціональні зміни в нейронах пластинки I спинного мозку можуть бути пов'язані з такими станами як алодинія, гіпералгезія та спонтанний біль. Саме тому вони є перспективними мішенями для терапевтичного втручання при больових синдромах. Виявлена роль спинно-парабрахіальних нейронів у формуванні і підтримці нейропатичних станів відкриває можливості для розробки фармакологічних засобів, які цілеспрямовано будуть впливати на ці вузли обробки ноцицептивної інформації, модулюючи патологічну збудливість та порушену синаптичну передачу. Це потенційно може дозволити не лише знизити інтенсивність больових відчуттів, але й впливати на їх виникнення в ранніх етапах розвитку патології. Запропонований підхід сприяє розширенню можливостей для персоналізованої терапії больових станів,

забезпечуючи ефективність лікування при мінімізації побічних ефектів, що є важливим у клінічній практиці.

Також було підтверджено залученість пластинки X у модуляції ноцицептивної сигналізації і роль різних типів рецепторів які опосередковують цю активність.

Особистий внесок здобувача

Здобувачем самостійно проведено розробку основної наукової ідеї, аналіз літератури за темою дисертації, формулювання мети і завдань дослідження. Здобувачем разом з керівником кандидатом біологічних наук Романенко С.В. були сплановані експериментальні протоколи та був розроблений і створений новий експериментальний комплекс для електрофізіологічних досліджень на цілісному препараті спинного мозку з використанням методу бічного інфрачервоного освітлення. Експериментальна робота з дослідження нейронів X пластини спинного мозку, реєстрації мініатюрних і спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів, статистична обробка та узагальнення результатів проведені безпосередньо здобувачем.

Аналіз кількісних результатів електрофізіологічних експериментів та оформлення публікацій були проведені разом із співавторами опублікованих робіт співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України кандидатом біологічних наук В. В. Кротовим. При цьому одна із наукових статей була підготовлена до публікації безпосередньо здобувачем.

Визначення мети дослідження, розробка комплексу експериментального обладнання, планування експериментальних робіт, обговорення результатів експериментів та формування висновків досліджень проводились за участі завідуючого відділом біофізики сенсорної сигналізації, доктора біологічних наук, професора П. В. Білана.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи доповідались на 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), XVIII Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Київ, Україна 2024), науковій конференції XXIII читання ім. В. В. Підвисоцького (Одеса, Україна, 2024), VII науково-практичній конференції «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їх фармакологічна корекція» (Харків, Україна, 2024) та щорічній конференції Американського товариства нейронаук (Чикаго, США, 2024).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 7 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 базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus) та 5 тез на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація представлена українською мовою на 122 сторінках, складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і основних методів дослідження, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків, списку із 78 використаних джерел. Дисертація ілюстрована 28 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біль та ноцицепція

Ноцицепція — це фундаментальний фізіологічний сигнал, що має важливе значення для виживання організму, вказуючи на реальну чи потенційну шкоду тканинам. За визначенням Міжнародної асоціації з вивчення болю (International Association for the Study of Pain, IASP), біль розглядається як неприємний сенсорний і емоційний досвід, який є суб'єктивним та багатовимірним [32].

Фізіологічний механізм сприйняття болю запускається активацією ноцицепторів — спеціалізованих рецепторних нервових закінчень, які реагують на інтенсивні механічні, термічні або хімічні подразники, що виникають при пошкодженні тканин. Ці ноцицептори поділяються на А-дельта-волокна, які передають швидкий, гострий біль, та С-волокна, що повільно несуть інформацію про тупий, тривалий біль [1].

Після активації рецепторів імпульси через первинні аферентні волокна транслюються до спинного мозку, де відбувається синаптична передача сигналу на нейрони другого порядку. Далі імпульси йдуть висхідними шляхами, такими як спіно-таламічний та спіно-ретикулярний тракти, і досягають таламуса та соматосенсорної кори головного мозку. Саме там формується усвідомлене сприйняття болю [2].

Сприйняття болю значно модулюється низхідними шляхами, що прямують від вищих відділів центральної нервової системи. Ці шляхи можуть як посилювати, так і пригнічувати больову сигналізацію, залучаючи нейромедіатори та нейропептиди, такі як субстанція Р, серотонін, норадреналін, а також ендogenous опіоїди, енкефаліни [33]. Емоційні та когнітивні чинники, стан тривоги, страху чи депресії додатково впливають на індивідуальний характер больового досвіду.

Останні дослідження також указують на значення генетичних факторів, стану імунної системи та ролі мікробіому у формуванні та підтримці хронічних

больових синдромів. Це підкреслює важливість міждисциплінарного підходу до профілактики, діагностики та терапії болю, включно із фармакологічними методами, психологічною підтримкою, реабілітаційними заходами та сучасними нейромодуляційними технологіями. Такий комплексний підхід дає змогу глибше зрозуміти багатовимірну природу болю та покращити якість життя пацієнтів.

1.2 Хронічний нейропатичний біль і його механізми

Якщо біль втрачає свою первинну захисну функцію та триває довше, ніж очікувано (більше 3-х місяців), він переходить у хронічну форму. Хронічний біль, який визначається як біль, що триває після очікуваного періоду загоєння, вражає мільйони людей у всьому світі, значно погіршуючи якість їхнього життя та створюючи значний соціально-економічний тягар. Однак він характеризується не лише тривалістю, а й складними механізмами периферичної та центральної сенсibilізації. Повторювані або надмірні подразники можуть викликати довготривалу підвищену чутливість ноцицепторів та нейронних мереж, що призводить до алодинії (сприйняття зазвичай безболісних подразників як болісних) та гіпералгезії (підвищена реакція на больові стимули) [6].

Хронічний біль зазвичай поділяють на три основні типи: ноцицептивний, нейропатичний та ноципластичний. Кожен із цих типів має специфічні патофізіологічні механізми, клінічні характеристики та підходи до лікування.

Ноцицептивний біль виникає через реальне або потенційне пошкодження тканин, що активує ноцицептори — спеціалізовані сенсорні рецептори у шкірі, м'язах, суглобах та внутрішніх органах. Цей тип болю зазвичай добре локалізований та може бути ниючим, пульсуючим або гострим. Він часто спостерігається при таких станах, як остеоартрит, травматичні ушкодження або післяопераційні періоди відновлення. Механізм розвитку полягає у активації первинних ноцицепторів шкідливими подразниками, передачі больових імпульсів по периферичних нервах до спинного мозку, а далі — до вищих центрів мозку, де формується суб'єктивне сприйняття болю [34].

Нейропатичний біль пов'язаний із ушкодженням або дисфункцією нервової системи — як периферичної, так і центральної. Він часто описується пацієнтами як печіння, простріли або больові відчуття, подібні до удару електричним струмом. Такий біль може виникати при діабетичній нейропатії, постгерпетичній невралгії, травмах спинного мозку, а також інших ураженнях периферичних нервів. Патофізіологія нейропатичного болю включає периферичну та центральну сенсибілізацію: аномальна збудливість пошкоджених нервових волокон і посилення передачі больових сигналів у спинному та головному мозку призводять до поширення і персистування болю, часто виходячи за рамки початкової ділянки ушкодження [34].

Ноципластичний біль є відносно новою концепцією, яка описує біль, що виникає внаслідок зміненої ноцицепції, незважаючи на відсутність чітких доказів пошкодження тканин або нервів. Такі захворювання, як фіброміалгія та певні види хронічного поширеного болю, належать до цієї категорії. Ноципластичний біль характеризується підвищеною чутливістю до болю та включає складні зміни в центральній нервовій системі, включаючи змінену модуляцію болю та посилення нейронних реакцій на сенсорний вхід. Цей тип болю часто співіснує з іншими симптомами, такими як втома, порушення сну та когнітивні порушення, що відображає ширшу дисрегуляцію механізмів обробки болю [7]

Патофізіологія хронічного болю є багатофакторною, включає складні молекулярні та клітинні зміни. Периферична сенсибілізація, ключовий механізм розвитку хронічного болю, характеризується посиленням регуляції потенціалзалежних натрієвих каналів, молекулярними змінами в ноцицепторах, зниженням порогу активації структур, що відповідають за обробку больових сигналів, а також підвищенням чутливості нервової системи до подразників. Центральна сенсибілізація включає молекулярні зміни, такі як підвищена активація NMDA-рецепторів, посилене вивільнення збуджуючих нейромедіаторів і зниження ефективності гальмівних шляхів у спинному та головному мозку. Ці

зміни призводять до постійних больових станів, коли звичайні подразники можуть викликати сильні больові реакції, відомі як алодинія і гіпералгезія. [9].

Крім зазначеного, дедалі більшу увагу приділяють впливу психосоціальних чинників, генетичних особливостей, імунної відповіді та ролі мікробіому у формуванні та підтриманні хронічних больових синдромів. Ця інтеграція біопсихосоціальних аспектів висвітлює важливість міждисциплінарного підходу до лікування хронічного болю, включаючи фармакотерапію, фізичну реабілітацію, психологічну підтримку та застосування сучасних нейромодуляційних технологій. Такий цілісний підхід дає змогу більш ефективно контролювати хронічний біль та покращувати якість життя пацієнтів.

1.3 Особливості передачі ноцицептивної інформації в спинному мозку – роль глутаматергічної сигналізації

Спинний мозок відіграє важливу роль у обробці ноцицептивної інформації, що має вирішальне значення для розвитку та підтримки хронічного болю. Ноцицептивні сигнали від периферичних і центральних тканин передаються до заднього рогу спинного мозку, де вони зазнають значної модуляції перед тим, як передаватись до вищих центрів мозку. У станах хронічного болю нейронні ланцюги спинного мозку зазнають змін, які сприяють посиленню та стійкості больових сигналів. Це включає такі механізми, як підвищена збудливість нейронів спинного рогу, знижений гальмівний контроль і активація NMDA-рецепторів, які посилюють передачу болю та знижують больовий поріг. Ці зміни в спінальній ноцицептивній обробці є фундаментальними для розвитку хронічного болю, що робить спинний мозок потенційною мішенню для розуміння та лікування хронічних больових станів [9].

Передача ноцицептивної інформації в спинному мозку є дуже складним процесом, що включає численні сигнальні шляхи та системи нейромедіаторів. Центральним у цьому процесі є глутаматергічна передача сигналів, яка відіграє вирішальну роль у опосередкуванні та модулюванні сигналів болю. Глутамат,

основний збуджуючий нейромедіатор у центральній нервовій системі (ЦНС), діє на різноманітні рецептори, включаючи іонотропні та метаботропні рецептори, які необхідні для передачі та модуляції больової інформації.

Іонотропні глутаматні рецептори, зокрема AMPA-, NMDA- та кайнатні підтипи, розташовані на пре- та постсинаптичних мембранах нейронів дорсального рогу спинного мозку та забезпечують швидку передачу ноцицептивних сигналів. Активація цих рецепторів глутаматом відкриває іонні канали, що призводить до притоку іонів натрію й кальцію, деполяризації та генерації потенціалів дії. Особливо важливу роль відіграють NMDA-рецептори, оскільки вони беруть участь у синаптичній пластичності, сприяючи формуванню хронічних больових станів [28].

На додачу до постсинаптичних механізмів, пресинаптичні глутаматні рецептори, у тому числі NMDA-рецептори, регулюють вивільнення глутамату та інших нейромедіаторів, тим самим впливаючи на загальний рівень збудливості спінальних ноцицептивних кіл. У станах хронічного болю активація пресинаптичних NMDA-рецепторів може посилювати ноцицептивні сигнали, сприяючи розвитку гіперчутливості та персистентного больового синдрому [29].

Пріоритетне значення різних пулів NMDA-рецепторів залежить від типу хронічного болю. Так, при хіміотерапевтично індукованій больовій гіперчутливості ключову роль відіграють пресинаптичні NMDA-рецептори, тоді як при невропатичному болю, спричиненому ушкодженням нерва, домінують постсинаптичні NMDA-рецептори збуджуючих нейронів. Такі відмінності підкреслюють необхідність розробки терапевтичних стратегій, спрямованих на специфічні рецепторні мішені залежно від етіології хронічного болю [30].

Метаботропні глутаматні рецептори (mGluR) також відіграють значну роль у модулюванні ноцицептивної передачі, зокрема вони беруть участь у модулюванні синаптичної передачі та збудливості нейронів. Ці рецептори, розділені на три групи на основі їхньої гомології послідовності, механізмів передачі сигналу та фармакологічних властивостей. mGluR групи I (mGluR1 i

mGluR5) зазвичай посилюють передачу збудження, тоді як mGluR групи II (mGluR2 і mGluR3) і групи III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 і mGluR8) зазвичай інгібують вивільнення нейромедіатора. Модуляція ноцицептивних шляхів цими рецепторами може суттєво впливати на сприйняття болю та хронічні больові стани [31].

Крім безпосереднього впливу на збуджувальну синаптичну передачу, глутаматергічні механізми тісно взаємодіють із гальмівними трансмісійними системами, зокрема ГАМКергічною та гліцинергічною. Ці взаємодії є важливими для підтримання збалансованого співвідношення між збудженням і гальмуванням, що зрештою формує кінцевий вихід ноцицептивних шляхів спинного мозку. Зокрема, встановлено, що активація NMDA-рецепторів може модулювати ГАМК-ергічну синаптичну передачу, причому цей вплив не є однозначним та залежить від конкретного середовища й залучених рецепторних підтипів. Така контекст-залежна модуляція може як підсилювати, так і послаблювати інгібаторний контроль ноцицептивної інформації. Роль глутаматергічної сигналізації в ноцицептивній передачі ще більше ускладнюється залученням інших типів рецепторів і сигнальних шляхів. Наприклад, mGluR групи III, які розташовані пресинаптично та інгібують вивільнення нейромедіаторів, відіграють значну роль у модулюванні ноцицептивних шляхів. Активація цих рецепторів може призвести до зниження збудливої нейротрансмісії та зниження чутливості до болю, забезпечуючи потенційну мішень для лікування болю [31].

Розуміння складної взаємодії цих механізмів має вирішальне значення для розробки ефективних методів лікування хронічного болю. Глутаматергічна передача сигналів через іонотропні та метаботропні рецептори є центральною для модуляції ноцицептивної інформації в спинному мозку, впливаючи на баланс збудження та гальмування та формуючи загальне відчуття болю. Розуміння цих процесів забезпечує потенційні цілі для терапевтичного втручання, спрямованого на руйнування патологічних змін, які лежать в основі хронічних больових станів.

1.4 Загальні відомості про організацію спинного рогу спинного мозку

Задній ріг спинного мозку відіграє центральну роль в інтеграції та модуляції сенсорних сигналів, включно з ноцицептивними. Його будова представлена серією характерних прошарків, відомих як пластинки Рекседа (Rexed laminae), кожна з яких виконує специфічні функції та містить унікальні типи нейронів. Пластинки I–VI утворюють дорсальний ріг, який здебільшого оперує сенсорною інформацією, тоді як пластинки VII–IX формують вентральний ріг, залучений переважно в моторний контроль. Пластинка X оточує центральний канал та відіграє важливу роль у сегментарній інтеграції сигналів. Глибоке розуміння структурно-функціональної організації кожної пластинки є ключовим для виявлення закономірностей обробки сенсорних сигналів у спинному мозку.

Lamina I (Marginal nucleus of spinal cord)

Пластинка I розташована у найбільш дорсальному шарі спинного мозку та містить популяції нейронів, чутливих до шкідливих (ноцицептивних) стимулів. Ці клітини забезпечують передачу сигналів про біль і температуру до вищих центрів центральної нервової системи, зокрема таламуса та стовбурових структур, залучаючи як класичні збуджувальні медіатори (наприклад, глутамат), так і нейропептиди, такі як субстанція Р і кальцитонін-ген-споріднений пептид (CGRP). Функціональні та морфологічні особливості нейронів пластинки I роблять їх ключовими елементами у формуванні та модуляції ноцицептивних шляхів [35–37].

Lamina II (Substantia Gelatinosa)

Пластинка II слугує центром модуляції больової та температурної інформації. Ця пластинка відзначається високою щільністю інтернейронів, що використовують гамма-аміномасляну кислоту (ГАМК) та гліцин, забезпечуючи потужну гальмівну дію на висхідні ноцицептивні шляхи. Завдяки цьому пластинка II відіграє ключову роль у пригніченні больових сигналів і регулюванні сенсорного вхідного потоку перед його подальшою передачею у вищі центри.

Структурно вона поділяється на зовнішню (I_o) та внутрішню (I_i) зони, кожна з яких має унікальні типи нейронів і виконує специфічні функції в обробці сенсорної інформації [38].

Lamina III i IV (Nucleus proprius)

Пластинки III та IV, відомі разом як *nucleus proprius*, відіграють важливу роль в інтеграції нешкідливих тактильних та пропріоцептивних сигналів. Вони обробляють легкий дотик, здатність розрізняти два близько розташовані точки тактильного контакту, вібраційні відчуття та пропріоцептивну інформацію, що надходить від периферичних нервів. Ці пластинки слугують першим рівнем синаптичної обробки в дорсальних відділах сірої речовини спинного мозку, а їхні нейрони утворюють проекції як у глибші шари спинного мозку, так і до супраспінальних центрів, включаючи ядра задніх стовпів, середній мозок, таламус та гіпоталамус. Таким чином, пластинки III і IV забезпечують базову інтеграцію сенсорних сигналів, необхідних для точного сприйняття й подальшої передачі інформації до вищих структур центральної нервової системи. [39].

Lamina V

Пластинка V виступає ключовим центром інтеграції широкого спектра сенсорних сигналів, включаючи як нешкідливі (механорецепторні), так і шкідливі (ноцицептивні) стимули, що надходять від шкіри, м'язів, суглобів і внутрішніх органів. У цій пластинці локалізуються інтернейрони та пропріоспінальні нейрони. Саме тут відбувається конвергенція вісцеральних і соматичних больових сигналів, що сприяє виникненню явища іррадіюючого болю. Крім того, нейрони пластинки V формують важливі висхідні проекції, зокрема спіноталамічний і спіноретиккулярний тракти, що забезпечують передачу комплексної сенсорної та больової інформації до вищих центрів центральної нервової системи. [40].

Lamina VI

Пластинка VI бере участь у пропріоцептивній обробці, отримуючи сигнали від товстих аферентних волокон, що іннервують м'язи та суглоби, а також від нерво-м'язових веретен та сухожильних органів Гольджі. Ці структури чутливі до механічних рухів у суглобах та до розтягнення м'язів, забезпечуючи точну інформацію про положення і стан опорно-рухового апарату. Завдяки цим вхідним сигналам пластинки VI забезпечує рефлекторний контроль рухів, регуляцію м'язового тону та рухову координацію. Вона містить інтернейрони та проекційні нейрони, які можуть надсилати пропріоцептивну інформацію до вищих відділів ЦНС, зокрема до мозочка, де ці сигнали використовуються для тонкого налаштування м'язового тону та моторних програм [41].

Lamina VII

Пластинка VII, розташована у проміжній зоні спинного мозку, відома також як інтермедіолатеральне ядро. Вона виконує ключову функцію в регуляції вегетативних процесів і обробці пропріоцептивних сигналів. До складу цієї пластинки входить дорсальне ядро Кларка, що передає пропріоцептивну інформацію до мозочка, а також інтермедіолатеральний клітинний стовп, де розташовані прегангліонарні симпатичні нейрони. Завдяки такій організації пластинки VII забезпечує складну інтеграцію сенсорно-моторних та вегетативну регуляцію [42].

Lamina VIII

VIII пластинка, розташована у вентральному розі, модулює рухову активність. Вона містить інтернейрони, які посиляють свої аксони на протилежну (контралатеральну) сторону, де формують синаптичні контакти з руховими нейронами пластинки IX. Завдяки такій організації забезпечується двостороння узгодженість рухів та точна регуляція м'язової активності. [43].

Lamina IX

Пластинка IX містить клітинні тіла моторних нейронів, що іннервують скелетні м'язи, організовані в медіальні та латеральні рухові колони. Нейрони медіального стовпа іннервують осьові м'язи, тоді як нейрони латерального стовпа іннервують м'язи кінцівок. Ця пластинка відповідає за довільні рухи та контроль над рефлекторними реакціями, забезпечуючи ефективний зв'язок із низхідними руховими шляхами, що походять від вищих моторних центрів мозку.[44].

Lamina X

Пластинка X, яка оточує центральний канал спинного мозку, відіграє ключову роль у сприйнятті та модуляції вісцерального болю та вегетативних функцій. Структурна організація цієї пластинки забезпечує інтеграцію сенсорних і моторних сигналів, пов'язаних із внутрішніми органами, та формується за рахунок різноманітних популяцій нейронів, залучених до локальних рефлекторних дуг та взаємодії з іншими сегментами спинного мозку.

Дослідження свідчать, що нейрони пластинки X отримують вхід не лише від низькопорогових, а й від високопорогових первинних аферентних волокон. Така іннервація формує основу для передачі та модуляції ноцицептивних сигналів вісцерального походження [45]. Експерименти з використанням *ex vivo* препаратів спинного мозку продемонстрували широкий спектр електрофізіологічних властивостей нейронів цієї пластинки, що дозволяє їм ефективно реагувати на зміни у периферичних вхідних сигналах та брати участь у формуванні складних рефлекторних реакцій [46]. Активність нейронів пластинки X перебуває під впливом як сегментарних, так і низхідних регуляторних сигналів, які надходять із вищих рівнів центральної нервової системи. Така багаторівнева модуляція забезпечує гнучкий та динамічний контроль функціонування пластинки X, сприяючи точному налаштуванню вісцеро-соматичної інтеграції та підтриманню вегетативного гомеостазу [47].

Підсумовуючи, пластинчаста організація спинного мозку формує складну та високоорганізовану архітектуру для обробки, модуляції й інтеграції різноманітних сенсорних сигналів і забезпечення моторного контролю. Кожна із Rexed laminae — від I до X — має унікальний склад нейронних популяцій та специфічні функціональні завдання: від сприйняття та регуляції ноцицептивних і тактильних стимулів, модуляції пропріоцептивних шляхів, до формування складних рефлекторних і вегетативних відповідей. З'ясування механізмів, за якими діють окремі пластинки, їхні взаємозв'язки та вплив на вищі відділи центральної нервової системи, є ключовим для розробки нових терапевтичних стратегій щодо сенсорних порушень і хронічних больових синдромів.

1.5 Особливості первинних аферентних проекцій у структурах дорсального рогу спинного мозку: пластинка X

Пластинка X спинного мозку, розташована навколо центрального каналу спинного мозку, є багатокомпонентною інтеграційною структурою, важливою для обробки вісцеральних та ноцицептивних сигналів. Своєрідне анатомічне положення та складний нейронний склад цієї пластинки дозволяють їй поєднувати інформацію про внутрішній стан організму з периферичними больовими стимулами. Значна частина аферентних сигналів надходить до нейронів пластинки X безпосередньо від високопорогових А δ - та С-волокон, які відповідають за передачу больових імпульсів та сенсорну інформацію з внутрішніх органів. Така моносинаптична передача забезпечує швидку та пряму реакцію пластинки X на ноцицептивні подразники, що важливо для формування первинних рефлекторних відповідей [45].

Проте функціональне значення пластинки X не обмежується простим ретрансляванням больових сигналів. Ця пластинка виконує функції складної обробки сенсорної інформації, оскільки її нейрони перебувають під впливом різноманітних збудливих та гальмівних аферентів. Дослідження показують, що майже половина клітин пластинки X отримує як моносинаптичні збудливі впливи,

так і полісинаптичні гальмівні входи. Така конфігурація створює динамічний баланс між збудженням та гальмуванням, який може гнучко змінюватися залежно від фізіологічного стану організму, інтенсивності та типу стимулу, а також під впливом низхідних контролюючих систем [46].

Крім сенсорного впливу з периферії, пластинка X зазнає модулюючої дії сегментарних і надсегментарних систем. Низхідні сигнали від структур стовбура мозку та вищих центрів ЦНС можуть посилювати або пригнічувати активність нейронів пластинки X, впливаючи на рівень чутливості до вісцеральних і больових подразників. Це багаторівневе регулювання забезпечує гнучке налаштування сенсорно-моторних рефлексів та вегетативних реакцій, залучених у підтримання гомеостазу [47].

Нещодавні дослідження розширюють уявлення про складність сенсорної обробки в зоні пластинки X, виявляючи проекції не лише від пептидергічних, а й від непептидергічних первинних аферентів. Ці непептидергічні волокна, залучені до механосенсорних та інших чутливих модальностей, спрямовуються як на пластинку I, так і на пластинку X, формуючи синаптичні контакти з нейронами, що експресують рецептор нейрокініну-1. Така взаємодія додає ще один рівень складності, підкреслюючи роль пластинки X у модулюванні ноцицептивних і вісцеральних сенсорних шляхів через широкий спектр аферентних сигналів [48].

Нещодавні досягнення у дослідженні морфології нейронів висвітлили нові аспекти організації проекцій первинних аферентів у поперековому відділі спинного мозку, зокрема їх зв'язок із глибшими пластинками, такими як пластинка X. Хоча щільність цих проекцій є меншою, ніж у поверхневих пластинках, їх функціональна важливість не викликає сумнівів. Вони забезпечують інтеграцію сигналів, пов'язаних із моторикою та вегетативними функціями, формуючи основний компонент взаємодії сенсорних і моторних систем. Прямі зв'язки між первинними аферентами та пропріоспінальними нейронами пластинки X свідчать про її центральну роль у дослідженні морфології нейрональних структур

координації сенсорних, моторних і вегетативних реакцій, особливо у контексті вісцерального болю [49].

Дослідження показали, що нейрони пластинки Х беруть участь у складних взаємодіях, які визначають результат обробки болю, від гострих ноцицептивних реакцій до хронічної сенсибілізації, яка спостерігається при тривалих больових станах [50].

Підсумовуючи, пластинка Х є критично важливим інтегративним центром для обробки ноцицептивної та вісцеральної сенсорної інформації. Завдяки конвергенції від первинних аферентів, включаючи високопорогові волокна А δ а також непеptидергічні С волокна, нейрони пластинки Х забезпечують складну обробку больових та вісцеральних сигналів. Ця пластинка функціонує як центр динамічної взаємодії збудливих та гальмівних входів, що дозволяє їй модулювати сенсорні потоки з високою адаптивністю. Пластинка Х відіграє важливу роль у формуванні відповіді на гострий біль, а також у механізмах хронічної сенсибілізації, що робить її значимим компонентом системи обробки вісцерального болю.

1.6 Особливості нейронів пластинки Х: типи інтернейронів і проєкційні нейрони

Завдяки своїй організації пластинка Х виконує кілька важливих функцій: вона об'єднує сенсорну інформацію, регулює вегетативні функції та бере участь у формуванні рефлексорних і вісцеро-соматичних відповідей. Особливості цих нейронів, зокрема їх здатність отримувати сенсорні входи від різних первинних аферентів обробляти і передавати її до вищих центрів, дозволяють пластинці Х ефективно адаптувати вихідну активність до змінних потреб організму, забезпечуючи як локальну регуляцію, так і участь у складних міжсегментарних і системних процесах.

Інтернейрони, розташовані в пластинці Х, відіграють ключову роль у локальній модуляції сенсорних сигналів у спинному мозку. Вони інтегрують

вхідні сигнали від первинних аферентних волокон та регулюють баланс між збудливими й гальмівними впливами, забезпечуючи точне налаштування реакції спинного мозку на ноцицептивні та вісцеральні стимули.

Дослідження показали, що інтернейрони пластинки X відзначаються значною різноманітністю мембранних властивостей і патернів активації, що дозволяє їм адаптуватися до різних функціональних вимог. Ця гетерогенність сприяє їхній участі у широкому спектрі сенсорних та вегетативних функцій, включаючи регуляцію вісцерального болю й автономних процесів.

Однією з важливих підгруп інтернейронів у пластинці X є клітини, що експресують нейропептид Y (NPY). Ці інтернейрони, переважно гальмівні, відіграють ключову роль у модуляції больових сигналів, знижуючи їхню інтенсивність і перешкоджаючи розвитку гіпералгезії. Завдяки широким зв'язкам із іншими сегментами спинного мозку, ці нейрони беруть участь як у локальній обробці сенсорних сигналів, так і в формуванні ширших гальмівних мереж. Їхній внесок є важливим для підтримання балансу між збудливими й гальмівними впливами, що є визначальним для регуляції болю та автономних функцій. [51].

Новітні методи спектроскопії, такі як візуалізація кальцієвої динаміки та синаптичної активності, дозволили ідентифікувати окремі підгрупи інтернейронів у пластинці X, кожна з яких має специфічні функціональні характеристики. Виявлена різноманітність функцій цих нейронів підкреслює їхню роль у регуляції сенсорних шляхів, підтриманні гомеостазу та адаптації до змін у стані організму. Ці результати вказують на важливість інтернейронів пластинки X у модулюванні сигналів, що надходять як від внутрішніх органів, так і від соматичних структур, підтверджуючи їхню важливу роль у підтримці балансу сенсорної обробки [46].

Проекційні нейрони в пластинці X відповідають за передачу обробленої інформації із спинного мозку до вищих центрів головного мозку та інших сегментів спинного мозку. Ці нейрони переважно збудливі й отримують прямі сигнали від високопорогових первинних аферентних волокон, таких як волокна Aδ і C, які передають больові сигнали. Проекційні нейрони забезпечують

передачу больової та вісцеральної сенсорної інформації до стовбура мозку та таламуса, які залучені у формування і сприйняття емоції болю та регуляції автономних функцій.

Нещодавні дослідження показали, що проекційні нейрони пластинки X мають довгі аксони, які розгалужуються на кілька сегментів спинного мозку, забезпечуючи їхній вплив на широкий спектр функцій, включаючи моторні, сенсорні та автономні процеси. Серед цих нейронів особливу роль відіграють клітини з експресією нейрокінінового рецептора (NK1R), які є чутливими до субстанції P, одного з ключових нейропептидів, залучених до передачі больових сигналів. NK1R-експресуючі нейрони відіграють важливу роль як у гострому сприйнятті болю, так і у розвитку хронічних больових станів, особливо тих, що пов'язані з вісцеральним болем. Вони функціонують як вагомий компонент у модуляції ноцицептивних сигналів, забезпечуючи як локальну інтеграцію сенсорної інформації, так і вплив на автономні реакції. Їхня участь у хронічних больових процесах підкреслює їхнє значення у формуванні патологічних станів болю, що робить їх перспективною мішенню для терапевтичних втручання. [45].

Підсумовуючи нейрони пластинки X є високоспеціалізованими елементами, які включають як інтернейрони, так і проекційні нейрони, кожна з цих груп виконує унікальні функції в інтеграції сенсорної та автономної інформації. Інтернейрони забезпечують локальну модуляцію, підтримуючи баланс між збудливими й гальмівними впливами, що дозволяє точно налаштовувати сенсорні сигнали. Проекційні нейрони, завдяки своїм довгим аксонам, передають оброблену інформацію до вищих центрів мозку та координують реакції через кілька сегментів спинного мозку.

1.7 Порівняльний аналіз методів дослідження функціональної активності нейронів

Вивчення функціональної активності нейронів у спинному мозку є однією з ключових завдань нейробіології, яка дозволяє розкрити складні механізми

обробки сенсорних сигналів, зокрема больових імпульсів. Сьогодні існує кілька методів дослідження активності нейронів, кожен із яких має свої переваги і недоліки. Від класичних електрофізіологічних методів до новітніх технологій, таких як мінімально-інвазивне зображення нейронів, дослідники мають у своєму розпорядженні багатий набір інструментів для вивчення нейронних мереж і механізмів їх функціонування.

Класичні методи: Електрофізіологія та кальцієва флуориметрія

Класичні електрофізіологічні методи, такі як внутрішньоклітинна та позаклітинна реєстрація, забезпечують високоточне вимірювання електричної активності окремих нейронів у спинному мозку. Ці техніки дозволяють реєструвати потенціали дії та постсинаптичні потенціали, що є ключовими для розуміння функціонування нейронів у локальних мережах. Проте їх використання часто обмежується одночасним дослідженням невеликої кількості нейронів, що знижує можливість вивчення широкомасштабної нейронної взаємодії.

Кальцієва флуориметрія, як сучасний підхід, дозволяє візуалізувати активність великої кількості нейронів одночасно на основі змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію. Ця методика значно розширює можливості для дослідження нейронних мереж, дозволяючи оцінювати взаємодії між численними нейронами в режимі реального часу. Однак слід враховувати, що кальцієве зображення є непрямим показником електричної активності нейронів. Динаміка кальцію відображає процеси, пов'язані зі спайковою активністю, але потребує подальшого аналізу та інтерпретації, які виконуються за допомогою спеціалізованих алгоритмів для точнішого відтворення електрофізіологічної активності. [52].

Слайси спинного мозку

Метод зрізів (слайсів) спинного мозку широко використовується для вивчення нейронної активності та синаптичних взаємодій у локальних нейронних

мережах. Зрізи дозволяють проводити електрофізіологічні експерименти в контрольованих умовах, де доступ до окремих нейронів полегшується. Однією з переваг цього методу є можливість проведення експериментів з фармакологічною модифікацією та маніпуляцією збудливістю нейронів, що робить його корисним для вивчення синаптичної пластичності, передачі болю та моторної активності.

Проте зрізи тканин не зберігають інтактною структуру всієї мережі спинного мозку, що може обмежувати їх використання для досліджень великих нейронних систем. Також є виклики в підтримці життєздатності тканин протягом тривалих експериментів. Однак зрізи спинного мозку залишаються цінним методом для вивчення внутрішньої динаміки нейронів у відносно малих мережах [53].

Цілісний препарат спинного мозку

Цільний препарат спинного мозку є сучасним експериментальним підходом, що забезпечує збереження анатомічної цілісності та природної мережевої архітектури спинного мозку. Цей метод дозволяє реєструвати активність великих нейронних структур і вивчати взаємозв'язки між сегментами спинного мозку, що є особливо корисним для дослідження складних нейронних мереж, таких як ті, що обробляють ноцицептивну інформацію. Завдяки можливості використовувати різні типи стимуляцій, цей підхід забезпечує дослідження нейронних реакцій на подразники в умовах, максимально наближених до фізіологічних. Крім того, цільний препарат є ефективним інструментом для оцінки нових анальгетичних засобів, що робить його важливим у вивченні механізмів болю та розробці методів його лікування. [46].

Мікроелектродні масиви (MEA)

Мікроелектродні масиви (MEA) є сучасним методом для одночасної реєстрації нейронної активності в ноцицептивних мережах спинного мозку. Вони дозволяють з високою часово-просторовою роздільною здатністю моніторити

активність численних нейронів, забезпечуючи важливу інформацію про їхню синхронізацію та взаємодію. Завдяки мінімальній інвазивності МЕА зберігають природну нейронну архітектуру, що є важливим для вивчення фізіологічних процесів, а також дозволяють проводити довготривалі експерименти на живих тваринах. Цей метод є особливо корисним для аналізу складних нейронних мереж і взаємодії сенсорних сигналів.

Проте МЕА мають обмеження. Вони здебільшого фокусуються на поверхневих шарах тканини, що зменшує їхню ефективність для дослідження глибших структур спинного мозку. Також великий обсяг отриманих даних потребує складної обробки, а встановлення електродів може спричиняти локальні пошкодження тканин. Незважаючи на ці недоліки, МЕА є потужним інструментом для детального дослідження нейронної активності та механізмів обробки [54].

Мінімально-інвазивне зображення нейронів

Мінімально інвазивна візуалізація нейронів і мікроглії за допомогою мультифотонної мікроскопії та нелінійної оптичної (NLO) мікроскопії відкриває нові можливості для тривалих експериментів на живих тваринах. Цей метод дозволяє спостерігати за динамікою нейронної та гліальної активності в реальному часі без порушення анатомічної цілісності тканин. Завдяки високій просторовій роздільній здатності та глибокому проникненню в тканини, цей підхід забезпечує точне дослідження змін у нейронних мережах і взаємодії між нейронами та мікроглією.

Такі методи є незамінними для вивчення механізмів хронічного болю та нейропластичності, оскільки дозволяють аналізувати довготривалі зміни у нейронній і гліальній активності, наприклад, після пошкодження нервів або під час тривалих больових станів. Незважаючи на складність обладнання та високу вартість, ці технології значно розширюють можливості дослідження нейронних і

гліальних процесів, забезпечуючи нові перспективи для розуміння механізмів ноцицепції та нейропластичних змін. [55].

Переваги та обмеження кожного підходу

Кожен із методів має свої переваги й обмеження, що визначають їхнє застосування у різних контекстах нейрофізіологічних досліджень. Класичні електрофізіологічні підходи, такі як внутрішньоклітинна та позаклітинна реєстрація, а також методи на основі зрізів, є ефективними для детального аналізу синаптичних взаємодій та локальних нейронних мереж, але не дають змоги вивчати інтегровану активність великих нейронних ансамблів. Оптикогенетичні методи кальцієвої флуориметрії є опосередкованими і не дають змоги детально дослідити швидкі електричні процеси на мембрані нейронів. Мікроелектродні масиви, своєю чергою, мають недостатню роздільну здатність для точного запису активності окремих нейронів у глибинних та компактних структурах спинного мозку. Використання цільного препарату спинного мозку дозволяє зберегти анатомічну цілісність тканин, що робить його незамінним для дослідження складних мережевих взаємодій, хоча цей підхід вимагає високої технічної підготовки та суворого контролю за життєздатністю тканин.

Цілісний препарат спинного мозку є найкращим вибором для нейрофізіологічних досліджень, оскільки забезпечує доступ до комплексної взаємодії різних типів клітин і нейронних шляхів, дозволяючи проводити тривалі експерименти з більшою точністю та відповідністю до реальних умов. Крім того, він дає змогу поєднувати різні методи аналізу, мінімізуючи необхідність у спеціалізованому обладнанні. Таким чином, хоча інші методи корисні для вивчення окремих аспектів нейрофізіології, цілісний препарат спинного мозку залишається універсальним інструментом для комплексного дослідження механізмів хронічного болю, нейропластичності та загальної нейронної активності.

Тим не менш поєднання різних методів для дослідження нейронної активності в спинному мозку дає змогу отримати цілісне уявлення про механізми обробки сенсорної інформації, зокрема больових сигналів. Використання цільного препарату спинного мозку, разом із класичними електрофізіологічними методами, слайсами, мікроелектродними масивами та інноваційними підходами до зображення нейронів, дозволяє розкрити нові аспекти функціонування спинного мозку і розробляти ефективні терапевтичні стратегії для лікування хронічного болю та інших неврологічних розладів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1 Піддослідні тварини

У цій роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар. 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.

Для дослідження нейронів І пластинки використовували щурів віком 20-21 постнатальний день (P20-P21). У цьому віці тваринам проводили операцію за моделлю часткового пошкодження сідничного нерва, а також стереотаксичну інтратекальну ін'єкцію флуоресцентного ретроградного барвника в парабрахіальну область, контралатеральну до місця травми. Це дозволяло в подальшому виявляти спинномозкові-парабрахіальні нейрони І пластинки дорсального рогу. Щурів брали в експерименти через сім днів після операції та мічення, що забезпечувало достатній час для розвитку нейропатичного болю та дифузії барвника в соми спинномозкових-парабрахіальних нейронів.

Електрофізіологічні дослідження проводили на 27-30 постнатальний день (P27-P30) для вивчення активності цих нейронів після травматичної моделі.

Для експериментів, присвячених вивченню організації та регуляції нейронів Х пластинки спинного мозку, використовували самців щурів лінії Вістар віком 11-12 постнатальних днів (P11-P12). Вибір цього віку був обґрунтований тим, що у цей період оболонки спинного мозку є менш щільними, що зменшує ризики пошкодження під час виділення спинного мозку. Крім того, це покращує візуалізацію нейронів у подальших електрофізіологічних і морфологічних дослідженнях, оскільки менша щільність тканин сприяє кращому проникненню світла та реагентів під час експериментів.

2.2 Метод ретроградного мічення спинномозкових-парабрахіальних нейронів флюорисцентним барвником

Вперше механізм транспортування флуоресцентних барвників був описаний у 1970 році Крістенссоном. Він вивчив переміщення кон'югату альбуміну з флуоресцентним барвником через периферичні нерви до спінальних мотонейронів [56]. Це дослідження стало фундаментом для створення сучасних барвників із покращеними характеристиками стабільності та ефективності.

Ефективним підходом для візуалізації та ідентифікації певних нейронних груп (спинномозкових парабрахіальних нейронів) у дорсальному розі спинного мозку щурів є селективне маркування за допомогою флуоресцентного ретроградного індикатора. Цей метод базується на ретроградному транспортуванні флуоресцентних барвників від периферичних нервових закінчень до сом нейронів, що дозволяє чітко визначити нейрони, які проектується до конкретних мозкових зон.

Одним із таких маркерів є гідроксистилбамідин (Флюороголд, відомий своєю високою ефективністю, підвищеною інтенсивністю флуоресценції, мінімальним часом згасання і стабільністю. Також важливою є його властивість, що полягає у відсутності транспортування через синапси, що забезпечує точну ідентифікацію

флуоресцентного сигналу у мічених нейронах. Цей водорозчинний барвник, який випромінює яскраве блакитне або золотисте світіння після ультрафіолетового збудження, поглинається нервовими терміналами шляхом ендоцитозу, ретроградно транспортується до сом нейронів і може залишатися видимим протягом декількох місяців після введення [57,58].

Для ретроградного маркування ми використали аналог гідроксистилбамідину — аміностилбамідин. Цей флуоресцентний барвник стереотаксично вводили в парабрахіальну зону заднього мозку (Рис. 2.2.1) для позначення спинномозкових парабрахіальних нейронів І пластинки (Рис. 2.2.2), які проектуються саме до цієї ділянки [59,60].

Процедура проводилася на щурах лінії Вістар (P20-P21), яких анестезували шляхом інтраперитонеального введення розчину кетаміну (65 мг/кг) та ксилазину (10 мг/кг). Голова тварини фіксувалась в стереотаксичному апараті. Розріз шкіри проводили в ростро-каудальному напрямку вздовж середньої лінії для візуалізації брегми та потиличної кістки. За допомогою шприца (1 μ l) з тонкою голкою (32-g, Hamilton, USA) аміностилбамідин (200-300 нл, 2%) вводили в парабрахіальну зону за стереотаксичними координатами: 13,2 мм рострокаудально, 2 мм медіолатерально, 5,6 мм дорсовентрально, під кутом 30° відносно поверхні черепа. Після видалення голки рану зашивали, а шкіру обробляли розчином повідон-йоду (Egis, Угорщина). Для підтримання оптимальної температури тіла тварин під час операції використовували термостатичний килим з температурою 30°C.

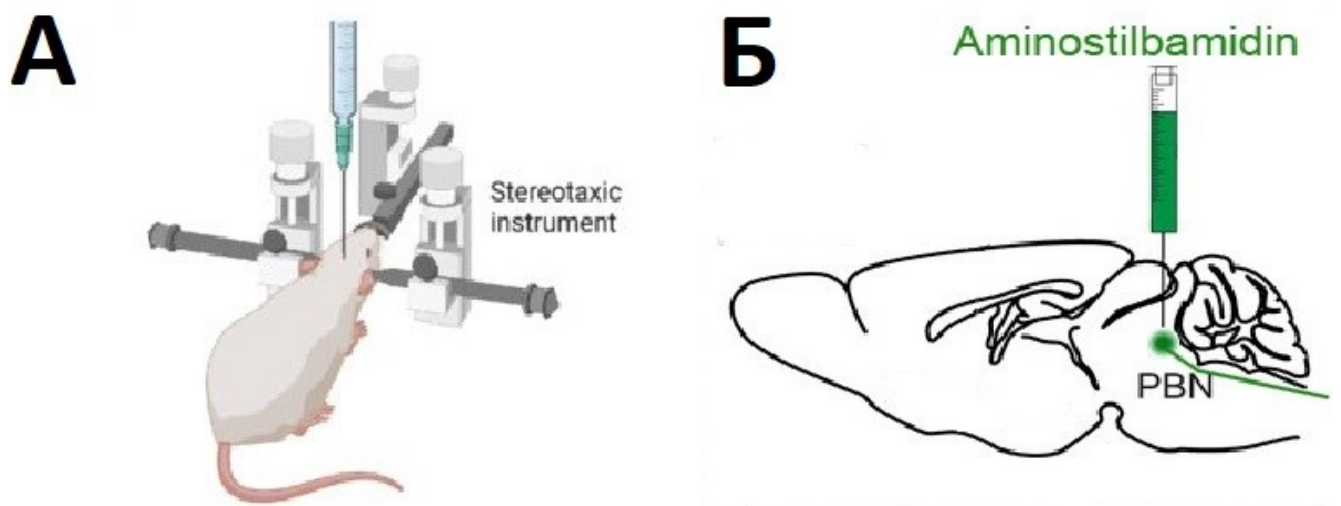


Рис. 2.2.1 Схема метода ін'єкцій в парабрахіальне ядро. (А) Зафіксована в стереотаксі тварина. (Б) Зона ін'єкції аміностилбамідина в мозку щура.

Через три дні після ін'єкції барвник ретроградно досягав сом спинномозкових парабрахіальних нейронів, що дозволяло почати дослідження на цих тваринах.

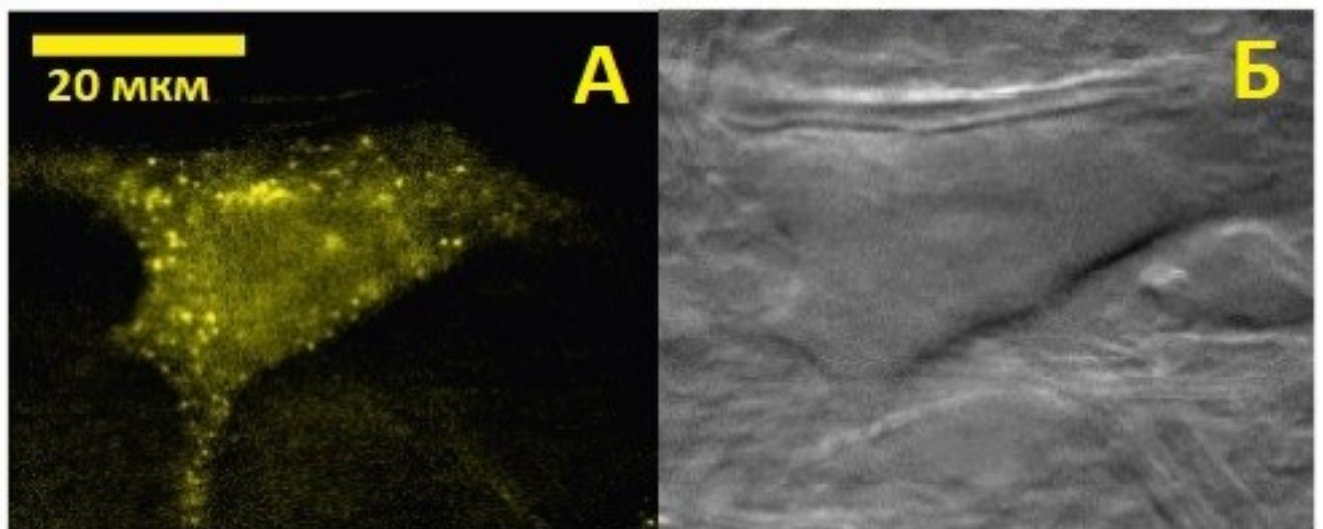


Рис. 2.2.2 Фотографія міченого нейрона. (А) Під час флюоресценції. (Б) Під інфрачервоним освітленням.

2.3 Модель хронічного нейропатичного болю

Хронічний нейропатичний біль моделювався за допомогою часткового пошкодження сідничного нерва, використовуючи загальновизнану методику [61], яка широко застосовується в експериментальних дослідженнях болю. Проте в нашому випадку процедура була дещо модифікована з метою підвищення стабільності та виразності больових симптомів. Зокрема процедура проводилася відповідно до стандартного протоколу але з однією важливою відмінністю: для посилення алодинії та індукції спонтанного болю проводили аксотомію та лігацію великогомілкової та литкової гілок сідничного нерва, залишаючи неушкодженою загальну малогомілкову гілку. Такий підхід дозволяв створити більш стійку і надійну модель нейропатичного болю.

Для проведення операції щурів анестезувалися за допомогою ізофлурану у спеціальній камері, після чого їх переміщували на операційний стіл, де здійснювали підтримку анестезії через маску. Операційне поле в асептичних умовах голили та обробляли розчином повідон-йоду (Egis, Угорщина) для зменшення ризику інфекційних ускладнень. Після цього робили розріз через біцепс стегна для візуалізації і доступу до сідничного нерва та його трьох кінцевих гілок: литкової, загальної малогомілкової та великогомілкової. Лігацію та аксотомію проводили на великогомілковій і литковій гілках, залишаючи загальний малогомілковий нерв неушкодженим.

Литкова та великогомілкова гілки були туго ліговані шовним матеріалом (5,0), після чого їх перерізали дистальніше місця лігації (Рис. 2.3), видаляючи 2-4 мм дистального сегмента нерва, задля унеможливлення часткового відновлення. Після цього виконували двоетапне зшивання розрізу тканин, і рану знову обробляли розчином повідон-йоду. У контрольній групі тварин виконували ті ж самі розрізи та маніпуляції з тканинами, але без аксонотомії та лігації нервів, що забезпечувало адекватне порівняння. Протягом операції, а також до повного виходу з анестезованого стану, тварини утримувалися на килимі з

контрольованим підігрівом за температури 30 °C для підтримання нормальної терморегуляції.

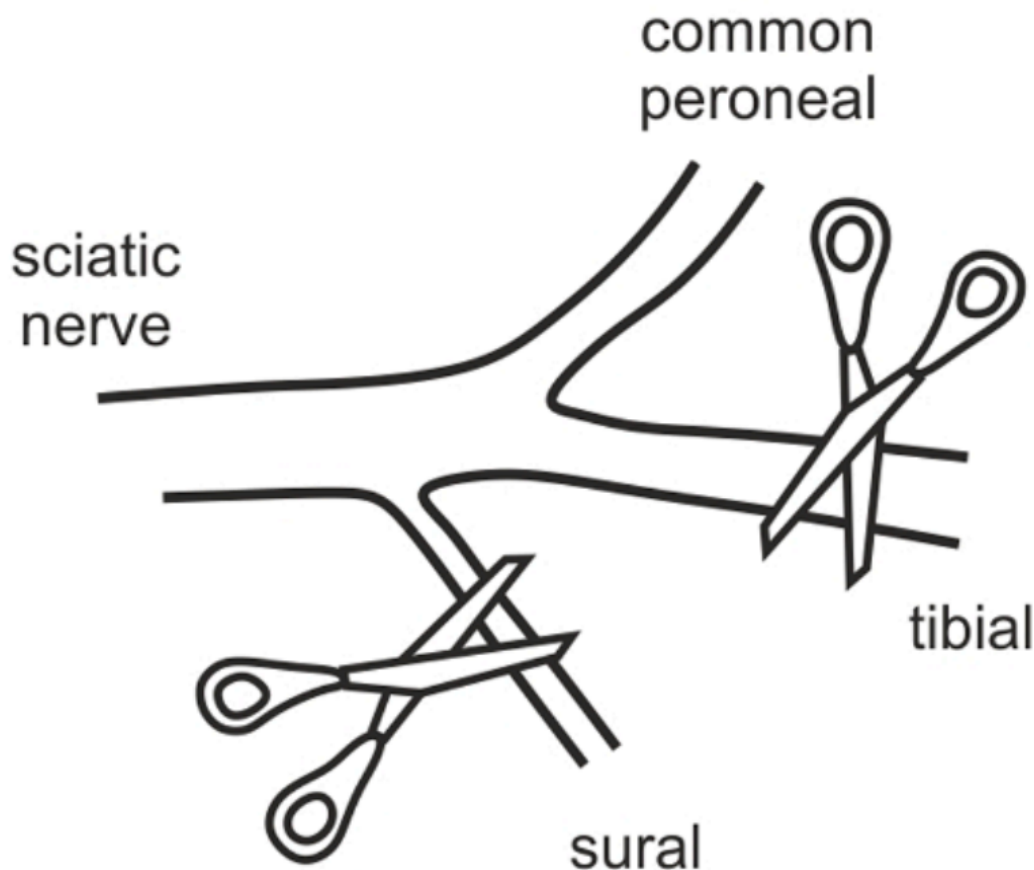


Рис. 2.3 Схema операції з часткового ушкодження сідничного нерва

Оцінку поведінкової активності тварин та визначення порогів механічної і термічної чутливості проводили через сім днів після операції, коли проявлялися виражені ознаки нейропатичного болю.

2.4 Поведінковий тести для оцінки механічної больової чутливості з використанням каліброваних за тиском філаментів фон Фрея

Поведінкові тести були необхідні для того щоб оцінити порогови механічної больової чутливості тварин. Для цього використовували набір філаментів фон Фрея, що дозволяє визначити поріг больової реакції при механічному впливі [62].

Щурів поміщали в спеціальну камеру з сітчастою підлогою, яка забезпечувала доступ до підшви задньої кінцівки (Рис. 2.4 А). Тваринам надавали час для адаптації до експериментальних умов, після чого починали тестування.

До підшви задньої кінцівки (Рис. 2.4 Б) доторкалися каліброваними філаментами фон Фрея різної жорсткості, які забезпечували стандартизовану механічну стимуляцію. У даному дослідженні використовували набір філаментів виробництва BioSeb (Франція). Реакція тварини на стимуляцію оцінювалася за кількістю відсмикувань кінцівки, що вважалося ознакою больової реакції.

Поріг механічної больової чутливості визначали за допомогою філаменту з найменшою жорсткістю, при стимуляції яким тварина відсмикувала кінцівку в 50% випадків. Такий підхід дозволяв об'єктивно оцінити рівень больової чутливості та визначити, наскільки виражені зміни в реакції тварин на механічний вплив у різних експериментальних групах.

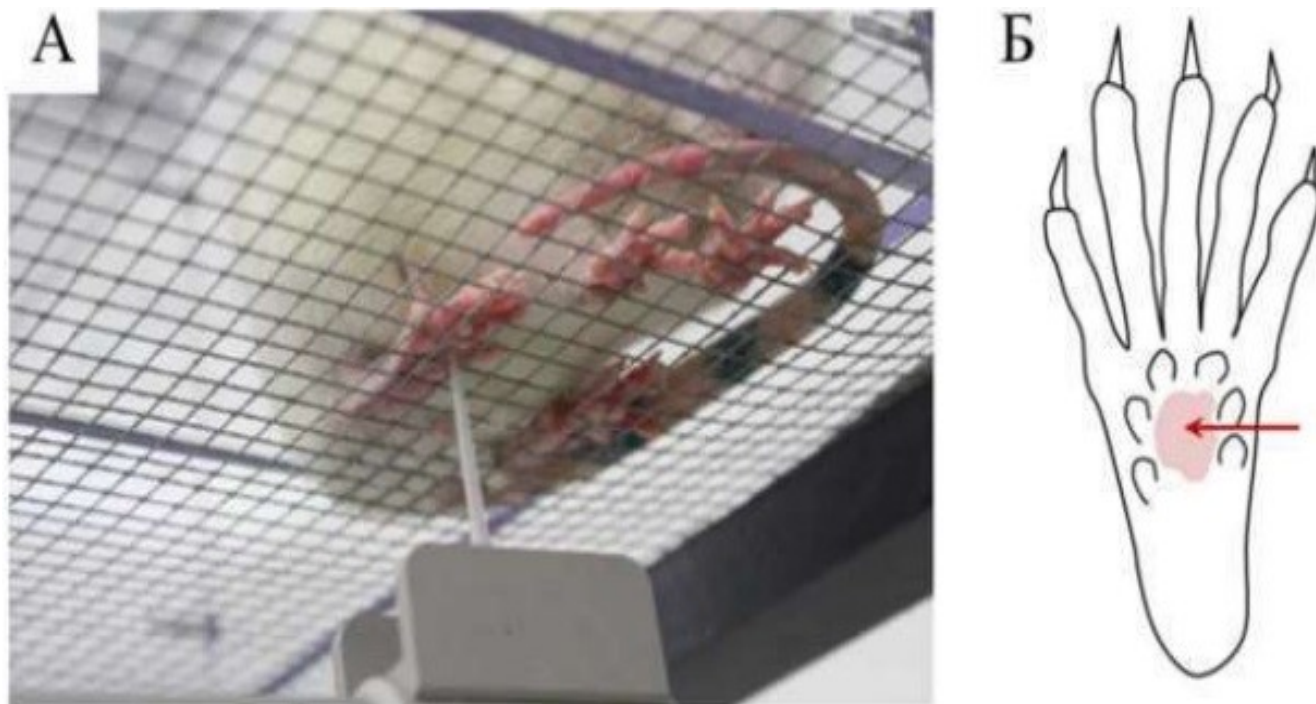


Рис. 2.4. Метод оцінки механічною больової чутливості за допомогою каліброваних філаментів фон Фрея. (А) Фотографія досліду із застосуванням філаментів фон Фрея. Тварина знаходиться в прозорій камері з сітчастим дном, до підошовної поверхні задньої лапи доторкаються каліброваним філаментом фон Фрея. (Б) Схематичне зображення задньої лапи щура із позначенням зони для дотику. Зображення запозичене з роботи[63].

2.5 Поведінковий тест для оцінки термічної больової чутливості методом Харгрівса

Для оцінки порогу термічної больової чутливості у експериментальних тварин використовувався метод Харгрівса [64]. Цей метод дає можливість визначити реакцію тварин на термічний стимул, використовуючи спеціалізоване обладнання, яке дозволяє точно вимірювати час до виникнення больової реакції у відповідь на інфрачервоне випромінювання.

Для проведення тесту використовували пристрій, який складався з прозорих експериментальних камер, встановлених на скляній поверхні, та рухомого джерела інфрачервоного випромінювання, розташованого під склом (Рис. 2.5).

Система лінз дозволяла сфокусувати інфрачервоне випромінювання на верхній поверхні скла, що забезпечувало точковий вплив на певну ділянку підошви задньої кінцівки тварини.

Перед початком тестування щурів розміщували у спеціальних експериментальних камерах і надавали достатній час для адаптації. Цей етап слугував для зменшення стресу тварин і позитивно впливав на якість і відтворюваність отриманих даних. Після завершення адаптаційного періоду джерело інфрачервоного випромінювання підводили під підошву задньої кінцівки тварини та активували його. У ході тестування спостерігали за поведінкою тварини, фіксуючи момент появи характерної больової реакції, такої як відсмикування кінцівки, тріпотіння або зміна пози. Час між активацією джерела випромінювання та появою больової реакції вимірювався за допомогою автоматичної системи з точністю до 0,1 секунди. Такий підхід дозволяв об'єктивно оцінити поріг больової чутливості у відповідь на термічний стимул, забезпечуючи високу точність і відтворюваність результатів.



Рис. 2.5 Вимірювання порогу больової термічної чутливості на експериментальній системі за методом Хагрівса. Зображення надано виробником Ugo Basile.

Для запобігання можливим пошкодженням тканин, тривалість дії інфрачервоного випромінювання була обмежена 30 секундами. Цей поріг було встановлено для захисту тварин від опіків та дотримання етичних вимог експерименту.

У цьому дослідженні підошовний тест Харгівса проводився за допомогою обладнання виробництва компанії Ugo Basile (Італія). Зображення цього обладнання наведене на Рис. 2.5, що ілюструє використаний пристрій та його компоненти.

2.6 Методики отримання цілісних *ex vivo* препаратів спинного мозку для дослідження I та X пластинок

Обробка сенсорної інформації, особливо ноцицептивної, у спинному мозку відбувається через складні взаємодії між нейронними мережами [59]. Для вивчення змін активності спинномозкових-парабрахіальних нейронів (СПН) важливо зберегти ці взаємодії в інтактному середовищі, що забезпечується використанням *ex vivo* препаратів. Ці моделі, описані в роботах [46,59,65], дозволяють зберігати як рострально-каудальну, так і медіолатеральну архітектуру спинного мозку, а також забезпечують збереження аферентних волокон, що важливо для дослідження центральних аксонів дорсальних корінцевих гангліїв нейронів. Це робить їх більш придатними для вивчення СПН у порівнянні з тонкими зрізами спинного мозку.

Для дослідження спинномозкових-парабрахіальних нейронів I пластинки використовували щурів віком 27-30 постнатальних днів. Після декапітації тіло щура фіксували голками за кінцівки до операційного столу, зрізали шкіру спини і ножицями вирізали хребет, залишаючи фрагменти ребр для подальшої фіксації. Після чого хребет переносили та занурювали в оксигенований розчин сахарози, що містив (ммоль/л): сахароза – 200, KCl – 2, NaH_2PO_4 – 1,2, CaCl_2 – 0,5, MgCl_2 – 7, NaHCO_3 – 26, глюкоза – 11 (pH 7,4 при насиченні 95% O_2 та 5% CO_2) і фіксували голками (Рис. 2.6 А) до композитного дна камери. Усі хімічні речовини, що використовувалися в дослідах, були виробництва компанії «Sigma-Aldrich» (США). Температура розчину підтримувалася на рівні кімнатної (20-24°C). Під стереомікроскопом Olympus SZX7 хребці розрізали мікроножицями вздовж бокових проекцій не ушкоджуючи спинний мозок (Рис. 2.6 Б). Спинний мозок

делікатно виділяли разом із збереженими дорсальними корінцями сегментів L4 або L5 відсікаючи їх якомога ближче до гангліїв (Рис. 2.6 В).

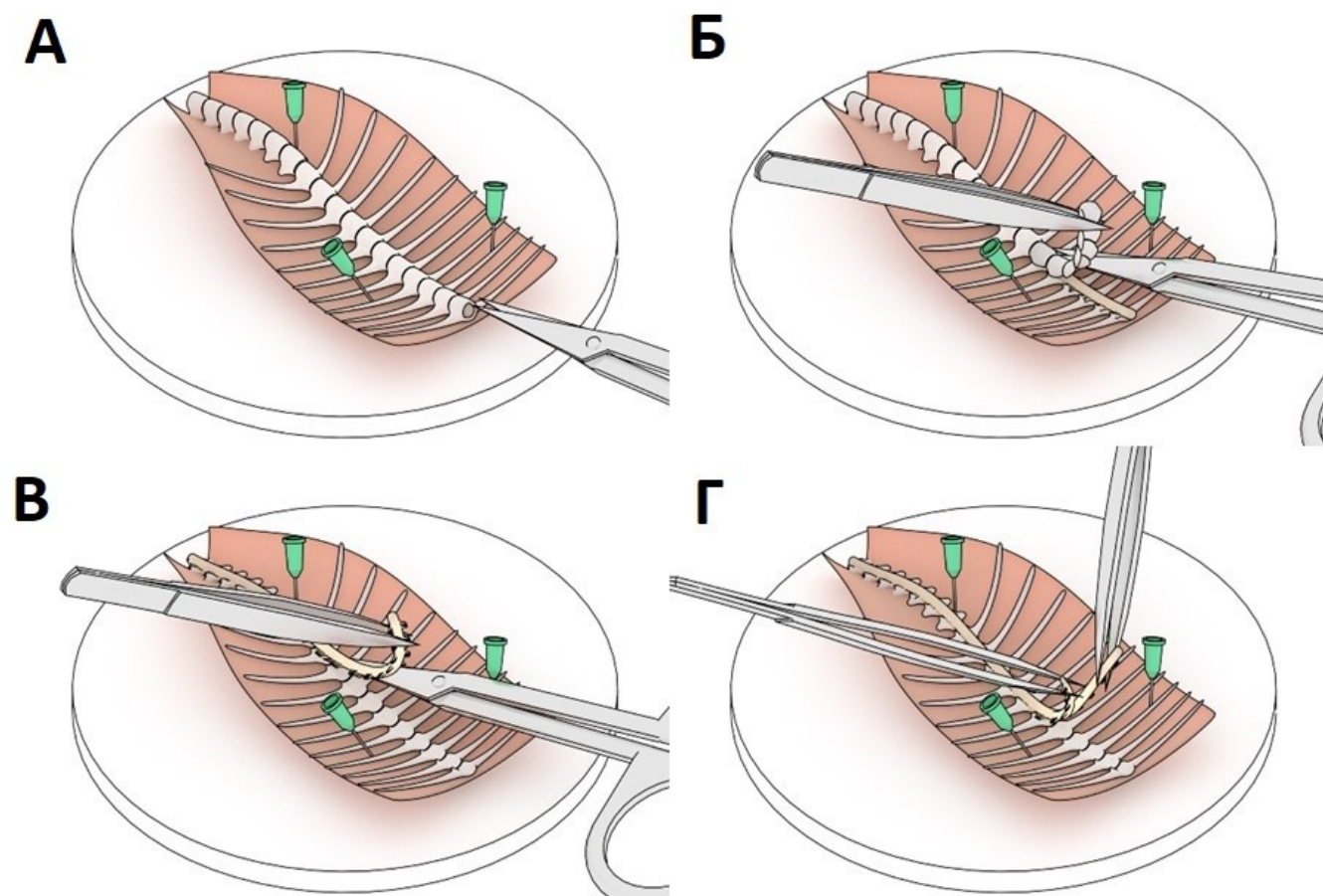


Рис. 2.6 Операція з виділення спинного мозку. (А) Фіксація хребта голками за фрагменти ребр. (Б) Розрізання хребта для отримання доступу до спинного мозку (В) Підрізання сполучних з хребтом тканин і корінців для остаточного відділення спинного мозку. (Г) Розривання препарату за допомогою пінцетів вздовж *median fissure* і *median sulcus* для отримання доступу до нейронів пластинки X.

Тверду та м'яку мозкові оболонки видаляли довкола зони входу L4 L5 корінців, щоб покращити візуалізацію нейронів і уникнути механічних перешкод під час реєстрації. Після цього спинний мозок фіксували до металевої пластини корінцями догори за допомогою ціанакрилового клею та поміщали в пластикову камеру, надруковану на 3D-принтері. Камеру заповнювали розчином бікарбонату

Кребса, який містив (ммоль/л): NaCl – 125, KCl – 2,5, NaHCO₃ – 26, NaH₂PO₄ – 1,25, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, глюкоза – 10 (pH 7,3 при барботуванні 95% O₂ та 5% CO₂). Швидкість перфузії становила 1,5-2 мл/хв.

Для дослідження X пластинки спинного мозку використовували щурів лінії Вістар віком 11-13 постнатальних днів. Вибір цього вікового діапазону пояснювався тим, що у тварин старшого віку (>15 днів) якість візуалізації спинного мозку в *ex vivo* препаратах значно знижується, що ускладнює проведення електрофізіологічних досліджень. Процедура була такою ж як і при приготуванні препарату для досліджень спинно-парабрахіальних нейронів пластинки I окрім певних модифікацій. По-перше не було необхідним зберігати L4 або L5 корінці. По-друге необхідно було очистити мозок від твердої оболонки вздовж median fissure і median sulcus . По-третє необхідно було обережно розділити спинний мозок вздовж середньої лінії (Рис. 2.6 Г), аби мати можливість отримати доступ до нейронів пластинки X. По-четверте препарат до металевої пластинки треба було фіксувати корінцями донизу, щоб нейрони пластинки X були зверху.

Процедура від видалення хребта до повного виділення спинного мозку тривала 5-6 хвилин.

2.7 Використання бічного інфрачервоного освітлення для візуалізації нейронів в I та X пластинках спинного мозку

У дослідженнях, що потребують візуалізації клітин у товстих тканинних зрізах, традиційні методи, такі як диференційно-інтерференційний контраст Номарського, мають обмеження щодо ефективності при роботі з зразками товщиною понад 500–600 мкм. Для подолання цих обмежень застосовують альтернативні підходи, зокрема метод бічного освітлення за допомогою інфрачервоного світлодіода. Цей метод забезпечує рівномірне проникнення світла в тканину, що дозволяє отримувати чіткі зображення клітинних структур навіть у зразках значної товщини.

Інфрачервоний світлодіод з довжиною хвилі 860 нм (SFH4716as, Osram) слугував джерелом світла, а мікроманіпулятор на якому він був встановлений дозволяв регулювати кут нахилу в межах 10-30 (Рис. 2.7.1). Такий кут освітлення створював необхідний тіньовий контраст, який значно покращував візуалізацію клітин, дозволяючи чітко бачити нейрони навіть на глибині в десятки мікрометрів.

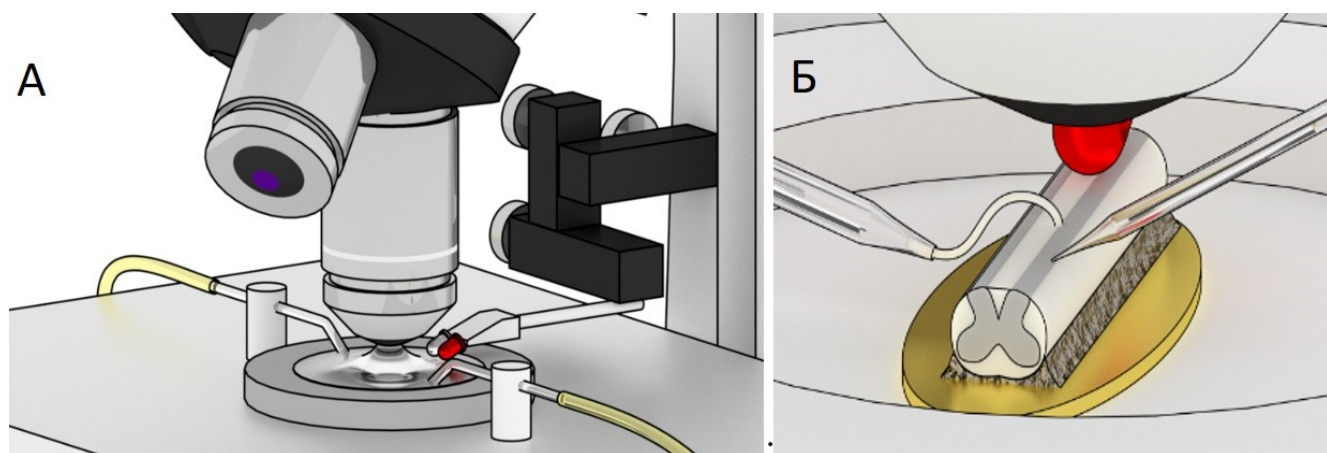


Рис. 2.7.1 Схематичне зображення експериментальної установки для досліджень цілісного препарату спинного мозку з використанням бічного інфрачервоного освітлення. (А) Експериментальна установка складається з мікроскопа, білого та інфрачервоного світлодіодів встановлених на мікроманіпуляторі та надрукованої на 3D-принтері камери для розміщення і перфузії препарату. (Б) Препарат, зафіксований до металевої пластини ціанакриловим клеєм, знаходиться в камері для перфузії розчином Кребса. Корінець під'єднаний до скляної піпетки з стимулюючим електродом. Тонка піпетка з реєструючим електродом для петч-клемпу утворює щільний контакт з мембраною нейрона, який візуалізують за допомогою інфрачервоного світлодіода.

Відбите світло збиралося водно-імерсійним об'єктивом LUMPlanFL N 40×/0.80 («Olympus», Японія), який був встановлений на мікроскопі SOM («Sutter Instrument», США). Зображення передавалося на екран за допомогою камери BFLY-U3-23S6M-C («FLIR», США), що забезпечувало високу роздільну здатність

і чіткість зображень (Рис. 2.7.2). Для позиціонування тканини використовувався додатковий білий світлодіод, розташований перпендикулярно до ІЧ-світлодіода, у поєднанні з об'єктивом Plan N 4×/0.10 («Olympus», Японія).

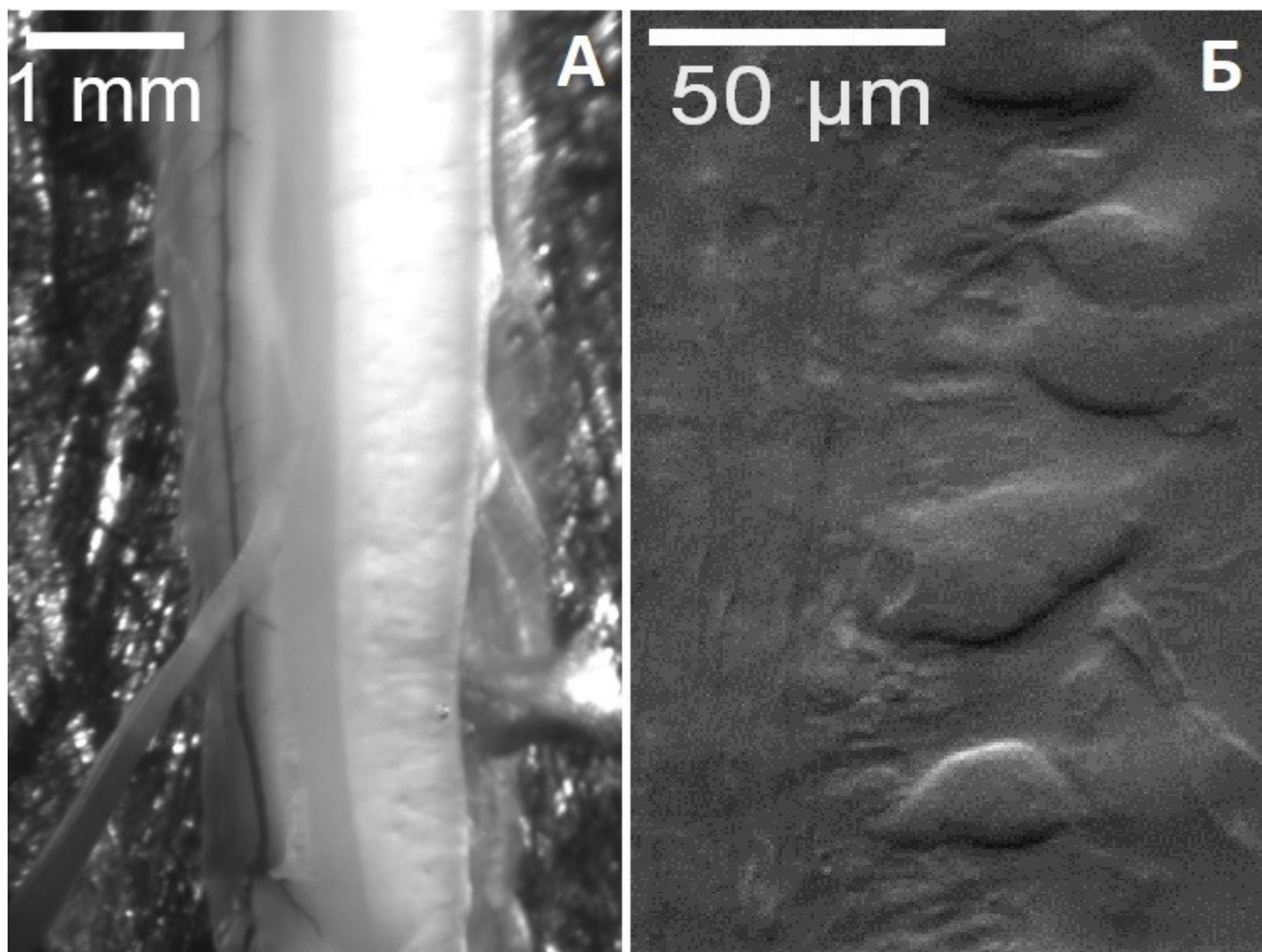


Рис. 2.7.2 Приклад візуалізації препарату. (А) Спинний мозок з дорсальним корінцем під 4х об'єктивом. (Б) Нейрони спинного мозку під 40х об'єктивом.

Така система не тільки значно покращувала контраст, але й дозволяла ефективно візуалізувати нейрони, розташовані у товстих препаратах спинного мозку, зокрема в області між дорсолатеральним канатиком та зоною входу дорзального корінця. Такий підхід виявився надзвичайно корисним для дослідження структур спинного мозку, які важко візуалізувати іншими методами [65].

2.8 «Patch-clamp» методика для реєстрації іонних струмів від нейронів І та Х пластинок

Спонтанні та мініатюрні викликані постсинаптичні струми у нейронах дорсального рогу реєстрували за допомогою методики «patch-clamp» у конфігурації «ціла клітина». Цей метод, запропонований у 1976 році Е. Неєром і Б. Сакманом, є одним із найпоширеніших електрофізіологічних методів для дослідження активності окремих іонних каналів та мембранних струмів. Він полягає в реєстрації струмів, що протікають через ділянку мембрани, електрично ізольовану від зовнішнього середовища скляною мікропіпеткою. Ізоляція забезпечується утворенням гігаомного контакту ($>1 \text{ G}\Omega$) між піпеткою і мембраною клітини, що дозволяє, за допомогою високочутливого підсилювача, реєструвати струми пікоамперного діапазону, характерні для одиночних іонних каналів.

Конфігурація «ціла клітина» є модифікацією цього методу, яка дозволяє вимірювати струми, що проходять через усю мембрану клітини. Після утворення гігаомного контакту мембрану під мікропіпеткою проривають від'ємним тиском, що забезпечує низькоопірний контакт із внутрішньоклітинним середовищем та дозволяє реєструвати трансмембранний потенціал (різниця потенціалів між зовнішньою і внутрішньою поверхнями клітинної мембрани). Локальна фіксація потенціалу проводилася за допомогою однієї мікропіпетки, що значно полегшує роботу з клітинами невеликого розміру, такими як нейрони, і знижує рівень шумів, що критично важливо для реєстрації та аналізу низькоамплітудних струмів.

Для електрофізіологічних реєстрацій *ex vivo* препарат спинного мозку переміщували до експериментальної камери, яку перфузували розчином Кребса зі швидкістю 6-7 мл/хв. Мікропіпетки витягували на пуллері Sutter P-87 («Sutter instruments», США), із борсилікатних заготовок BF150-86-10 Borosilicate glass with filament (зовнішній діаметр — 1,5мм, внутрішній діаметра — 0,86мм, довжина — 10см) («Sutter instruments», США). Діаметр кінчика піпетки становив

1-2 мкМ і створював опір 3-4 М Ω при заповненні внутрішньоклітинним розчином і зануренні в зовнішньоклітинний розчин. Заповнення мікропіпетки внутрішньоклітинним розчином здійснювали за допомогою спеціальної голки MicroFil 28 GA, 67mm («WPI», США). Склад внутрішньоклітинного розчину (ммоль/л): CsCl - 10, Cs-метансульфонат - 130, MgATФ - 4, NaГТФ - 0.4, HEPES - 10, 2Na-фосфокреатин - 5, EGTA (Егтазинова кислота) - 5 (pH 7.3; O_s 290 мОсм). Після занурення піпетки у зовнішньоклітинний розчин проводили компенсацію різниці потенціалів на границі розподілу розчинів. Гігаомний контакт з клітинною мембраною встановлювали шляхом притискання піпетки до поверхні клітини, при цьому в піпетці попередньо створювався незначний надмірний тиск. Після встановлення контакту тиск у піпетці різко робили від'ємним, задля кращого контакту між піпеткою і клітиною і поступово знижували до атмосферного рівня. Для контролю за утворенням щільного контакту на мембрану подавали гіперполяризуючі імпульси амплітудою 10 мВ у режимі фіксації потенціалу. Після встановлення стабільного контакту здійснювали компенсацію ємності піпетки, а для переходу в конфігурацію «ціла клітина» проривали клітинну мембрану шляхом коротких імпульсів від'ємного тиску у піпетці.

Реєстрацію мембранних струмів та подачу командних імпульсів здійснювали за допомогою підсилювачів Axon CNS MultiClamp 700B («Molecular Devices», США) та Axon CNS Axoclamp 900A («Molecular Devices», США) а також аналого-цифрового/цифро-аналогового перетворювача Digidata 1440A («Molecular Devices», США), який контролювали за допомогою програми pClamp 11.3 («Molecular Devices», США). Отриманий сигнал фільтрувався на частоті 2,6 кГц, оцифрування відбувалось на частоті 10 кГц. Для реєстрацій струмів потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні -70 мВ. До перфузійного розчину прикладали речовини до кінцевих концентрацій: тетродотоксин - 0,5 мкмоль/л; капсаїцин - 1 мкмоль/л; AP-5 – 30 мкмоль/л; CNQX - 10 мкмоль/л.

2.9 Стимуляція дорсальних корінців спинного мозку

Дорзальні корінці L4-L5 засмоктували в стимуляційний електрод (Рис. 2.9) з діаметром кінчика 200-400 мкм виготовленого з заготовок BF150-86-10 і стимулювали струмом використовуючи стимулятору ISOFlex (AMPI, Israel) [46,65]. Прямокутні імпульси тривалістю 50 мкс були подані для стимуляції А β - та А δ -волокон. Вважалось, що стимули інтенсивністю 10-50 мкА активували низькопорогові волокна, стимули 60-100 мкА активували волокна ноцицептивного діапазону. Імпульси тривалістю 1 мс і інтенсивністю від 30 до 140 мкА активували всі типи волокон, включаючи високопорогові А- і С-аференти. Для того щоб запобігти адитивного ефекту, який спостерігається в спинномозкових-парабрахіальних нейронах [66] частота стимуляції була обмежена 0,1 Гц.

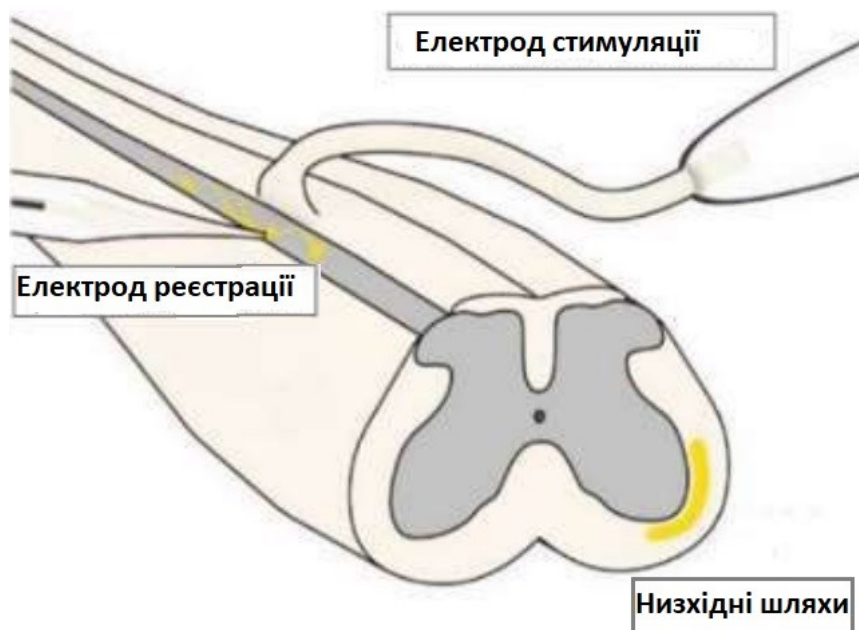


Рис. 2.9. Схематичне зображення експерименту дослідження відповідей нейронів пластинки I на стимуляцію дорзального корінця.

Детектування викликаних постсинаптичних подій здійснювали за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення NeuroExpress (розробленого Attila Szücs, Угорщина). Аналізували лише ті реєстрації, що не

демонстрували змін базової лінії струму, середньоквадратичне значення шуму якої не перевищувало 15пА при фіксації потенціалу на -70 мВ. Детектування проводили в автоматичному режимі з підбором оптимальних параметрів детекції. Результати вручну перевіряли на наявність хибно позитивних подій.

Спонтанні та мініатюрні викликані постсинаптичні події оцінювали за кількома ключовими параметрами. По-перше, аналізували частоту подій, яка визначалася як загальна кількість виявлених подій, поділена на тривалість часу реєстрації. Другим параметром був інтервал між подіями (IEI) — часовий проміжок між двома послідовними піками синаптичних подій. Крім того, вимірювали амплітуду кожної події, що відображала максимальну зміну струму.

Кінетику спаду постсинаптичного струму також ретельно аналізували. Для цього програма автоматично фіксувала час спаду, який визначався як часовий проміжок між піковою амплітудою синаптичної події та моментом, коли величина струму знижувалася до 37% від максимальної амплітуди, це давало можливість відсіяти артефакти пов'язані з шумом базової лінії реєстрації. Цей параметр є важливим для оцінки динаміки процесів у нейронних мережах.

2.10 Статистична обробка результатів дослідження

Для перевірки нормальності розподілу всі набори даних аналізували за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Якщо результати свідчили про гаусівський розподіл, дані подавалися у форматі «середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього» і порівнювалися двовибірковим парним або непарним t-тестом Стьюдента. Для даних які не відповідали нормальному розподілу наводилося медіанне значення вибірок, а статистична значущість відмінностей оцінювалася за допомогою непараметричних тестів Манна-Вітні або Колмогорова-Смірнова.

У цьому дослідженні проводилися два типи аналізу: а) загальний аналіз усіх викликаних синаптичних подій в клітинах, де достовірність різниці між функціями розподілу оцінювали тестом Колмогорова-Смірнова; б) аналіз

медіанних значень параметрів для окремих клітин, де статистичну достовірність перевіряли за допомогою тесту Манна-Вітні.

Для категорійних даних використовувався точний тест Фішера. Відмінності між порівнюваними величинами вважалися значущими, якщо ймовірність помилки першого роду (нульової гіпотези) була меншою за 5% ($p < 0,05$). Усі результати супроводжувалися зазначенням числа експериментів (n), яке відповідало кількості клітин з яких було проведено електрофізіологічні реєстрації.

Для класифікації нейронів за електрофізіологічними параметрами застосовувався кластерний аналіз методом К-середніх (k-means clustering). Цей метод дозволяє розподілити спостереження на задану кількість груп (кластерів) на основі схожості за обраними ознаками. У роботі для кластеризації використовували дві основні характеристики нейронів — амплітуду та частоту потенціалів дії.

Для оцінки якості кластеризації використовувався силуетний коефіцієнт (silhouette coefficient), який вимірює, наскільки кожен об'єкт схожий на свій власний кластер у порівнянні з іншими кластерами. Значення коефіцієнта варіюються від -1 до +1, де значення ближче до +1 свідчить про чітко виражені, добре розділені кластери, а значення близьке до 0 або негативне — про перекриття чи неправильне віднесення об'єктів. Використання силуетного коефіцієнта дозволило обрати оптимальне число кластерів і підтвердити адекватність розподілу нейронів за амплітудою та частотою.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Типи спинномозкових-парабрахіальних нейронів в пластинці I та їх електрофізіологічні зміни в моделі нейропатичного болю

Наведені в цьому розділі результати підтверджують сучасні уявлення, що больова чутливість є складним багаторівневим процесом, який починається від периферичних сенсорних волокон і сягає центральних структур спинного та головного мозку, де формується і модулюється остаточний больовий сигнал. Одним із важливих аспектів цього процесу є функціонування спинних проєкційних нейронів пластинки I, які передають сенсорну інформацію до парабрахіального ядра в стовбурі мозку, а надалі – до інших відділів центральної нервової системи. У нормальних умовах ці нейрони активуються переважно високопороговими стимулами, тобто тими які відповідають больовим подразниками (наприклад, сильним механічним тиском чи високі температури). Завдяки цьому біль зазвичай чітко відмежовується від інших (небольових) тактильних впливів. Водночас у патологічних станах, як-от хронічний нейропатичний біль, такий механізм диференціації порушується, що призводить до надмірної збудливості ноцицептивних шляхів.

Завдяки методам петч-клемпу, застосованим у препаратах *in vivo* та *ex vivo*, було встановлено, що спинно-парабрахіальні нейрони (СПН) поділяють на кілька груп залежно від їх електрофізіологічного патерну активності (кількості потенціалів дії, які вони генерують у відповідь на активацію аферентних волокон різного порогу збудження). Ці електрофізіологічні властивості дозволяють виокремити нейрони з так званими низьким (LO), середнім (MO) та високим (HO) рівнем активності. LO зазвичай генерують не більше двох потенціалів дії у відповідь на сильну (високопорогову) стимуляцію, тоді як HO можуть генерувати десять і більше потенціалів дії та демонструвати наростання частоти розрядів залежно від амплітуди чи тривалості стимулу. MO являють собою проміжну

групу, яка формує кілька потенціалів дії у відповідь на кожний імпульс. Подібна класифікація ілюструє функціональну різноманітність цих нейронів та дає змогу зрозуміти, як саме пластинка I кодує ноцицептивну інформацію, розрізняючи різні рівні болючої стимуляції.

В умовах патологічних станів, як-от нейропатичний біль, відбувається порушення нормальних механізмів, які обмежують збудження лише високوپороговими стимулами. Нейропатичний біль часто супроводжується такими явищами як гіпералгезія (коли звичайні больові подразники сприймаються надмірно інтенсивними), алодинія (коли навіть нормальний стимул сприймається як больовий) та спонтанний біль (який виникає за відсутності будь-якого подразнення). Клінічні оцінки свідчать, що нейропатичний біль вражає до 17 відсотків людей, погіршуючи їхню якість життя, і водночас сучасні методи лікування не завжди ефективні через недостатнє розуміння комплексних механізмів, які лежать в основі цього болю.

Одним зі способів дослідити ці механізми є моделі індукції патологічних станів, таких як нейропатія, зокрема модель часткового ушкодження сідничного нерва (SNI), яка відтворює важливі аспекти клінічної картини: механічну гіпералгезію, алодинію та спонтанний біль. У нашому дослідженні було використано модифіковану процедуру, що передбачала аксотомію і лігування великогомілкової та литкової гілок сідничного нерва при збереженні загальної малогомілкової гілки, виконану на щурах віком P19–20. Такий вік тварин обумовлений достатньою стійкістю тканин до механічних впливів, вже сформованими синаптичними структурами і зручними для стимуляції розмірами корінців L4-L5. Завдяки такій модифікації вдалося досягти більш виражених ознак спонтанного болю й алодинії (в порівнянні з стандартним протоколом SNI). Через сім днів після операції відбувалась повторна оцінка чутливості для підтвердження розвитку нейропатії. Для об'єктивної оцінки больового стану було проведено стандартні поведінкові тести: тест Харгрівза, що дозволяє оцінювати термічну чутливість (час до відсмикування лапи у відповідь на тепловий стимул),

і тест фон Фрея, орієнтований на визначення механічної чутливості (мінімальна сила, за якої тварина відсмикує лапу у відповідь на дотик каліброваного за механічним тиском нейлонового філаменту). За результатами термічного тесту в контрольній і піддослідній групі особливої різниці між контралатеральною та іпсілатеральною лапами не було знайдено – тобто термочутливість істотно не змінилася, тоді як поріг відсмикування лапи при тесті фон Фрея (Рис. 3.1.1) суттєво знизився (з 5.9 ± 1.0 г до 3.3 ± 0.6 г, відсоткове зменшення у $44.1 \pm 10.9\%$) на боці ушкодження у піддослідних тварин, що свідчить про розвиток механічної алодинії. Також було відзначено епізоди явної спонтанної больової поведінки, коли тварини проявляли посмикування та облизування іпсілатеральної лапи без видимого зовнішнього впливу. Це вказує на спонтанний біль, характерний для нейропатичного больового стану.

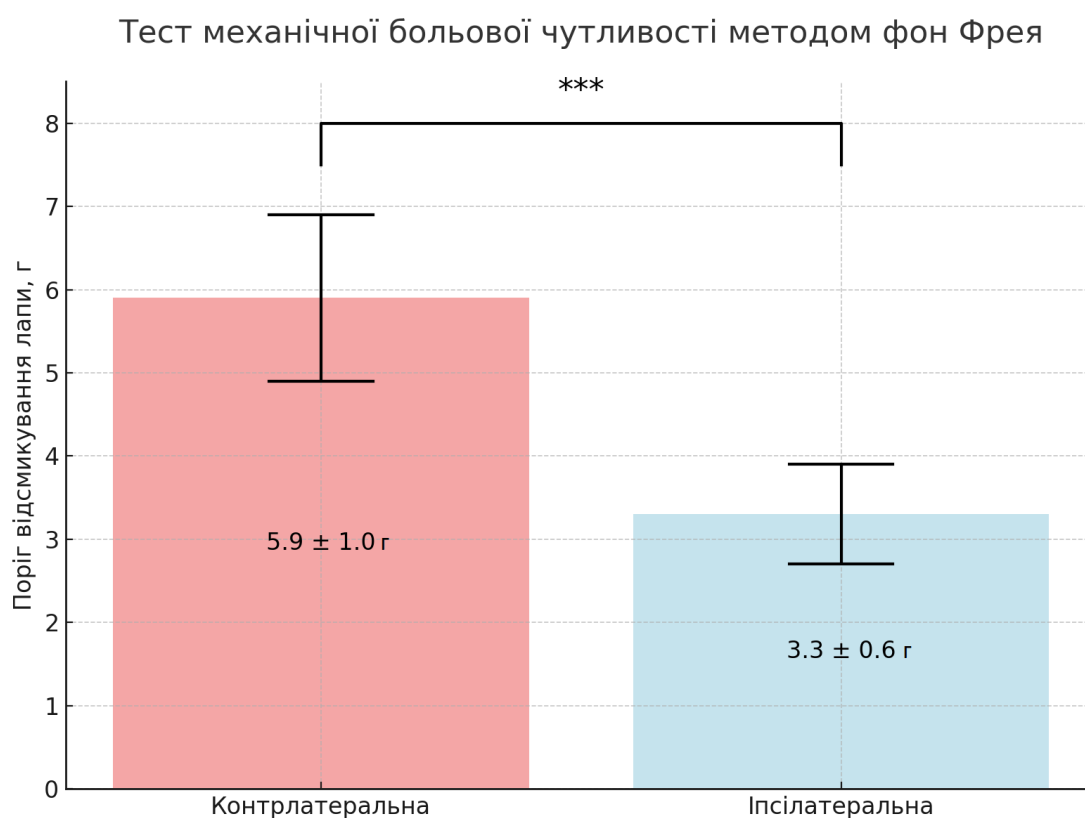


Рис. 3.1.1 Пороги відсмикування лапи (оцінений тестом на філаментах фон Фрея) контралатеральних та іпсілатеральних задніх кінцівок через 7 днів після SNI. Дані представлені як середнє $\pm$ середнє квадратичне відхилення. *** - $p < 0,001$ (парний t -критерій Стьюдента, $n = 9$)

Для зменшення наркологічного навантаження і операційного стресу у піддослідних тварин безпосередньо перед операцією з часткового ушкодження сідничного нерва, після проведення контрольних тестів, виконували операцію з ретроградного мічення спинних проекційних нейронів пластинки I шляхом ін'єкції флуоресцентного барвника (аміностильбамідину) у парабрахіальну ділянку, контралатеральну до ушкодженого нерва. Це дозволяло ідентифікувати популяцію нейронів, яка передає ноцицептивний сигнал до зазначеної ділянки мозку. Завдяки цій процедурі через сім-десять днів після операції (тобто на етапі, коли симптоми нейропатії вже чітко проявлялися) можна було отримати препарат спинного мозку з інтактними дорсальними корінцями і під мікроскопом побачити флуоресцентне забарвлення нейронів пластинки I, що дає змогу цілеспрямовано реєструвати їхню електрофізіологічну активність.

Наступний етап полягав у проведенні петч-клемп записів *ex vivo*. При цьому готувався препарат цілісного спинного мозку, зі збереженням дорсальних корінців (L4–L5), а також зберігалися синаптичні зв'язки, аби ми могли електрично стимулювати аферентні волокна і бачити, як саме реагують на ці стимули мічені нейрони у пластинці I. Важливо зазначити, що в умовах петч-клемп можна реєструвати потенціали дії з високою точністю, аналізувати пасивні параметри клітинної мембрани (мембранний опір, мембранний потенціал спокою) та докладно відстежувати, скільки саме потенціалів дії генерує нейрон у відповідь на прикладені до корінців стимули різної сили та тривалості. Було використано декілька режимів стимуляції. Щоб стимулювати низькопорогові волокна (A β та A δ), застосовували прямокутні імпульси з тривалістю 50 мкс і силою струму 10–50 мкА, які асоціюються з не ноцицептивною сигналізацією. Для того щоб також активувати високопорогові A δ -волокна – силу струму підвищували до 60–100 мкА, при тій самій тривалості імпульсу, а коли потрібно було залучити всі типи волокон, у тому числі повільні C-волокна, тривалість імпульса подовжували до 1 мс і варіювали силу в діапазоні 30–140 мкА, покриваючи тим самим максимально можливий спектр аферентної іннервації.

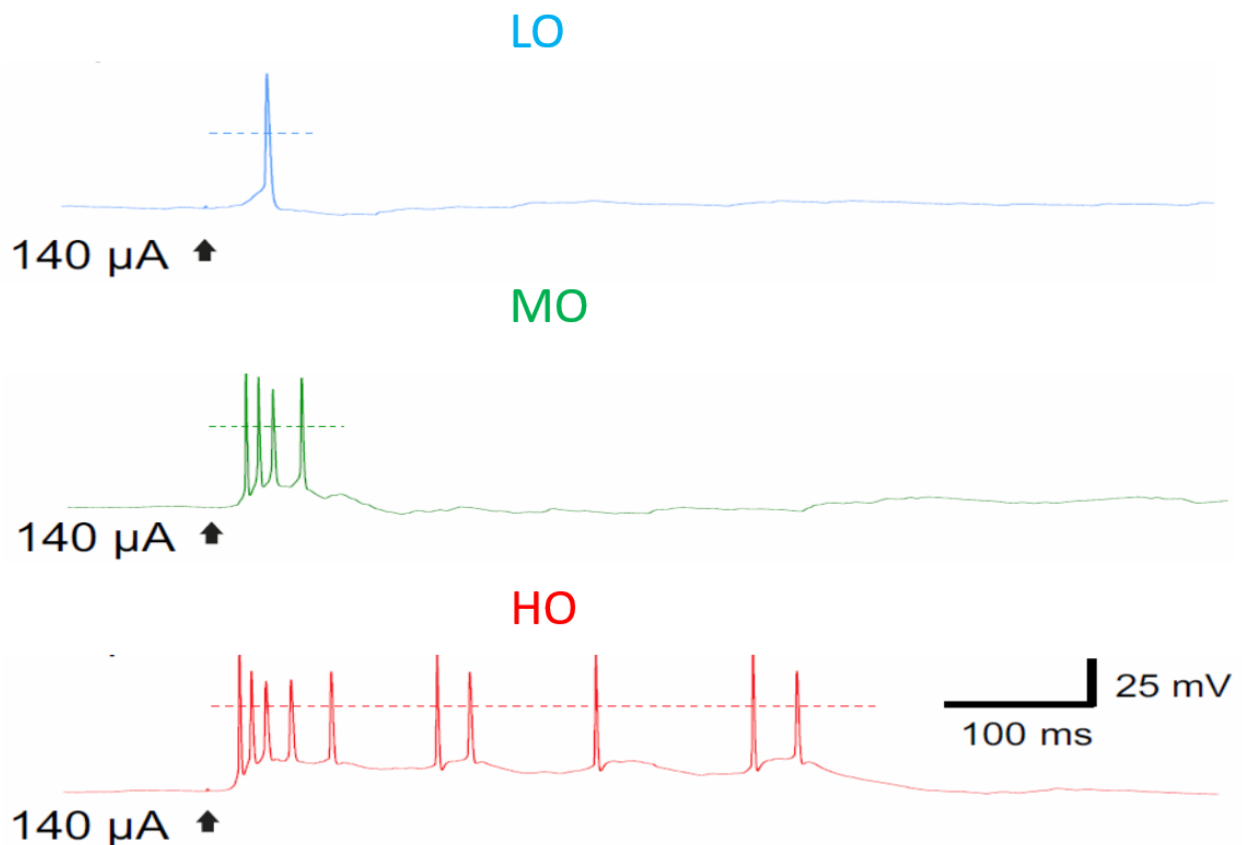


Рис. 3.1.2 Патерни генерації потенціалів дії спинно-парабрахіальними нейронами пластинки I в контрольних тварин у відповідь на стимуляцію дорсального корінця імпульсом тривалістю 1мс і амплітудою 140μА. Важливо зазначити, що на низькопорогові стимули (тривалістю 50 мкс і струмом менше 50 μА) нейрони не відповідали генерацією потенціалів дії.

У контрольній групі (тварини того самого віку, яким робили лише розтин без аксотомії та лігування) вдалося встановити, що приблизно 62% мічених нейронів належать до групи LO (вони формували один–два потенціали дії у відповідь на високопорогові стимули), 19% – до групи HO (генерували багато потенціалів дії – від 10 до 20 – зі зростанням сили подразника) і ще 19 % складали МО, які продукували три–шість потенціалів дії (Приклади патернів генерації потенціалів дії кожною з цих груп наведені на Рис. 3.1.2). Такий розподіл імовірно відображає різні ролі, які відіграють ці групи нейронів у передачі болю, коли LO вибірково сигналізують лише про сильні подразники, а HO можуть масштабувати

відповідь та інтегрувати додаткові впливи від спінальних інтернейронів, а МО, імовірно, відіграють проміжну роль у модулюванні больових сигналів.

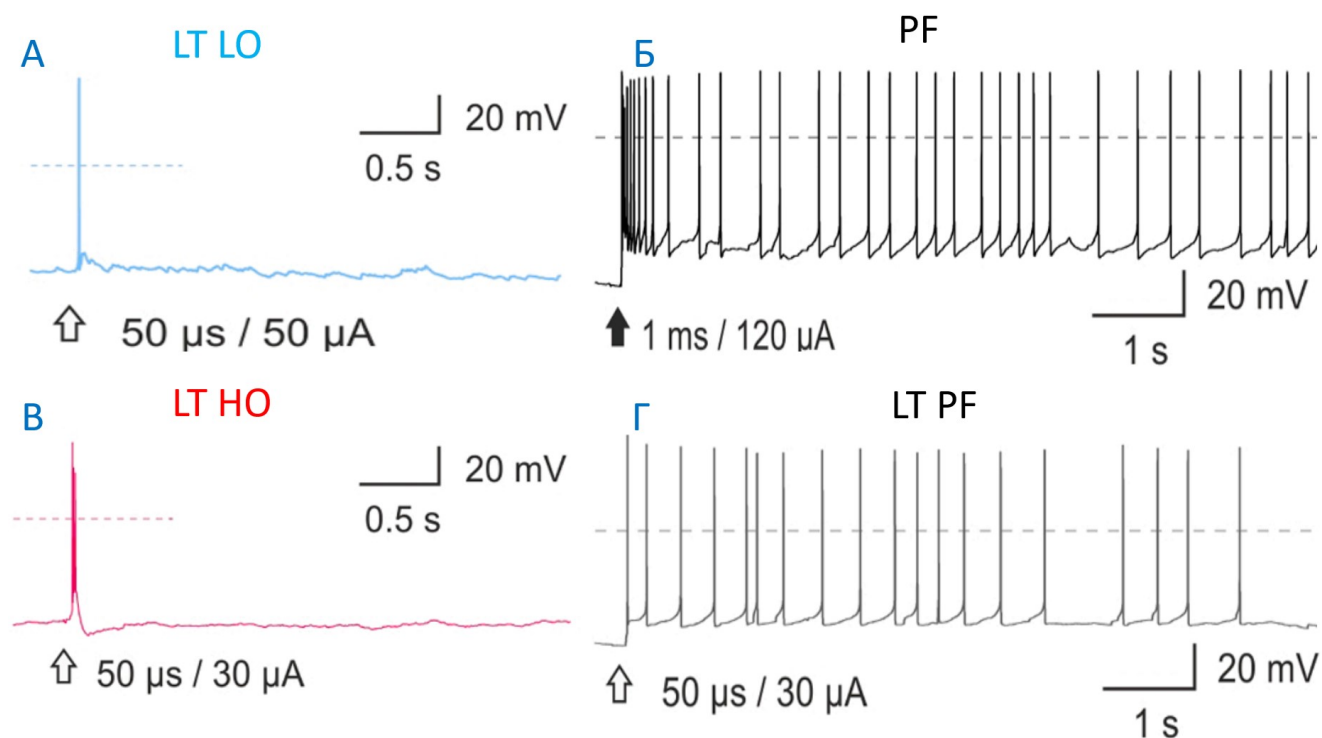


Рис. 3.1.3 Патологічні типи спинно-парабрахіальних нейронів пластинки I в моделі нейропатичного болю. Низькопорогові LO (A) і HO (B). Клітини з станом постійної генерації PF (C), низькопорогові клітини з станом постійної генерації LT PF (D)

Проте після часткового ушкодження сідничного нерва патерн відповіді змінився досить радикально. Насамперед привертає увагу те, що група МО фактично зникла – жодного нейрона з 3–6 потенціалами дії ми не змогли зареєструвати в тканинах тварин із SNI (n=18). Натомість LO та HO збереглися, проте їхні електрофізіологічні властивості зазнали алодинічного зсуву – нейрони, що раніше реагували лише на високопорогові стимули, тепер почали генерувати потенціали дії вже при низькопороговій стимуляції (приблизно 3 з 8 LO і 1 з 4 HO). Такі нейрони назвали низькопороговими (low threshold (LT) (Рис. 3.1.3 A і B)). Це свідчить, що нейрон, який за нормальних умов залишався б мовчазним при низькопороговій стимуляції, що імітує тактильний чи помірний механічний вплив, починає реагувати на нього як на больочий стимул. Така зміна може

пояснювати виникнення алодинії, коли дотик або незначна сила тиску сприймаються як відчутний біль.

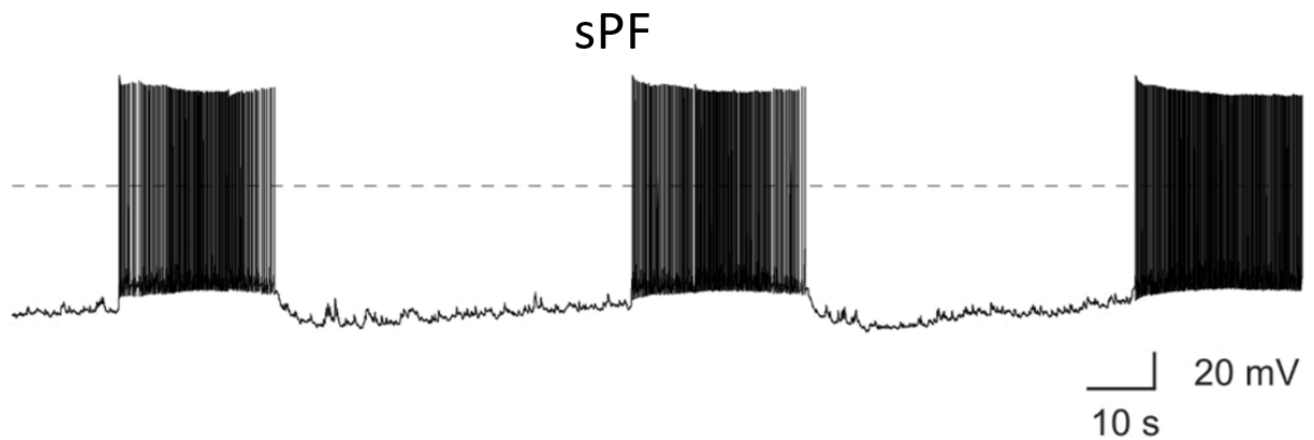


Рис. 3.1.4 Електрофізіологічний запис нейрона зі станом спонтанної постійної генерації.

Також було виявлено ще один тип клітин з станом, так званої, постійної генерації (persistent firing (PF))(Рис. 3.1.3 Б і Г)), коли стимуляція аферентних волокон запускає тривалий (десятки секунд) стан генерації потенціалів дії у нейроні. У приблизно третини тварин із SNI можна було зареєструвати таку пролонговану активність, яка подекуди виникала навіть на низькопорогові стимули (low threshold persistent firing (LT PF)). Цікаво, що жоден LO чи НО у наших записах не проявляв стану постійної генерації, а натомість виникав новий підтип SPN, який можна вважати специфічним для нейропатії.

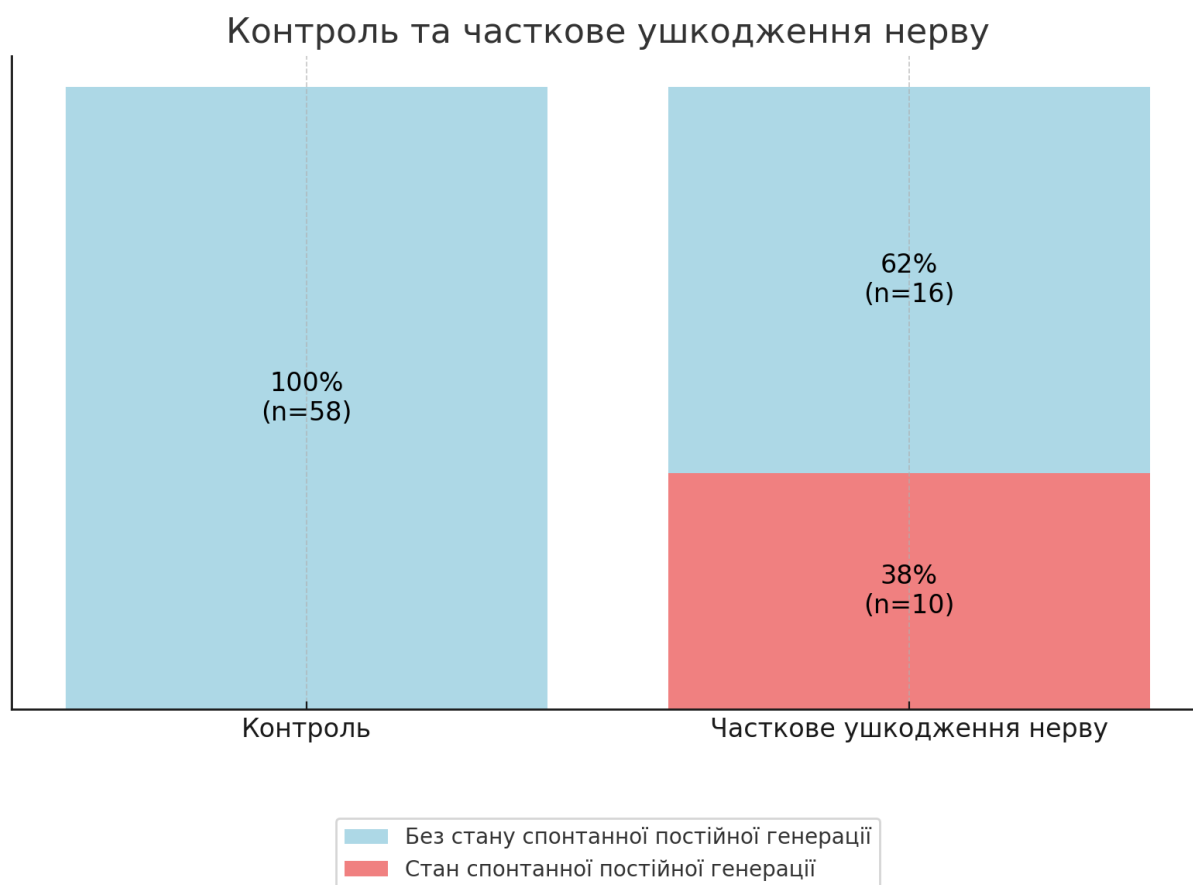


Рис. 3.1.5 Діаграма яка відображає появу клітин зі станом спонтанної постійної генерації та їх пропорційний розподіл.

В окремих випадках міг проявлятися стан спонтанної постійної генерації (spontane persistent firing (sPF) (Рис. 3.1.4)), який виникав без стимуляції первинних аферентів. Цей феномен є особливо важливим, оскільки він може відповідати за виникнення стійкого болю, що зберігається тривалий час і не залежить від будь-яких фізичних подразнень. Можливо, що в нормі такі клітини або перебувають у дуже неактивному стані, або їхня кількість та вплив занадто незначні, аби впливати на процес передачі і обробки сенсорної інформації, тоді як у патологічних умовах вони починають відігравати значну роль (Рис. 3.1.5). Спонтанний біль, який клінічно описується пацієнтами як постійне ниюче відчуття або неприємне поколювання, за такого механізму може бути зумовлений надмірною збудливістю нейронів, які, втративши свої нормальні регуляторні обмеження (наприклад від зменшеної гальмівної активності), починають генерувати розряди «самостійно».

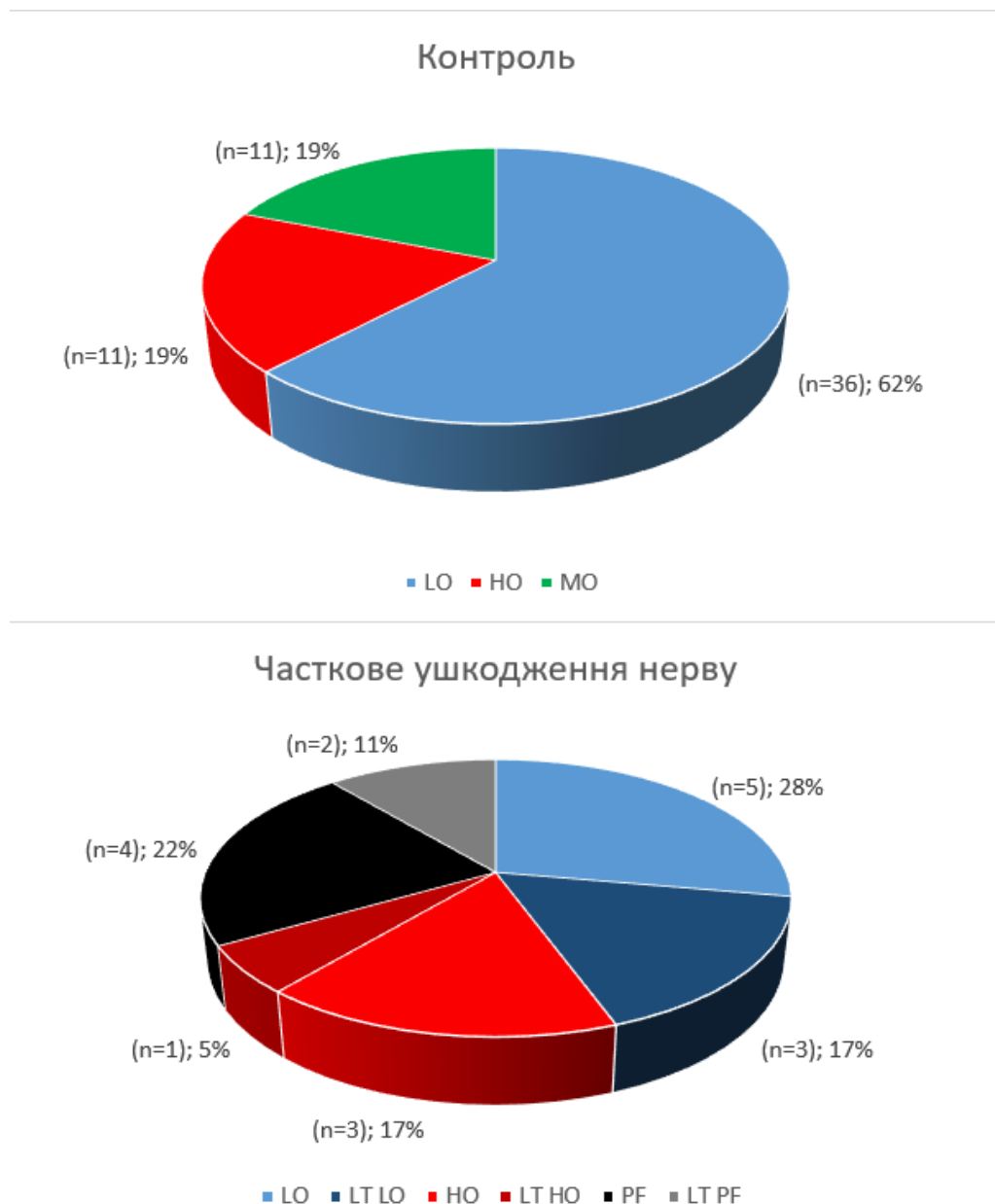


Рис. 3.1.6 Пропорційний розподіл спинно-парабрахіальних нейронів за типом в контролі та при частковому ушкодженні сідничного нерву. Можна побачити зникнення групи MO та появу нових типів відповідей: LT LO; LT HO; PF; LT PF. Важливо зауважити що розподіл між цими групами суттєво відрізняється $p < 0,001$ (точний критерій Фішера).

Додаткову увагу слід звернути на те, що фенотипи нейронів у пластинці I не є одноманітними й можуть відрізнятися залежно від виду тварини [48] та її віку [67]. Проте узагальнено можна сказати, що після часткового пошкодження

відбуваються якісні перебудови в розподілі LO, MO і NO (Рис. 3.1.6), а також поява нових електрофізіологічних типів активності нейронів.

Встановивши повну втрату MO у щурів з SNI, можна припустити, що це свідчить про особливу вразливість саме проміжного типу нейронів, які за нормальних обставин помірно реагують на стимули. Їхнє зникнення або перехід до іншого типу генерації може призвести до того, що на рівні мережі зникає один зі шарів контролю над модуляцією больової інформації.

Поява PF-нейронів, які не реєструвалися у здорових тварин, може означати, що частина нейронів зазнає фундаментальної перебудови, коли внутрішньоклітинні механізми та синаптичні впливи радикально перевизначають їхню електрофізіологічну поведінку, даючи змогу їм генерувати тривалу послідовність потенціалів дії у відповідь на поодинокий стимул. Один з можливих варіантів пояснення полягає в тім, що у цих нейронів, імовірно, змінюється склад іонних каналів, зокрема калієвих, які відповідають за реполяризацію, або кальцієвих, що забезпечують підтримку тривалої деполяризації в присутності збуджувальних медіаторів. Також варто пам'ятати про посилену глутаматергічну передачу, яка може включати як збільшення вивільнення самого глутамату, так і зміни у функціонуванні його рецепторів (AMPA, NMDA) та транспортерів, що мають вивільняти цей медіатор з синаптичної щілини. Усе це разом створює підґрунтя для пролонгованої відповіді нейрона, коли за нормальних обставин збудження мало б згаснути після припинення стимулу.

Отже, можна зробити узагальнення, що після часткового ушкодження сідничного нерва в щурів відбувається суттєва перебудова відповідей спинно-парабрахіальних нейронів, спрямована в бік підвищеної збудливості та розширення діапазону стимулів, які здатні викликати їхню активацію. Додаються також нові форми активності, які не спостерігалися у здорових тварин. Така перебудова відображається на поведінковому рівні формуванням алодинії, гіпералгезії й перманентного болю. Відсутність змін у базових електрофізіологічних параметрах (мембранний потенціал спокою та мембранний

опір) говорить про те, що саме синаптична та внутрішньоклітинна пластичність мають центральне значення для генезу цих розладів. Подальші дослідження націлені на те, щоб ще краще зрозуміти та деталізувати механізми, які лежать в основі такої патологічної перебудови. Перш за все, це стосується уточнення ролі конкретних підтипів іонних каналів, рецепторів та гліальних медіаторів, а також їхньої взаємодії. Сподіваємося, що нові відомості зможуть суттєво наблизити нас до створення ефективних методів контролю даних процесів та, відповідно, до поліпшення лікування хронічного нейропатичного болю в клініці, де нині цей біль досить складно контролюється існуючими терапевтичними засобами. Саме тому так важливо досліджувати цільові механізми на рівні спинного мозку, зокрема, увагу варто приділити спинним проекційним нейронам пластинки I як критичній ланці передачі ноцицептивних сигналів. Отримані нами дані роблять черговий внесок у цей напрям, розширюючи розуміння того, як ушкодження периферичних нервів ініціює каскад клітинних змін у нервовій системі, які зрештою призводять до формування нейропатичного болю.

3.2 Різні популяції нейронів в X пластинці спинного мозку

Нейрони спинного мозку, зокрема ті, що знаходяться в медіальних пластинках дорзального рогу, відзначаються значною гетерогенністю, яка тісно пов'язана з їхніми функціями у складній структурі спинного мозку. Це різноманіття є ключовим фактором у тому, як різні популяції нейронів інтегруються у високоорганізовані нейронні мережі, забезпечуючи належну обробку сенсорної та моторної інформації. Тому однією з важливих задач у вивченні нейронів є їх ідентифікація, оскільки різні класи нейронів виконують різні функції, зокрема в регуляції ноцицептивної інформації і контролі вісцеральної чутливості.

Існує кілька підходів до класифікації нейронів, які базуються на морфологічних ознаках, нейрохімічному фенотипі та електрофізіологічних властивостях. Однак нейрони X пластинки, що оточує центральний канал,

залишаються погано дослідженими через їх глибоке розташування та функціональну неоднорідність. Вони відіграють важливу роль у передачі вісцеральних і больових сигналів, але через ускладнений доступ для реєстрації активності, їх функціональна роль залишається не до кінця зрозумілою. Саме тому актуальною є необхідність у більш глибоких дослідженнях та розробці нових методів для вивчення цих нейронів.

Електрофізіологічні властивості нейронів дозволяють диференціювати їх за типами збудливості, а також досліджувати їх функціональну роль. Одним із ключових параметрів, що характеризує нейрони, є їх здатність генерувати потенціали дії при зміні величини мембранного потенціалу (від -70 мВ у стані спокою до порогового значення ≈ -50 мВ). У даній роботі для класифікації нейронів глибинних пластин спинного мозку використовується метод інжекції струму. Цей підхід дозволяє оцінити, як різні нейрони генерують потенціали дії у відповідь на експериментально контрольовану зміну мембранного потенціалу. Нейрони стимулювалися в режимі фіксації струму за допомогою імпульсів струму тривалістю $0,5-1$ секунди із початковою амплітудою -20 пА та кроком наростання 10 пА. Стимуляція повторювалася через рівні проміжки часу для забезпечення однорідності умов.

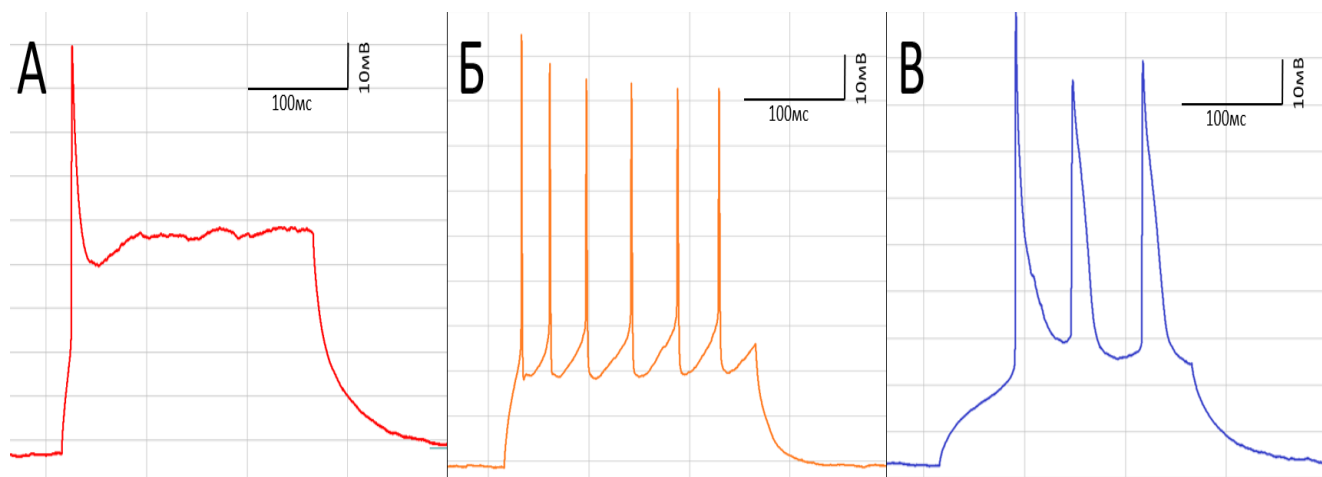


Рис. 3.2.1 Типи генерації потенціалів дії нейронами X пластинки у відповідь на інжекцію струму: А. Односпайковий тип; Б. Тонічний тип; В. відтермінований тип.

Проведені експерименти дозволили класифікувати нейрони X пластинки на три основні типи (Рис. 3.2.1): односпайкові, тонічні та відтерміновані. Тонічні нейрони характеризувалися генерацією потенціалів дії протягом усієї тривалості стимулу (Рис. 3.2.1 Б). Цей тип нейронів переважно асоціюється з гальмівною функцією [68], яка може бути важливою для регуляції надмірної активності та забезпечення стабільності у нейронних мережах. Односпайкові нейрони генерували одиничний потенціал дії на початку стимуляції (Рис. 3.2.1 А), що вказує на їхню ймовірну роль у швидкому передачі сигналів, які потребують миттєвого реагування. Відтерміновані нейрони демонстрували потенціали дії з певною затримкою відносно початку стимулу (Рис. 3.2.1 В). Час затримки зменшувався зі збільшенням амплітуди стимуляції, що може свідчити про залученість цього типу нейронів не лише в передачу, а і в обробку сенсорного сигналу [69].

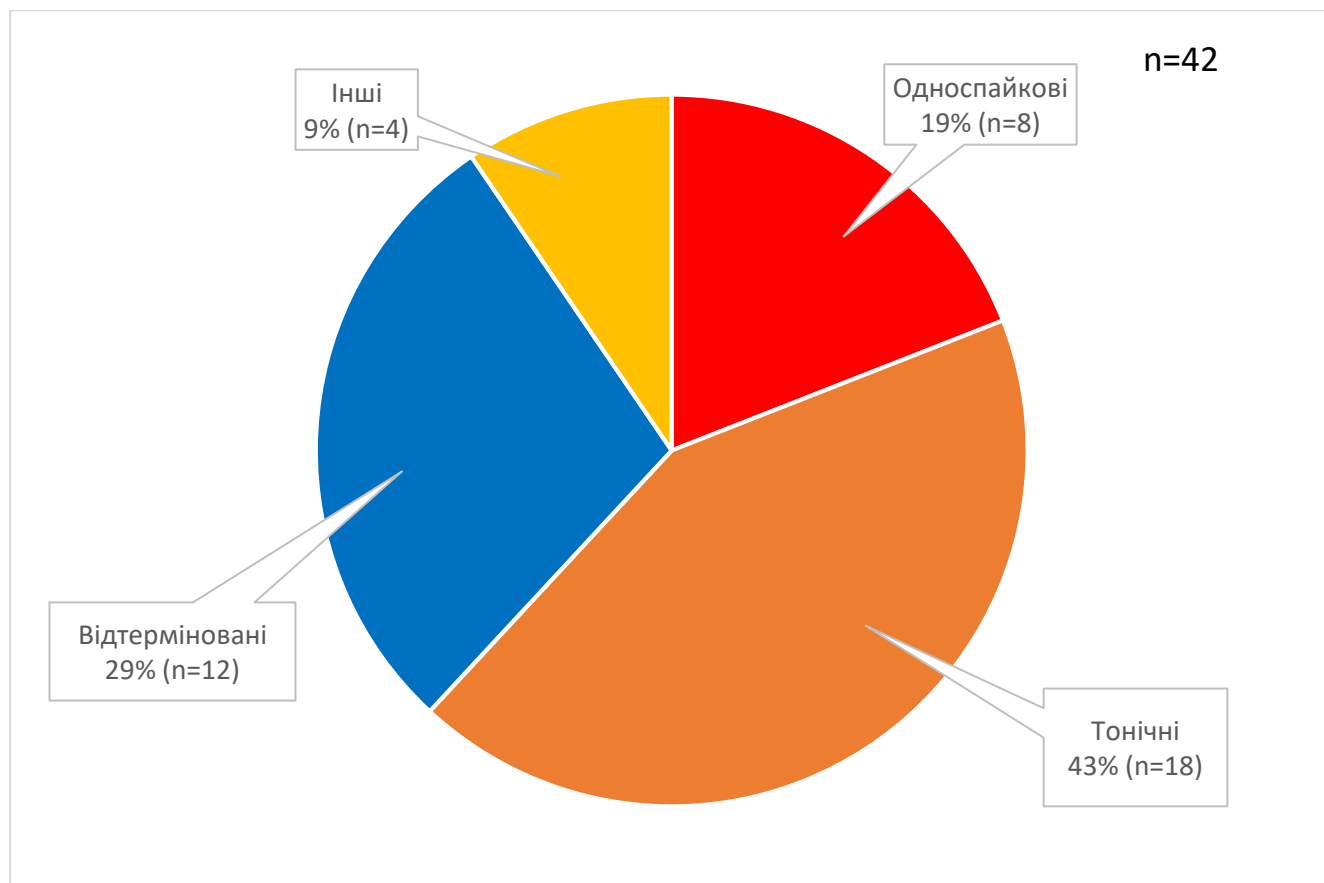


Рис. 3.2.2 Пропорційний розподіл нейронів пластинки X за типами генерації потенціалів дії. (n=42)

Попри те, що тонічні нейрони становлять 43% (Рис. 3.2.2) від загальної кількості, вони роблять найвагомійший внесок у мережеву активність пластинки X, оскільки генерують більшу кількість потенціалів дії. За літературними даними [68] тонічні нейрони часто мають гальмівний характер, тому їхня висока частка та здатність до тривалого розряду вказує на їхню потенційну роль як стабілізуючого елемента в локальній мережі завдяки формуванню гальмівного тону.

Натомість односпайкові (19%) й відтерміновані (29%) нейрони, які в сумі складають 48% популяції, переважно вважаються збуджувальними [70,71]. Односпайкові нейрони характеризуються швидкою генерацією одиничного потенціалу дії на початку стимуляції, що може свідчити про їхню участь у передачі інформації, коли важливим є швидке реагування на початковий сигнал. Водночас відтерміновані нейрони можуть бути відповідальні за більш складну

інтеграцію сенсорних стимулів. Їхня затримка, яка скорочується зі збільшенням сили стимулу, свідчить про здатність цих клітин адаптуватися до змін інтенсивності подразника та виконувати функцію "фільтра", відсіюючи слабкі короткотривалі сигнали й реагуючи на більші і триваліші імпульси. Важливо зазначити, що при зменшенні часу затримки, яке відбувається при збільшенні амплітуди стимуляції, такі нейрони встигають згенерувати більше потенціалів дії при однаковій тривалості імпульсу, чим, ймовірно, збільшують внесок в активність мережі в залежності від інтенсивності стимулу. Таким чином, ці типи нейронів забезпечують збалансовану взаємодію між швидкою передачею імпульсів і їх контекстуальною (залежною від специфіки вхідного сигналу та інших факторів) обробкою в межах нейронних мереж спинного мозку.

Таким чином, поширеність тонічних нейронів із тривалим патерном ПД розрядів указує на вагомість гальмівного контролю в цій ділянці спинного мозку. Тоді як наявність односпайкових і відтермінованих клітин підкреслює участь в регуляції збуджувальної активності в Х пластинці. Можна також припустити, що саме тут формуються рефлекторні відповіді на больові або вісцеральні подразники, оскільки деякі нейрони пластинки Х утворюють проекції, які, безпосередньо або через інтернейрони, контактують з мотонейронами вентрального рогу спинного мозку. Детальніший аналіз спонтанної та мініатюрної активності різних типів нейронів, а також їхніх синаптичних зв'язків, може розкрити нові аспекти функціональної взаємодії у мережах спинного мозку.

3.3 Роль TRPV1 рецепторів у синаптичній активності нейронів пластинки Х спинного мозку щурів

Капсаїцин, який є агоністом ванілоїдних-рецепторів, є одним із інструментів для дослідження механізмів больової сигналізації, оскільки він здатен вибірково активувати термочутливі ноцицептивні нейрони та створювати вхід іонів кальцію та натрію у внутрішньоклітинний простір через TRPV1-канал. У периферичній нервовій системі експресія цих каналів відбувається в тонких

немієлінізованих пептидергічних аферентних волокнах (С-волокнах), які спеціалізуються на передачі больових і температурних сигналів. Активація TRPV1 на периферійному рівні призводить до деполяризації мембрани первинних сенсорних нейронів, що лежить в основі відчуття больової термочутливості. Проте результати недавніх досліджень вказують, що TRPV1-канали не обмежуються виключно периферією і можуть бути широко представлені в центральній нервовій системі, включаючи різні пластинки спинного мозку та окремих зонах головного мозку.

Перші докази центральної ролі TRPV1 у передачі больової інформації стосувалися його експресії й участі в регуляції синаптичних процесів у пластинках I та II (так звана *substantia gelatinosa*) спинного мозку, де обробляються переважно ноцицептивні сигнали від первинних тканин – шкіри, м'язів та суглобів. Наявні на сьогодні дані свідчать, що активація TRPV1 у цих зонах спричинює посилене вивільнення збуджуючих медіаторів (насамперед глутамату), що своєю чергою може ініціювати процеси центральної сенсibilізації, нерідко пов'язані з розвитком хронічних больових синдромів. Вважається, що підвищена активність TRPV1 за певних патологічних або травматичних станів спинного мозку може сприяти гіперзбудженню нейронів, таким чином створюючи передумови для формування нейропатичного компонента болю. Незважаючи на істотний прогрес у з'ясуванні ролі TRPV1 у пластинках I–II, пластинка X, що є ділянкою навколо центрального каналу спинного мозку, досі була мало досліджена у контексті участі цих каналів у больовій модуляції. Це особливо цікаво, оскільки пластинка X інтегрує не лише соматичні сигнали, а й вісцеральну інформацію, тобто може бути важливою вузлом, де перетинаються шляхи різних сенсорних модальностей.

Особливе значення пластинка X має у регуляції складних нейронних мереж, що залучені до обробки та модуляції вісцеральних відчуттів. У зв'язку з цим, дослідження ролі TRPV1 у даній зоні постає вельми актуальним з огляду на

необхідність розуміння, яким чином центральні механізми можуть впливати на обробку вісцеральних больових імпульсів.

Попередні результати, отримані нашими колегами [45], показали існування терміналей первинних ноцицепторів які закінчуються в зоні пластинки X. Також продемонстровано, що нейрони цієї пластинки отримують прямий (безпосередній моносинаптичний контакт із первинними аферентами), так і непрямий (через інтернейрони та полісинаптичні шляхи) вхідний сигнал від різних типів аферентів, що беруть участь у больовій передачі. Крім того, існують низхідні проекції, які можуть моделювати роботу нейронів пластинки X і, ймовірно, також впливати на TRPV1-залежну модуляцію в цій зоні. Усе це формує гіпотезу, згідно з якою активація TRPV1 потенційно здатна змінювати збудливість нейронної мережі в X пластинці за допомогою зміни синаптичних характеристик, передусім частоти та амплітуди збуджуючих постсинаптичних струмів. Однак, бракувало чіткого експериментального підходу, котрий би демонстрував, що саме синаптична передача є точкою дії TRPV1-ігоністів і що зміни в цій зоні можуть призвести до модифікації мережевої активності в пластинці X, як важливої структури для інтеграції больових сигналів. Тому гіпотеза про те, що активація TRPV1 впливає на збуджувальну синаптичну передачу у нейронах пластинки X потребувала прямого експериментального підтвердження.

Отже наше дослідження, спрямоване на вивчення впливу активації TRPV1-рецепторів на рівні мініатюрних збуджуючих постсинаптичних подій у нейронах пластинки X спинного мозку. Завдяки застосуванню методів електрофізіологічної реєстрації в *ex vivo* препараті спинного мозку щура вдалося визначити потенційний постсинаптичний внесок, опосередкований відкриттям TRPV1-каналів у пресинаптичній мембрані нейронів, що спричиняє вхід катіонів кальцію (Ca^{2+}) та натрію (Na^{+}). Таким чином, дослідження було сфокусоване на питаннях: 1) якою мірою та за яких умов TRPV1-рецептори здатні модулювати мініатюрну синаптичну активність у пластинці X; 2) наскільки ці зміни можуть сприяти центральній сенсibiliзації; 3) чи існує підгрупа нейронів, здатних до прямої

капсаїцин-індукованої відповіді. Такий підхід відкриває можливості глибшого розуміння механізмів, що визначають центральну обробку вісцеральних больових імпульсів, і водночас створює підґрунтя для розробки нових фармакологічних стратегій, спрямованих на тонку модуляцію TRPV1-рецепторів на рівні спинного мозку.

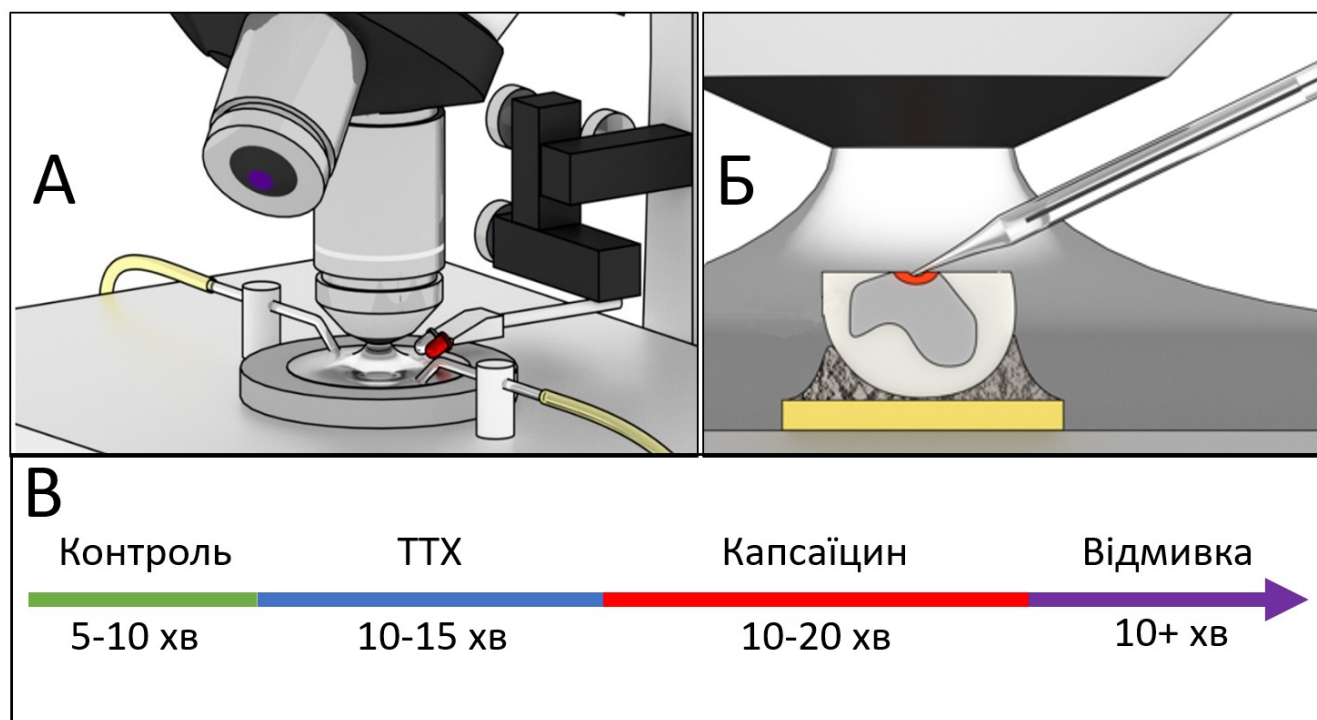


Рис. 3.3.1 Схема експерименту з вивчення впливу агоніста TRPV1 на активність нейронів пластинки X; Схема експериментальної установки з системою перфузії досліджуваного, бічним інфрачервоним освітленням і мікроскопом(А). Розташування спинного мозку зафіксованого в експериментальній камері під об'єктивом і зона пластинки X в нейронах якої застосовуються метод локальної фіксації потенціалу(Б). Часовий протокол реєстрації з додаванням хімічних агентів(В).

Зважаючи на вищезазначене, ми докладно проаналізували, яким чином капсаїцин, будучи агоністом TRPV1, впливає на мініатюрні збуджуючі постсинаптичні струми (miniature evoked postsynaptic currents (mEPSC)) у нейронах пластинки X спинного мозку щура. У нашому дослідженні використовувався цілісний *ex vivo* препарат (Рис. 3.3.1 А і Б), описаний в методах,

завдяки чому вдавалося зберігати ключові синаптичні мережеві взаємодії. Такий підхід є важливим для того, щоб отримані результати максимально точно відображали фізіологічний стан мережі без зайвих артефактів, зумовлених надмірними пошкодженнями структур спинного мозку при застосуванні альтернативних методів досліджень. Запис здійснювали у конфігурації «ціла клітина» методу петч-клемп, підтримуючи базовий потенціал на рівні -70 мВ, що дозволяє реєструвати постсинаптичні струми збудження (Рис. 3.3.3 А). Реєстрація відбувалась протягом не менше 10 хвилин, аби зафіксувати базові показники частоти та амплітуди постсинаптичних подій. Для унеможливлення внеску потенціалів дії від збудження аферентів чи місцевих інтернейронів після контрольних записів до розчину перфузії додавали тетродотоксин (ТТХ) у концентрації 500 нМ, блокуючи тим самим натрієві потенціалзалежні канали. Це дає змогу фіксувати власне «мініатюрний» рівень синаптичних подій, який формується завдяки спонтанному вивільненню невеликих порцій медіатора із пресинаптичних терміналей. Реєстрацію на фоні ефекту тетродотоксину записували протягом не менш ніж 10 хвилин, для визначення параметрів частоти і амплітуди мініатюрних викликаних постсинаптичних струмів. Потім до розчину в системі перфузії додавали капсаїцин із фінальною зовнішньою концентрацією 1 мкМ і реєстрували вплив також щонайменше 10 хв. Саме такий протокол запису (Рис. 3.3.1 В) найбільш придатний для оцінки безпосереднього ефекту активації TRPV1 у синапсах, оскільки він є компромісом між часом достатнім для повноцінної дії агентів та часом після якого збільшується ризик зриву клітини.

Фінальне відмивання від капсаїцину розчином Кребса, що містив тетродотоксин (ТТХ), не спричиняло значущих змін у параметрах мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (mEPSCs). Це вказує на те, що ефекти капсаїцину виявилися досить стійкими до процесу відмивання, зберігаючи свій вплив навіть після видалення агента з перфузійного розчину. Така стійкість може бути зумовлена тривалими внутрішньоклітинними процесами, що активуються після стимуляції TRPV1-рецепторів. У зв'язку з цим динаміка параметрів mEPSCs

під час відмивки не розглядалася як окремий етап аналізу, оскільки акцент дослідження був спрямований на безпосередній вплив активації TRPV1.

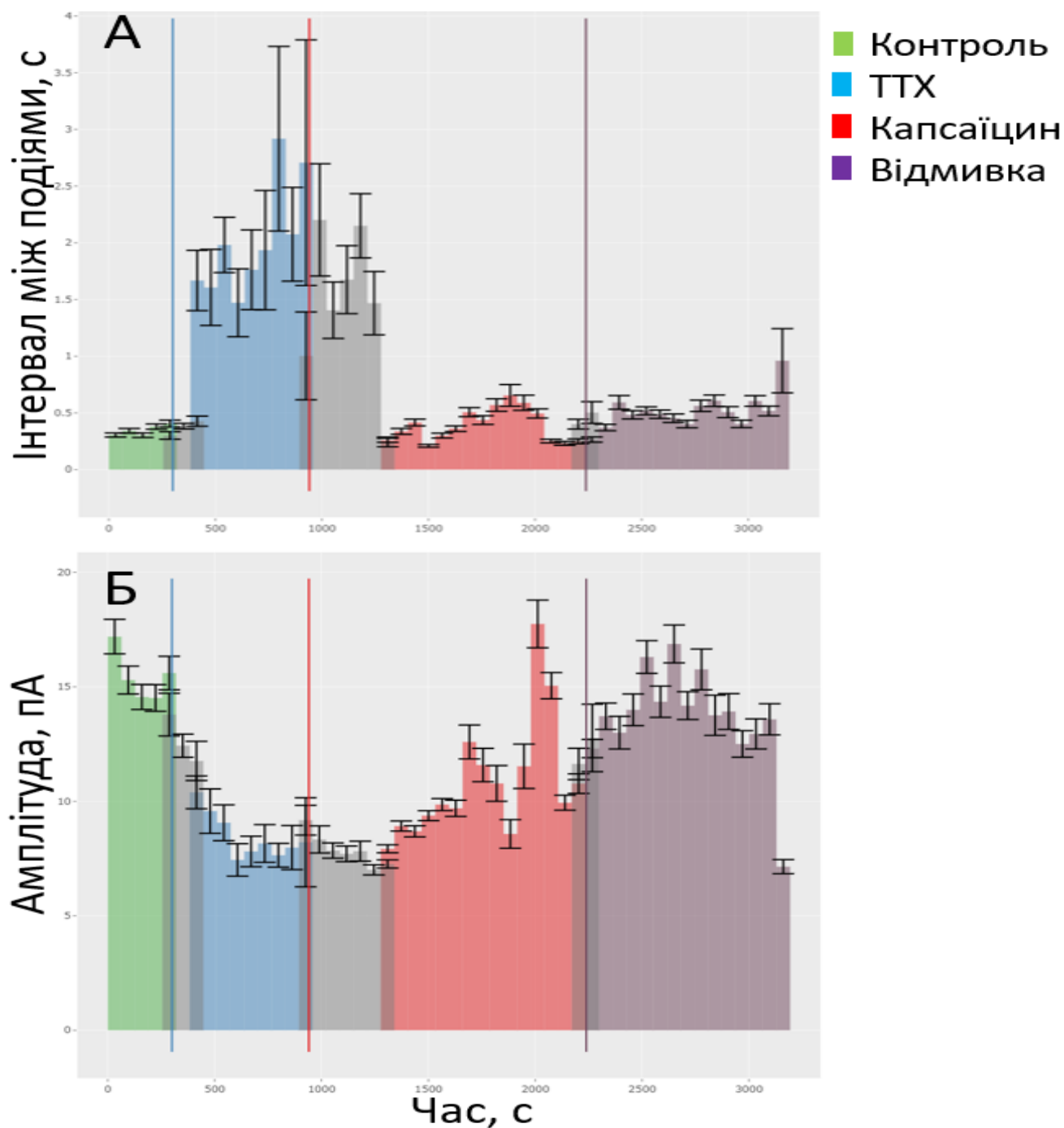


Рис. 3.3.2 Графік зміни інтервалу між подіями і амплітуди як функція часу для окремо взятої клітини пластинки X в контролі(зелений), тетродотоксині (синій), при прикладанні капсаїцину(червоний) та відмивці (фіолетовий). (Ширина стовпчика відповідає одній хвилині реєстрації)

Після додавання тетродотоксину (ТТХ), блокатора потенціалзалежних натрієвих каналів, у розчин для перфузії спостерігалось істотне зниження частоти та амплітуди збуджуючих постсинаптичних подій (EPSCs) (Рис. 3.3.2) у нейронах пластинки X ($n=32$). Цей ефект був очікуваним, оскільки ТТХ ефективно блокує генерацію та поширення потенціалів дії в аферентних та локальних нейронних мережах, що є ключовим механізмом активації синапсів у нормальних фізіологічних умовах. Унаслідок цього активність, яка залишалася після додавання ТТХ, відображала виключно спонтанне вивільнення нейромедіаторів із пресинаптичних терміналей, яке відбувається незалежно від генерації потенціалів дії. Реєстровані за таких умов події отримали назву мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (mEPSCs) (Рис. 3.3.3 Б). Ці події є результатом випадкового вивільнення окремих везикул із нейромедіатором, що обумовлює їхню відносно низьку частоту та сталість амплітуди. Така модель забезпечує можливість ізолювати виключно синаптичні процеси й уникнути впливу інтегральної активності мережі або взаємодії між клітинами через потенціали дії.

Спостережуване пригнічення активності після аплікації ТТХ також відзначало важливість спонтанної генерації потенціалів дії у підтриманні базового рівня збуджувальної передачі в нейронах пластинки X. У контрольних умовах ці потенціали дії підтримують високу динаміку синаптичної взаємодії між клітинами. Проте блокування цього механізму дозволило зафіксувати залишкову активність, яка, хоч і значно знижена, усе ще містить в собі інформацію про вивільнення нейромедіаторів.

Таким чином, додавання ТТХ дозволило зосередитися на мініатюрній синаптичній активності, ізолювавши вплив безпосередньо локальних змін на терміналях. Це забезпечило виокремлений аналіз дії агоністів TRPV1-рецепторів на пресинаптичні процеси вивільнення медіаторів і постсинаптичну відповідь нейронів пластинки X, даючи можливості для дослідження механізмів модуляції ноцицептивної передачі.

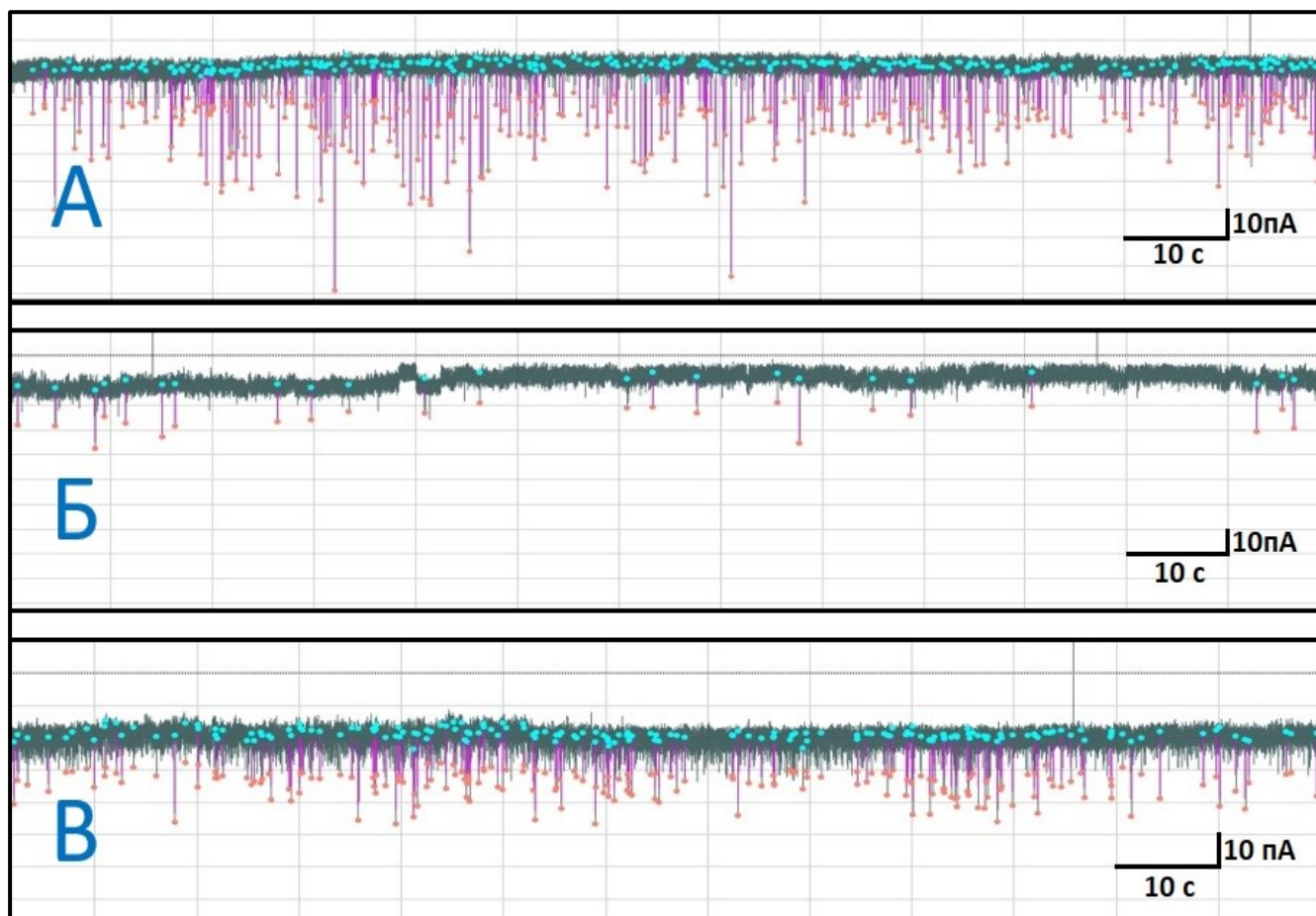


Рис. 3.3.3 Електрофізіологічні записи на яких задетектовані постсинаптичні події (фіолетовим) в контролі (А), при додаванні тетродотоксині (Б) і після дії капсаїцину (В).

Зміна частоти мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів

Додавання капсаїцину до розчину для перфузії викликало значні зміни у синаптичній активності нейронів (Рис. 3.3.3 В) пластинки Х спинного мозку. У всіх досліджених клітинах ($n=32$) спостерігалось підвищення частоти (Рис. 3.3.2) мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (mEPSCs), що свідчить про посилення вивільнення збуджувального медіатора, ймовірно, глутамату, з пресинаптичних терміналей. Середній інтервал між подіями зменшився з 1617 ± 546 мс у контрольних умовах до 455 ± 234 мс після аплікації капсаїцину (Рис. 3.3.4), що вказує на кратне збільшення частоти синаптичних подій.

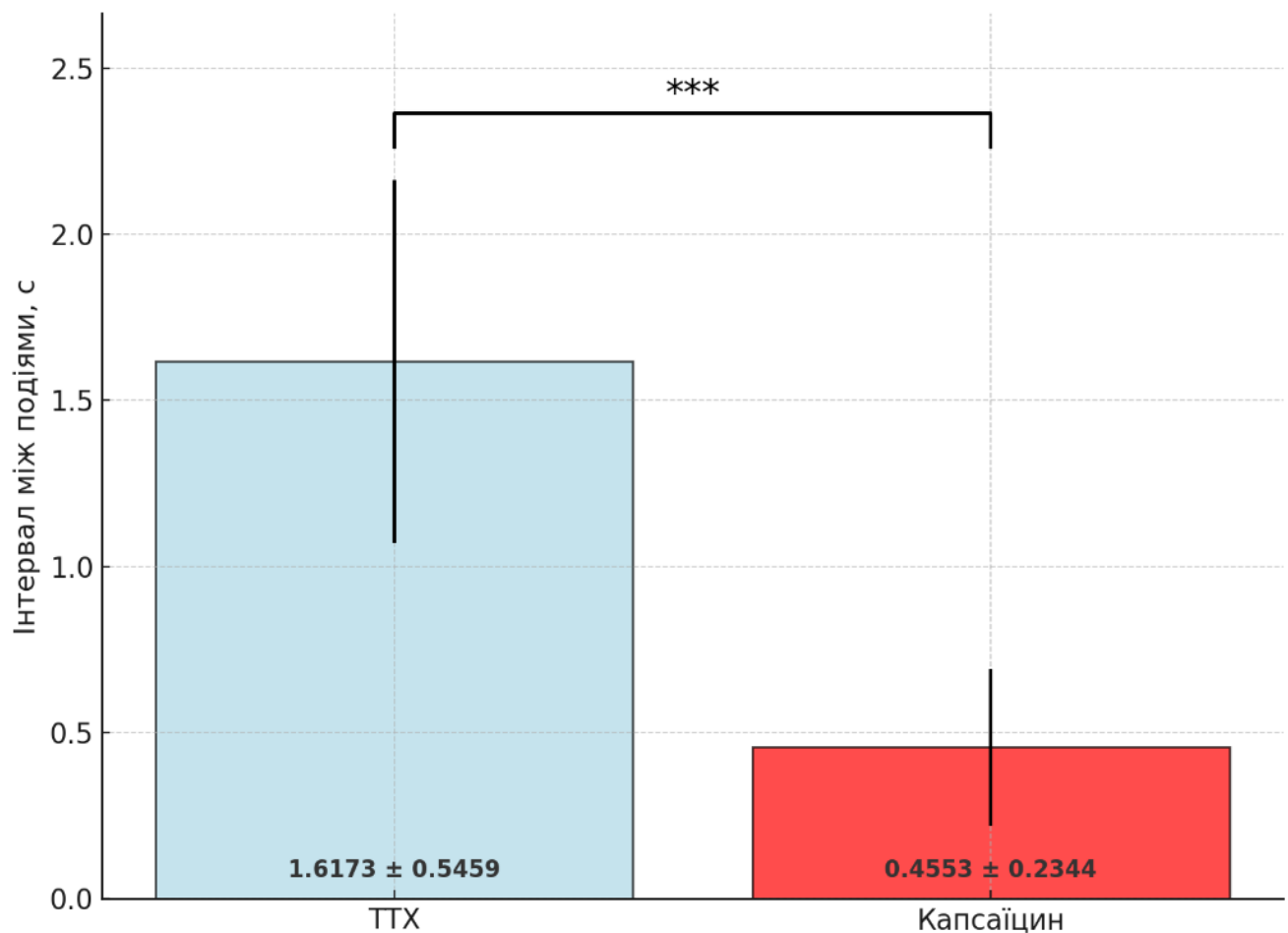
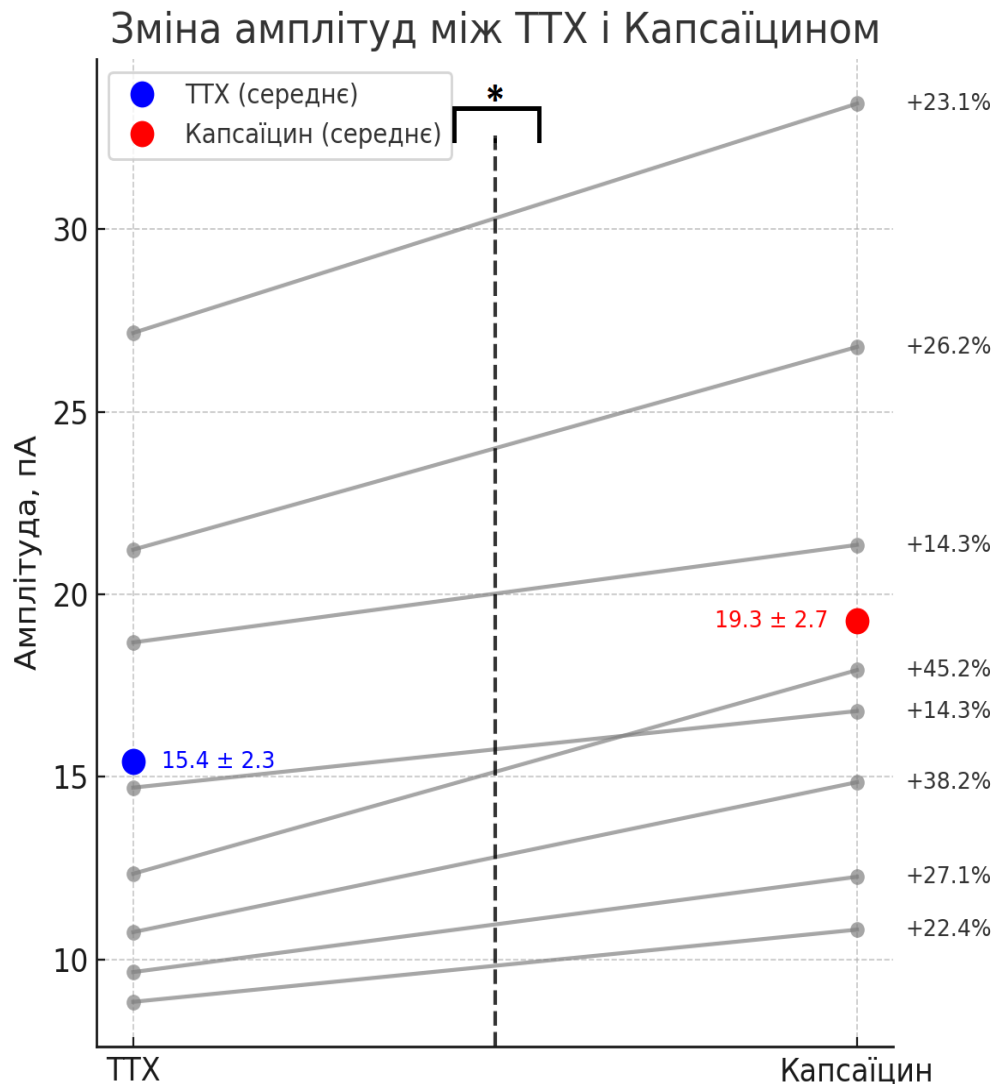


Рис. 3.3.4 Діаграма, що відображає зміну середнього інтервалу між подіями під дією капсаїцину ($n=32$).

Подібний ефект може бути пояснений активацією TRPV1-рецепторів на терміналях ноцицептивних волокон, оскільки саме відкриття цього типу іонних каналів зумовлює вхід іонів кальцію і збільшення ймовірності екзоцитозу везикул із нейромедіатором. Такий феномен трактують як пресинаптичний механізм, що реалізується за рахунок посиленого викиду глутамату або залучення додаткових сайтів вивільнення. Проте слід враховувати й інші можливі ланки взаємодії: зокрема, капсаїцин міг активувати розташовані поблизу інтернейрони чи мікрогліальні клітини [72], які, у свою чергу, здатні вивільняти глутамат чи інші модулятори (наприклад, цитокіни або ендоканабіноїди), що також впливають на синаптичну передачу. Втім, проведені експерименти переважно зосереджувалися на питанні: чи дійсно стимуляція TRPV1 призводить до зростання частоти mEPSC. Результати чітко засвідчили, що такий вплив капсаїцину є надійним і

повторюваним у різних клітинах пластинки Х, підтверджуючи вагому роль цих каналів у модуляції збуджувальної передачі.

Група клітин зі збільшенням амплітуди мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів у відповідь на капсаїцин.



*Рис. 3.3.5 Зміни середніх амплітуд групи клітин $n=8$, після прикладання капсаїцину. Позначення * відповідають $p<0.05$ для парного t -тесту між групами ТТХ та капсаїцин.*

У частині нейронів пластинки Х ($n=8/32$) після введення капсаїцину спостерігалось значне підвищення ($25,3\pm5,2\%$) амплітуди мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (Рис. 3.3.5). Це явище було характерним

не для всіх клітин, а лише для окремої групи нейронів ($n=8/32$), що свідчить про їхню функціональну гетерогенність. Зміна амплітуди подій вказує на залучення постсинаптичних механізмів, які могли бути спричинені підвищенням чутливості AMPA-рецепторів у постсинаптичній мембрані до глутамату. Такий ефект може бути зумовлене кількома механізмами: фосфорилуванням рецепторів через кальцій-залежні кінази (наприклад, CaMKII), що підвищує їхню провідність; транспортуванням додаткових AMPA-рецепторів із внутрішньоклітинних резервуарів до мембрани, що збільшує їхню кількість на постсинаптичній поверхні; зміною субодиничного складу, наприклад, зменшенням частки рецепторів із GluA2, що підвищує їхню кальцієву проникність; а також локальними модифікаціями у синаптичній щілині, зокрема збільшенням концентрації глутамату або його тривалості дії через активацію TRPV1-каналів чи вивільнення модулюючих молекул, таких як ендоканабіноїди.

Підвищення амплітуди також може бути пов'язане зі збільшенням кількості нейромедіатора, який вивільняється з везикул у відповідь на активацію TRPV1. Це може свідчити про складну взаємодію між пресинаптичними та постсинаптичними механізмами, коли збільшення кількості вивільненого глутамату забезпечує активацію більшої кількості постсинаптичних рецепторів. Такий ефект підкреслює, що в окремих нейронах пластинки X активація TRPV1 може викликати не лише підвищення частоти синаптичних подій, але й значне посилення їхньої сили, що має важливе значення для механізмів центральної сенсibilізації.

Повільний вхідний струм в нейрона пластинки X викликаний додаванням капсаїцину.

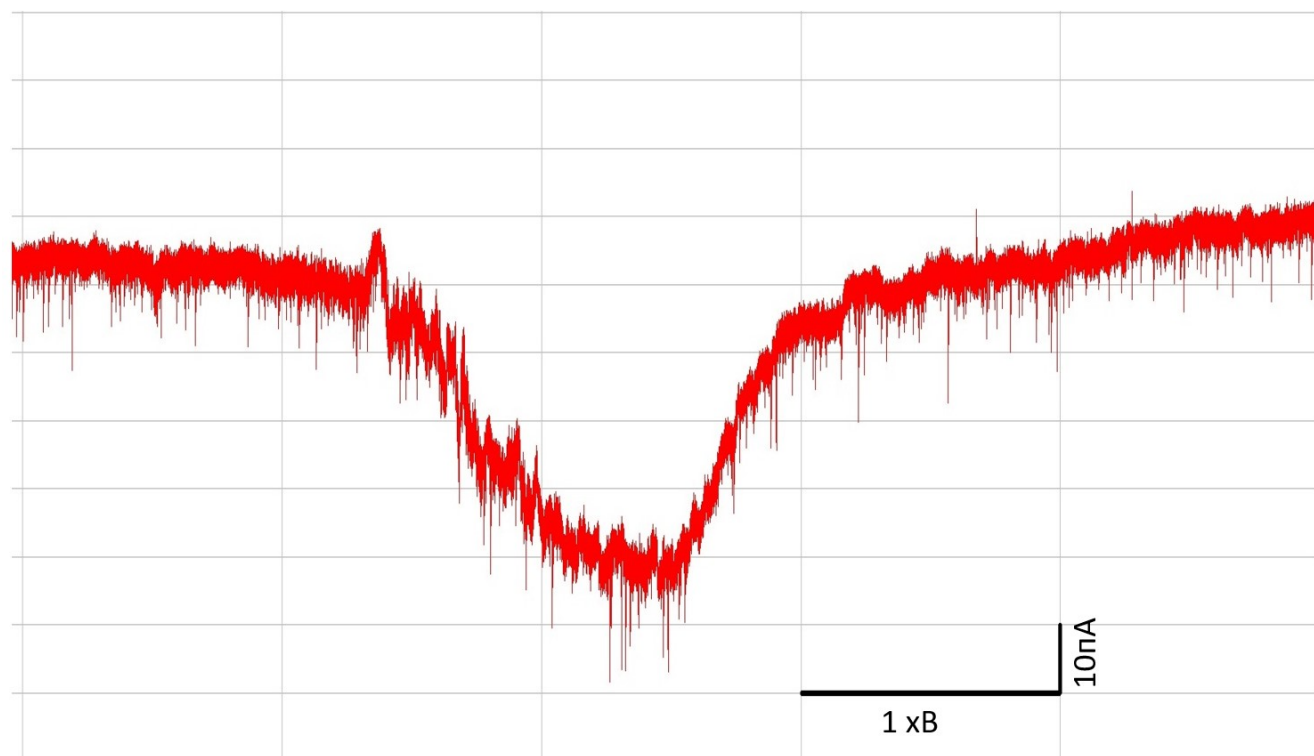


Рис. 3.3.6 Приклад електрофізіологічного запису з нейрону пластинки X, де додавання капсаїцину (1 мкМ) викликало повільний вхідний збуджуючий струм.

У частині нейронів пластинки X після додавання капсаїцину було зафіксовано появу повільного вхідного струму (Рис. 3.3.6), який не був пов'язаний із мініатюрними збуджувальними постсинаптичними подіями (mEPSCs). Такий струм реєструвався у невеликій групі (5/32) досліджених нейронів і мав поступовий розвиток із тривалістю, значно довшою за типові синаптичні події (середня тривалість 69.2 ± 12.8 с, середня амплітуда 43.6 ± 9.4 пА). Його виникнення вказує на можливу активацію TRPV1-рецепторів, розташованих безпосередньо на постсинаптичній мембрані нейронів, що може призводити до входу іонів натрію і кальцію через відкриті канали, створюючи стійкий деполяризуючий вплив.

Поява такого струму може мати важливі функціональні наслідки для нейронів пластинки Х. По-перше, повільний вхідний струм здатен суттєво змінювати мембранний потенціал клітини, підвищуючи її збудливість і готовність до генерації потенціалів дії. По-друге, тривалий вхід кальцію може запускати внутрішньоклітинні каскади, що відповідають за синаптичну пластичність і довготривалі зміни у функціонуванні нейрона. Це може включати посилення експресії рецепторів у постсинаптичній мембрані або модифікацію синаптичних зв'язків, що створює передумови для розвитку центральної сенсibiliзації.

Повільний вхідний струм також може свідчити про участь TRPV1 у механізмах, які виходять за межі швидкої синаптичної передачі. Його поява може бути пов'язана із прямою активацією постсинаптичних TRPV1-каналів або з іншими ефектами, спричиненими вивільненням модулюючих речовин, таких як ендоканабіноїди [73], мікроглією [72] або сусідніми клітинами. Таким чином, дані про повільний вхідний струм доповнюють картину того, як активація TRPV1 може впливати на функціональну організацію нейронів пластинки Х, забезпечуючи як швидкі, так і довготривалі зміни у синаптичній активності.

Дві групи нейронів за відповідями на капсаїцин

Аналіз реакцій нейронів пластинки Х на капсаїцин виявив дві чітко виражені групи клітин, які демонстрували різний ступінь відповіді на цей агоніст TRPV1-рецепторів. Для поділу клітин на групи була виконана кластеризація методом k-середніх, і розраховано силуетний коефіцієнт для зміни частоти, який становить 0,696 (Рис. 3.3.7). Це вказує на достатньо чітке розділення кластерів і підтверджує обґрунтованість обраної методики аналізу. Такий підхід свідчить про існування двох функціонально різних груп клітин, що можуть відрізнятися за механізмами активації або чутливістю до капсаїцину.

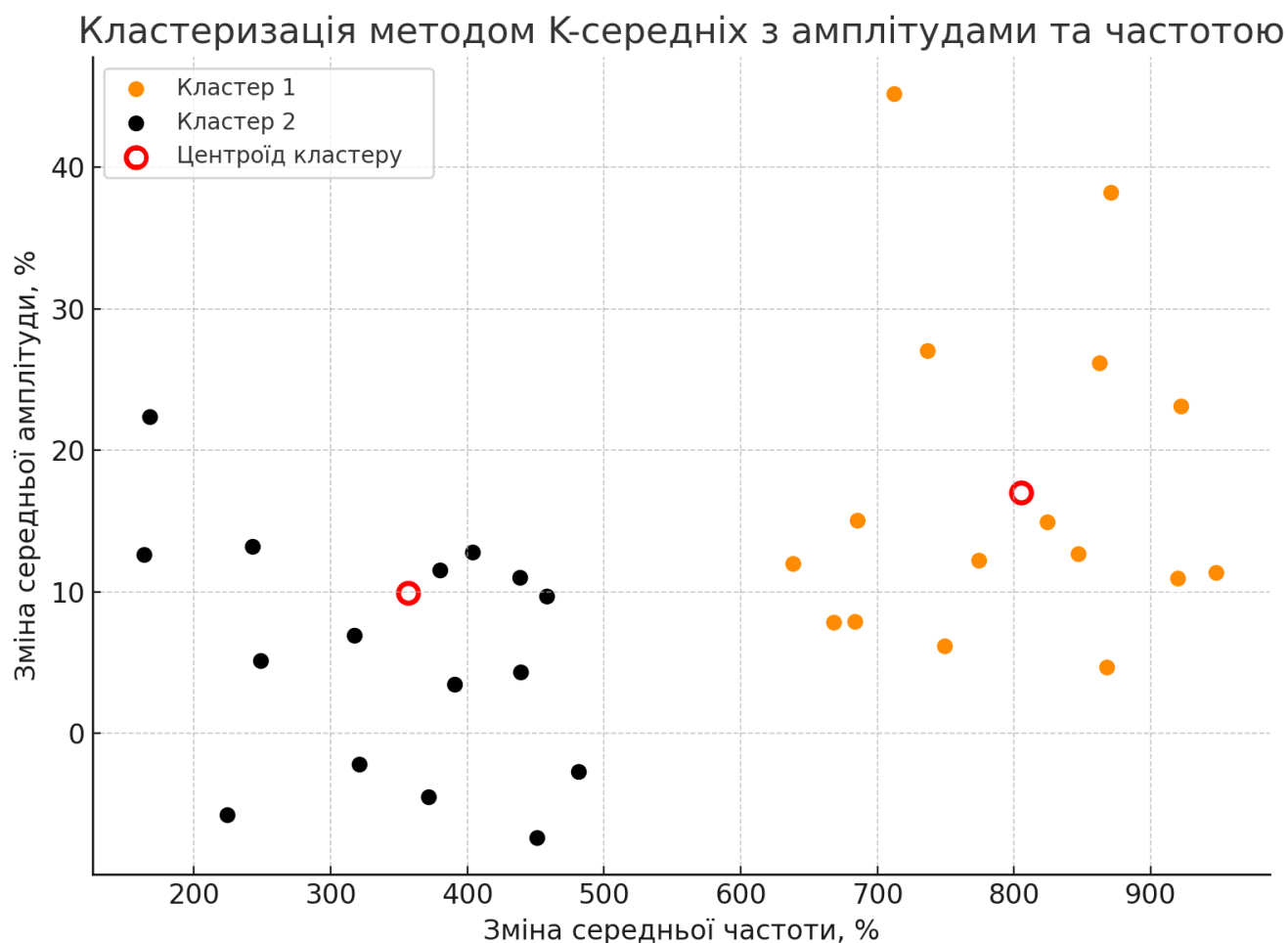


Рис. 3.3.7 Кластеризація методом К-середніх за амплітудою та частотою.

Перша група, яка складала близько половини досліджених нейронів, демонструвала сильну реакцію на капсаїцин із суттєвим підвищенням як частоти, так і амплітуди (Рис. 3.3.8 Б) мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (mEPSCs). Частота подій у цих клітинах збільшувалася в середньому на $675 \pm 447\%$, тоді як амплітуда зростала на $15 \pm 5,6\%$. За однією з гіпотез, цей різкий сплеск активності пов'язаний із високою густиною TRPV1-рецепторів на пресинаптичних терміналах, що приводить до посиленого входу іонів кальцію та, відповідно, збільшення вірогідності вивільнення глутамату. Також не можна виключати, що в цих нейронах постсинаптичний компонент робить більший внесок в активність: наявність TRPV1-каналів безпосередньо на їхній мембрані може запускати додаткові каскади внутрішньоклітинних процесів, які підвищують ефективність збуджуючих сигналів.

Друга група нейронів, продемонструвала помірну реакцію на капсаїцин. У цих клітинах частота mEPSCs збільшувалася на $84 \pm 62\%$, тоді як амплітуда зростала лише на $8,2 \pm 2,9\%$ (Рис. 3.3.8 А). Такий патерн відповідав менш вираженому підвищенню синаптичної активності порівняно з нейронами першої групи. Пояснити такі відмінності можна декількома причинами. По-перше, у цих клітинах може бути нижча експресія TRPV1-рецепторів або вони можуть розподілятися не так щільно в синаптичних терміналах, тож навіть за посиленого кальцієвого струму результатом буде відносно невелике збільшення кількості вивільненого глутамату. По-друге, ці нейрони можуть отримувати частину глутаматергічних сигналів від інших типів аферентів, зокрема А δ -волокон, які експресують TRPV1 у значно меншій мірі або не експресують його взагалі, а також від низькопорогових механорецепторів, котрі не чутливі до капсаїцину. По-третє, можна припустити, що в цих нейронах активніше функціонують механізми внутрішньоклітинної регуляції, наприклад, залучення вторинних месенджерів, які можуть впливати на чутливість пресинаптичних терміналів. Крім того, роль може відігравати й ендоканабіноїдна система, яка за певних умов може забезпечувати зворотний гальмівний контроль, обмежуючи надмірне вивільнення нейромедіатора.

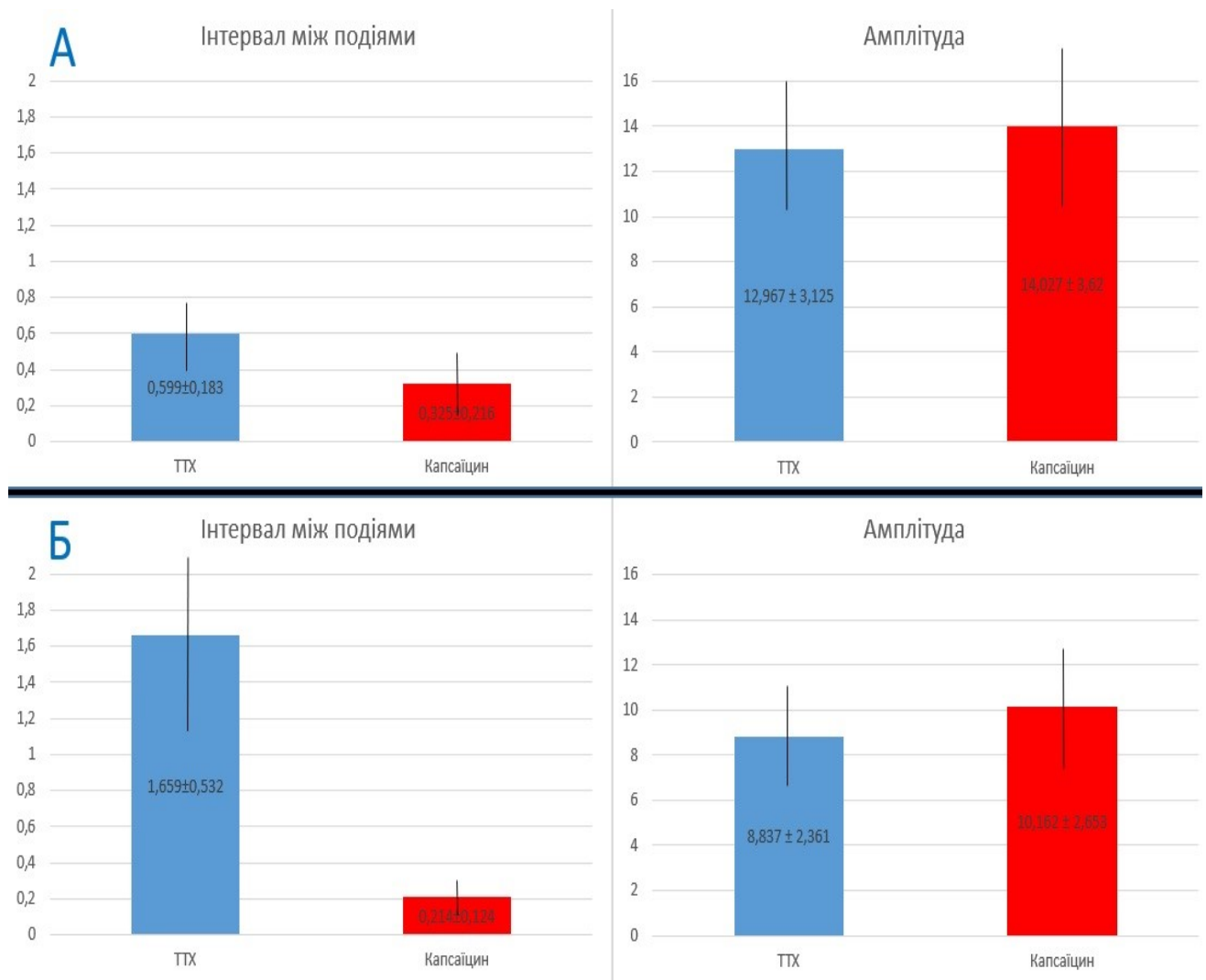


Рис. 3.3.8 Діаграми середніх медіанних інтервалів між подіями та амплітуд в ТТХ та капсаїцині для клітин з помірною(А) і сильною (Б) зміною мініатюрних пресинаптичних струмів у відповідь на капсаїцин($n=16$ для кожної групи).

Функціональна гетерогенність, що виявляється через таку бінарну чутливість до капсаїцину, робить пластинку Х ще цікавішою з точки зору її ролі у формуванні й регуляції больових сигналів. Нейрони, які виявляли сильну реакцію, ймовірно, є центрами больової модуляції, здатними швидко й інтенсивно відповідати на ноцицептивні стимули. Така висока чутливість може бути критичною для процесів центральної сенсibiliзації, коли навіть відносно слабкий подразник спричинює перебільшену реакцію та суб'єктивне відчуття сильного болю. Для цих клітин часто реєструвалися й інші розширені ефекти капсаїцину, зокрема поява повільного входного струму, що додатково підсилює їхню

деполяризацію, або виражене підвищення амплітуди mEPSCs. Це може вказувати на те, що ці клітини мають не лише більш щільну експресію TRPV1-рецепторів, а й особливості внутрішньоклітинних механізмів, які посилюють їхню відповідь на активацію цих каналів.

Нейрони ж, що реагували помірно, можуть виконувати скоріше регуляторну чи допоміжну функцію у формуванні мережевої активності в пластинці X. Очевидно, що вони теж зазнають впливу капсаїцину: у них частота mEPSCs помітно зростає, однак подібних різючих змін у амплітуді чи появи повільного вхідного струму здебільшого не відзначено. Можливо, такі клітини розраховані на підтримання базового рівня збудливості і виконують регуляторну або підтримувальну функцію, що допомагає збалансувати загальну збудливість локальної мережі пластинки X.

Ці спостереження відкривають широке поле для дискусій про те, як саме пластинка X координує вісцеральну та соматичну ноцицепцію, і які групи нейронів відграють провідну роль у формуванні різних аспектів больового синдрому. Можливо, комбінація клітин з “сильними” і “помірними” реакціями на активацію TRPV1-рецепторів створює гнучкий механізм, завдяки якому пластинка X здатна швидко відповісти на екстремальні подразники, але водночас запобігати надмірному і масивному збудженню системи у разі слабших або контрольованих стимулів. Вивчення взаємодії між цими двома популяціями та їхньої регуляції з боку низхідних шляхів або локальних інтернейронів може допомогти глибше зрозуміти, як саме спинний мозок формує інтегровану відповідь на больовий сигнал і які ланки цього процесу можуть стати потенційними мішенями для фармакологічного втручання.

Двофазна динаміка дії капсаїцину

Дослідження впливу капсаїцину на нейрони пластинки X спинного мозку продемонструвало двофазний характер його дії на мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми (Рис. 3.3.9), що вказує на багаторівневу регуляцію

синаптичної передачі, опосередковану TRPV1-рецепторами. Така динаміка підкреслює взаємодію як пресинаптичних, так і постсинаптичних механізмів у формуванні складних функціональних мережових взаємодій.

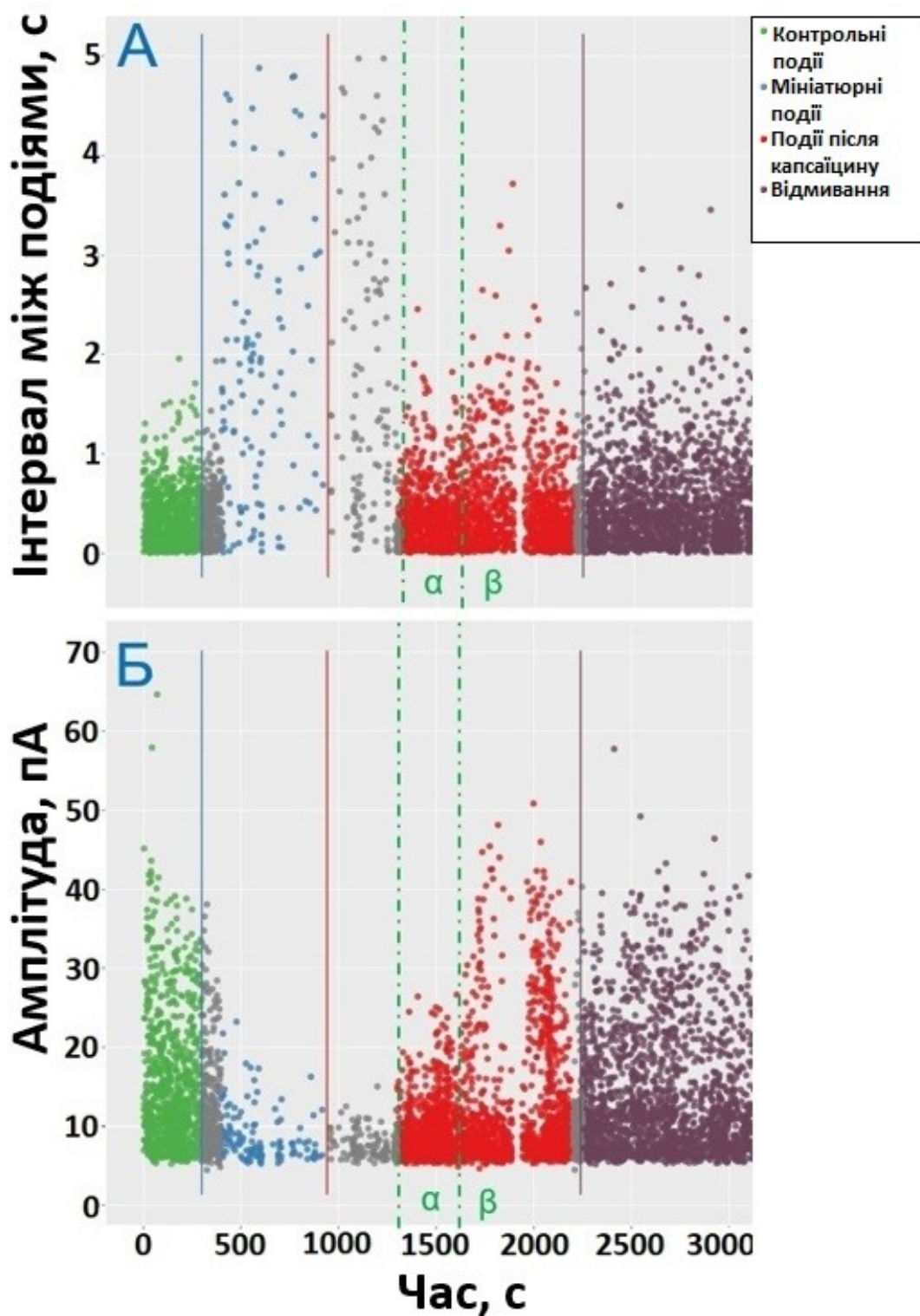


Рис. 3.3.9 Ілюстрація двофазної дії капсаїцину (1 мкМ) на інтервал між подіями (А) і амплітуди (Б) мініатюрні постсинаптичні події.

Перша фаза (α) (Рис. 3.3.9) впливу капсаїцину характеризувалася різким підвищенням частоти mEPSCs, що досягала пікових значень у перші хвилини після введення агента. Такий ефект узгоджується з активацією TRPV1-рецепторів на пресинаптичних терміналях, що спричиняє значний вхід кальцію в терміналь, посилюючи екзоцитоз везикул із нейромедіатором. Протягом цієї фази переважно спостерігалось підвищення ймовірності вивільнення глутамату, що відповідало стрімкому зростанню збуджувальної активності в нейронних мережах.

Друга фаза (β) (Рис. 3.3.9) мала інший характер: частота подій поступово знижувалася, хоча амплітуда mEPSCs, навпаки, зростала. Такі зміни можуть бути зумовлені виснаженням запасу синаптичних везикул у пресинаптичних терміналях, а також залученням механізмів негативного зворотного зв'язку. Наприклад, надмірний вхід кальцію через TRPV1-рецептори може активувати ендоканабіноїдну систему [73], яка, своєю чергою, пригнічує вивільнення нейромедіаторів. Одночасно збільшення амплітуди mEPSCs може свідчити про підвищення чутливості постсинаптичних рецепторів до глутамату.

Таким чином, дослідження показало, що дія капсаїцину на нейрони пластинки X спинного мозку має складний двофазний характер, який об'єднує різні рівні регуляції синаптичної передачі. Перша фаза (α) відображає переважно пресинаптичні ефекти, що пов'язані зі збільшенням ймовірності вивільнення нейромедіаторів через активацію TRPV1-рецепторів і підвищений вхід кальцію. Друга фаза (β) демонструє залучення механізмів виснаження везикул, а також активацію системи зворотного зв'язку, що обмежує подальшу активність.

3.4 Роль глутаматних рецепторів у капсаїцин-індукованій синаптичній активності нейронів пластинки X

У серії наступних експериментів було вивчено вплив капсаїцину на синаптичну активність нейронів пластинки X без попереднього введення тетродотоксину (ТТХ), що дозволило зберегти природну спонтанну нейрональну активність. Це створило умови для аналізу наближеної до природної синаптичної

передачі в *ex vivo* препараті спинного мозку щура, дозволяючи вивчати капсаїцин-індуковані ефекти в умовах натуральної інтеграції синаптичних мереж. Дослідження було проведено на семи окремих препаратах пластинки X, у яких детально оцінювали частоту та амплітуду спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів (sEPSCs) до і після аплікації капсаїцину.

Додавання капсаїцину у концентрації 1 мкМ спричиняло значне підвищення синаптичної активності. Частота sEPSCs зростала в середньому на $119.6 \pm 51.3 \%$, що вказує на потужний вплив TRPV1-рецепторів на збуджувальну передачу. Таке збільшення частоти подій може бути пов'язане з активацією TRPV1-рецепторів, розташованих на пресинаптичних терміналах ноцицепторів. Активація цих каналів зумовлює вхід кальцію у пресинаптичні закінчення, що підвищує ймовірність екзоцитозу везикул із нейромедіатором, переважно глутаматом. Посилене вивільнення глутамату, своєю чергою, збільшує активність постсинаптичних рецепторів, зокрема AMPA- та NMDA-рецепторів, що сприяє загальному зростанню частоти збуджуючі подій.

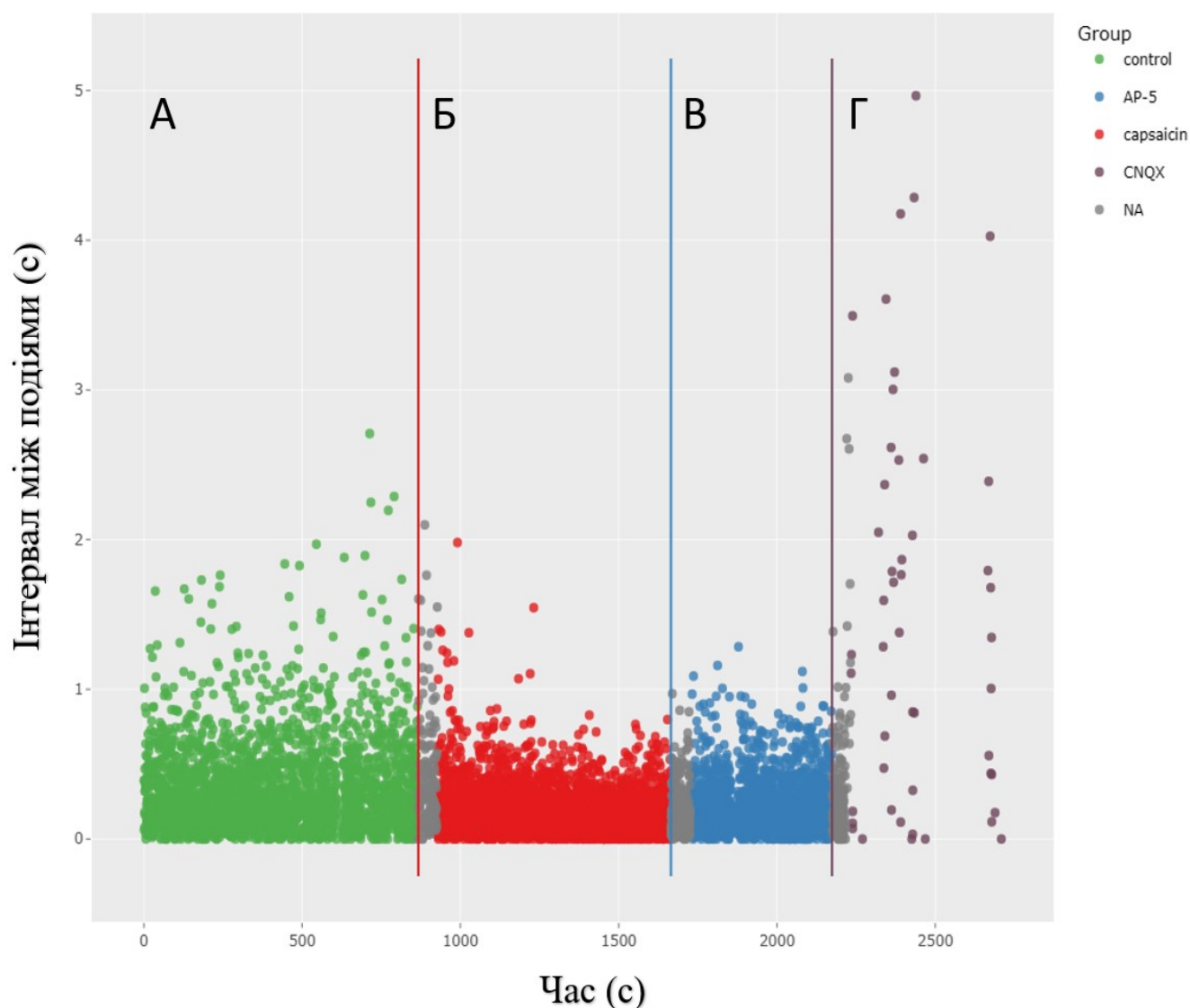


Рис. 3.4.1 Характерний приклад активності нейрона пластинки X в контролі (А) та при прикладанні: капсаїцину (1 мкМ) (Б); AP-5 (30 мкМ) (В); CNQX (10 мкМ) (Г).

Для з'ясування внеску різних типів глутаматних рецепторів у капсаїцин-індуковану активність, у перфузійний розчин послідовно вносили специфічні блокатори: AP-5 (антагоніст NMDA-рецепторів) та CNQX (антагоніст AMPA-рецепторів) (Рис. 3.4.1). Спочатку було додано AP-5 у концентрації 30 мкМ, що призвело до часткового зниження частоти sEPSC. Частота подій зменшилася на $33.5 \pm 8.7\%$ порівняно з ефектом капсаїцину без блокатора. Інтервал між подіями при капсаїцині становив у середньому 0,156 с (медіанне — 0,115 с; Q1 — 0,062 с; Q3 — 0,204 с). Після додавання AP-5 середній інтервал збільшився до 0,203 с

(медіанне — 0,153 с; Q1 — 0,080 с; Q3 — 0,269 с). Це вказує на те, що NMDA-рецептори відіграють значну, хоча й не домінуючу роль у підтримці синаптичної активності, опосередкованої TRPV1-рецепторами.

Функція NMDA-рецепторів у цих умовах полягає у забезпеченні тривалих деполяризаційних ефектів через входження іонів кальцію у постсинаптичну мембрану. Кальцієвий вхід через NMDA-рецептори активує внутрішньоклітинні сигнальні каскади, які обумовлюють синаптичну пластичність та довготривалу зміну у збудливості нейронів. Зниження частоти sEPSC після блокади NMDA-рецепторів свідчить про їхній внесок у підтримання активності під впливом капсаїцину. Однак, незважаючи на їхню важливу роль, блокада NMDA-рецепторів не повністю усувала капсаїцин-індуковану активність, що свідчить про домінуючу участь інших механізмів.

Після введення CNQX (10 мкМ), селективного антагоніста AMPA-рецепторів, активність mEPSCs майже повністю зникла (зниження в порівнянні з розчином капсаїцину з ар-5 складало в середньому $83,9 \pm 13,1\%$). Інтервал між подіями після додавання CNQX становив у середньому 1,496 с (медіанне — 1,284 с; Q1 — 0,292 с; Q3 — 2,373 с), що суттєво більше, ніж при дії лише AP-5 (0,203 с) (Рис. 3.4.2). Цей результат підтверджує, що AMPA-рецептори забезпечують основний механізм збуджуючої синаптичної передачі, опосередкованої TRPV1-рецепторами. На відміну від NMDA-рецепторів, AMPA-рецептори відповідають за швидкий компонент глутаматергічної передачі. Блокада AMPA-рецепторів фактично ліквідує можливість передачі сигналу, що підтверджує їхню ключову роль у цьому процесі.

Комбіноване застосування AP-5 і CNQX дозволило визначити взаємодію між AMPA- і NMDA-рецепторами у формуванні капсаїцин-індукованої активності. Хоча AMPA-рецептори відповідають за первинну швидку деполяризацію постсинаптичної мембрани, NMDA-рецептори забезпечують тривалий компонент деполяризації та підтримують внутрішньоклітинні процеси, які є важливими для синаптичної пластичності. Ця взаємодія є ключовою для

формування та підтримання центральної сенсibiliзації, яка лежить в основі хронічного болю.

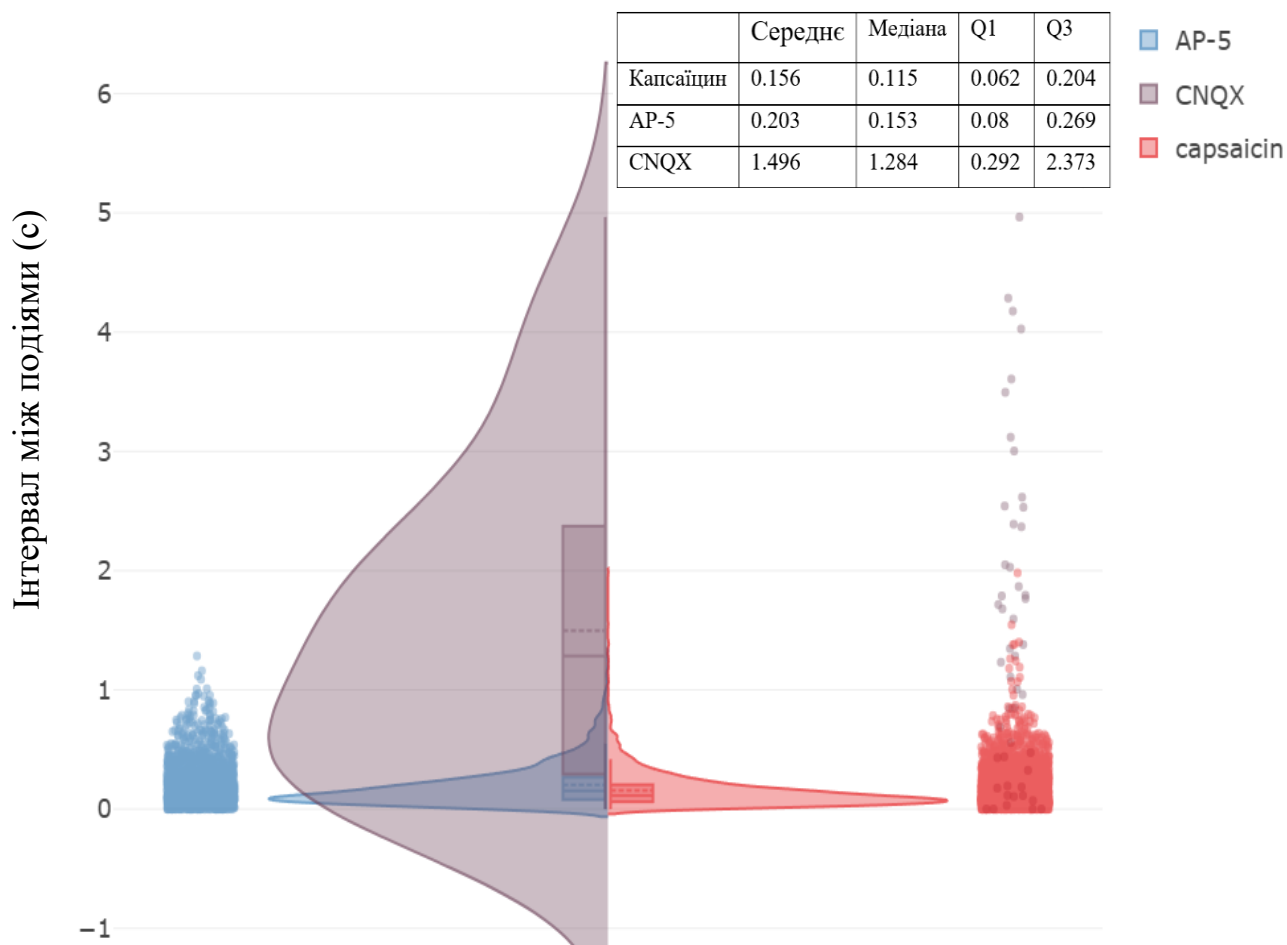


Рис. 3.4.2 Скрипкова діаграма для інтервалів між подіями клітини X-пластинки при Капсаїцині (1 мкМ), AP-5 (30 мкМ), CNQX (10мкМ).

Значення отриманих даних полягає у глибшому розумінні того, як TRPV1-рецептори модулюють синаптичну активність через глутаматергічні механізми. Результати підкреслюють, що AMPA-рецептори є основною для швидкої передачі сигналів, тоді як NMDA-рецептори виконують допоміжну роль, забезпечуючи довготривалі зміни в активності нейронів. Це знання може бути використане для розробки фармакологічних стратегій, спрямованих на регуляцію активності AMPA- та NMDA-рецепторів, з метою лікування станів, пов'язаних із центральною сенсibiliзацією та хронічним болем.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Перебудова електрофізіологічної активності спинно-парабрахіальних нейронів пластинки І при нейропатичному болю

В інших дослідженнях [74] зростання активності спинномозкових-парабрахіальних нейронів у відповідь на периферичну травму вже неодноразово спостерігалось, але детальних відомостей про те, яких електрофізіологічних змін зазнають окремі підтипи цих нейронів, досі не було. Наші результати продемонстрували, що SNI викликає не лише кількісні, а й якісні зміни в їхній електрофізіологічній поведінці.

Зокрема було виявлено такі характерні зміни серед нейронів першої пластинки: втрата МО, які могли б відігравати проміжну роль у модулюванні больових сигналів; поява спинномозкових-парабрахіальних нейронів зі станом постійної генерації, а також перехід частини LO та НО у стан, чутливий до низькопорогових стимулів, свідчать про істотну перебудову. Зауважимо, що пасивні характеристики мембрани нейронів (мембранний потенціал спокою, мембранний опір) суттєво не змінилися.

Це свідчить про те, що основні механізми перебудови збудливості є синаптичними та/або пов'язаними з модуляцією іонних каналів, які визначають величину вихідних струмів під час збудження. Оскільки відомо, що пошкодження периферичних нервів спричиняє активацію мікроглії та астроцитів у спинному мозку, підвищення вивільнення прозапальних цитокінів і трофічних факторів може надмірно збільшувати синаптичну передачу глутамату та сприяти сенситизації нейронів.

Також у пошкоджених ноцицепторів часто зростає експресія натрієвих каналів (Na_v1.7, Na_v1.8), що призводить до їхньої гіперактивності та здатності вивільняти більші кількості збуджувальних нейромедіаторів у синаптичну щілину. Зниження гальмівного тону (через дезактивацію ГАМКергічних

інтернейронів або зменшення викиду гліцину [75] може додатково посилювати збудження мережі, адже за нормальних умов гальмівні механізми утримують ноцицептивні нейрони від надмірної активації.

Усе це пояснює, чому раніше нейрони, які відповідали лише на високопорогові больові сигнали, починають реагувати на низькопорогові не больові стимули, а деякі з них переходять у стани постійної генерації (PF) потенціалів дії. Фактично, синаптична пластичність і гліальна активація у спинному мозку забезпечують нові схеми активації спинно-парабрахіальних нейронів, які не зустрічаються у здорових тварин. З клінічної точки зору ці дані допомагають зрозуміти природу таких прикрих симптомів, як алодинія чи спонтанний біль. Адже коли частина нейронів реагує на слабкий дотик так, ніби це ноцицептивний стимул, пацієнт відчуватиме біль від контакту, який у здоровому стані не викликав би жодного дискомфорту. Спонтанний біль може бути наслідком переходу деяких нейронів у стан хронічної деполяризації та розрядів, коли немає потреби в жодному специфічному подразнику, і такий стан може підтримуватися за рахунок патологічно зміненого співвідношення збуджувальних та гальмівних сигналів. Це особливо чітко відповідає тому, що ми бачимо у тварин з частковим пошкодженням сідничного нерва: вони демонструють раптові посмикування лапи, облизування, тобто ознаки дискомфорту, який нічим не спровоковано ззовні. Варто зазначити, що навіть коли тварина не отримує нових больових подразників, її нервова система перебуває в стані підвищеної готовності реагувати на будь-які вхідні сигнали і може генерувати власні внутрішні імпульси, що сприймаються як біль.

З точки зору фармакологічної корекції це відкриває шлях до глибшого розуміння, на які саме механізми варто впливати. Якщо раніше акцент робився переважно на периферичних ноцицепторах або на системному пригніченні больової сигналізації (в тому числі і гальмівних механізмів), то тепер стає зрозумілим, що специфічне пригнічення синаптичної пластичності у спинному мозку, відновлення гальмівного балансу, блокування певних підтипів іонних

каналів у спинно-парабрахіальних нейронах можуть стати вдалими точками терапевтичного втручання. Це особливо актуально, оскільки наявні медикаменти часто мають лише частковий ефект і супроводжуються побічними явищами, а нейропатичний біль залишається одним із найгірше контрольованих больових синдромів у клінічній практиці.

Цікаво, що в частині випадків PF можна запустити навіть низькопороговими стимулами, що додатково підтверджує ідею алодинії, коли будь-який дотик чи легкий подразник викликає тривалу відповідь, суб'єктивно сприйняту як біль. З огляду на це можна було б прогнозувати, що фармакологічні втручання, спрямовані на блокування NMDA-рецепторів або на покращення кліренсу глутамату, можуть частково зменшувати тривалість і частоту таких PF-станів, а водночас знижувати загальний рівень патологічної збудливості, характерної для нейропатичного болю.

Інший аспект, який привертає увагу, – це спонтанна PF активність, зареєстрована приблизно в 38 відсотках спинно-парабрахіальних нейронів у тварин із SNI. Вона може бути безпосередньою причиною спонтанного болю, адже коли нейрон продукує потенціали дії без жодного подразника, мозок продовжує отримувати сигнал про наявність «болю», хоча об'єктивно немає шкідливого впливу ззовні. У деяких випадках такий нейрональний шум може призводити до постійного дискомфорту, характерного для хронічних больових синдромів. Важливо, що цей феномен узагалі не спостерігався в контрольних тварин, тож можна говорити про специфічну особливість, яка притаманна саме нейропатичному болю.

Також заслуговує на увагу той факт, що ані LO-, ані НО-нейрони не виявляли стану спонтанної постійної генерації. Це свідчить про те, навіть за умов патології, ці нейрони зберігають певні механізми регуляції і не переходять у такий «самозбудний» режим. У контексті нейропатії, натомість, формується «новий» тип клітинної поведінки, яка має відмінну від LO- чи НО-специфіку. Ті ж PF-нейрони, що виникають після травми, можна розглядати як окремий фенотип,

індукований нейропатією, і він стає джерелом як викликаних (у відповідь на стимул), так і спонтанних тривалих послідовностей потенціалів дії.

Подальші дослідження, спрямовані на розуміння природи цих новоутворених RF-нейронів, могли б допомогти знайти найуразливіші ланки патогенезу нейропатичного болю. Усі виявлені зміни – алодинічний зсув, зникнення МО, поява RF-розрядів, спонтанна активність – в сукупності можуть пояснювати класичні симптоми нейропатії: алодинію, коли не-больові подразники викликають больову реакцію, гіпералгезію, коли больові подразники сприймаються гіпертрофовано, а також спонтанний біль, що може проявлятися у вигляді раптових неприємних відчуттів. Останнє особливо важливе, адже воно суттєво знижує якість життя і є одним із найскладніших для терапії симптомів.

Принципове значення цих результатів полягає у тому, що базовий мембранний потенціал клітин не змінюється, отже переробка відбувається на синаптичному та внутрішньоклітинному рівнях (через зміну розподілу іонних каналів, зміну рівня їхньої експресії, посттрансляційні модифікації, запуск каскадів вторинних месенджерів), а також, імовірно, за участі гліальних клітин. Активована мікроглія може виділяти прозапальні цитокіни, такі як IL-1 β та TNF α , а також BDNF, що модулюють збудливість нейронів через NMDA- та AMPA-рецептори [76]. Знижений гальмівний вплив (через пригнічення ГАМКергічних і гліцинергічних механізмів) робить нервову мережу спинного мозку більш збудливою у відповідь на спонтанні потенціали дії.

Крім того, при ушкодженні нерва часто відбувається перебудова на рівні первинних аферентів яка сприяє гіперзбудливості та більшому викиду глутамату в синапс. Якщо нормальні транспортери глутамату з якихось причин не встигають ефективно його видаляти, то нейрони продовжують перебувати у збудженому стані довше, ніж належить. Ці процеси узгоджуються із спостереженнями, що блокатори NMDA-рецепторів у деяких випадках зменшують прояви нейропатичного болю, хоча клінічна ефективність таких препаратів може бути варіативною.

Враховуючи все це, дослідження змін у функціональній активності спинномозкових-парабрахіальних нейронів в моделі часткового ушкодження сідничного нерва дає більш детальний погляд на те, як формується патологічна гіперактивність у спинному мозку, і як ця гіперактивність стає джерелом алодинії, гіпералгезії та спонтанного болю. Цей висновок ґрунтується на тому, що нейрони пластинки I є критичною ланкою, яка передає ноцицептивні сигнали від периферії до вищих центрів болю. Якщо на їхньому рівні відбувається надмірна активація, то вона може мультиплікуватися і далі підтримуватися в центральних відділах нервової системи, спричиняючи хронічний біль.

У деяких випадках можна припустити, що перебудова на рівні пластинки I стає настільки стійкою, що навіть після відновлення або поліпшення стану пошкоджених нервових волокон зберігається «пам'ять болю», адже синаптичні зв'язки та внутрішньоклітинні сигнальні системи нейронів уже перебудовані й продовжують працювати в режимі гіперактивації. Розуміння цих механізмів відкриває шлях до більш цілеспрямованих втручань, зокрема препаратів, спрямованих на певні підтипи натрієвих чи кальцієвих каналів, регуляцію метаболізму гліальних клітин, модуляцію глутаматергічних синапсів та відновлення гальмівного тону.

Проте, беручи до уваги отримані дані, можна зробити висновок, що саме порушення функціонування нейронів пластинки I після SNI має визначальне значення. Зокрема, відзначаються якісно новий тип активності (PF), а також спонтанна генерація імпульсів, відсутня за нормальних умов. Наявність алодинічного зсуву, коли раніше суто ноцицептивні нейрони (LO та HO) стають чутливими до низькопорогових подразників, ускладнює загальну клінічну картину. Зрештою, простежується тісний зв'язок між цими нейрофізіологічними змінами та поведінковими ознаками болю в тварин, такими як знижений поріг у тесті фон Фрея чи посмикування й облизування лапи без видимого подразника. Це дає підстави провести логічну аналогію з клінічними проявами алодинії, гіпералгезії та спонтанного болю в людей із нейропатією.

Популяції нейронів пластинки X

Дослідження функціональної гетерогенності нейронів пластинки X спинного мозку є важливим для розуміння принципів організації та функціонування нейронних мереж, які забезпечують інтеграцію сенсорної, включаючи больову, інформації. Наші результати підтверджують значну різноманітність нейронів пластинки X і дозволяють краще зрозуміти їхню роль у регуляції больової і вісцеральної чутливості.

Класифікація нейронів пластинки X на односпайкові, тонічні та відтерміновані типи може бути пов'язана з їх функціональною спрямованістю. Тонічні нейрони, які становлять 43% популяції, характеризуються тривалою генерацією потенціалів дії у відповідь на стимуляцію і вважаються, переважно, гальмівними. Вони можуть приймати участь у підтримці гальмівного тону в мережах спинного мозку. Їхня здатність до тривалих розрядів забезпечує ефективний контроль над надмірною збудливістю нейронів, що є особливо важливим в умовах патологічних станів, таких як хронічний біль. У той же час односпайкові нейрони, які швидко реагують на початок стимулу, можуть бути спеціалізовані для передачі сигналів, що потребують миттєвого реагування, наприклад, у випадках гострого болю. Відтерміновані нейрони, завдяки своїй здатності змінювати час затримки в залежності від інтенсивності, можуть кодувати вхідні стимули ставлячи їм у відповідність кількість згенерованих потенціалів дії, а також роль своєрідних "фільтрів", відсіюючи короткотривалі імпульси, які менше часу затримки.

Розподіл функцій між цими типами нейронів забезпечує збалансовану взаємодію між швидкою передачею сенсорних сигналів, тривалим гальмівним контролем і контекстуальною обробкою інформації. Тонічні нейрони, що генерують велику кількість потенціалів дії, стабілізують нейронну активність і підтримують гальмівний контроль у пластинці X. Односпайкові нейрони передають початкові сигнали, які можуть бути модульовані іншими компонентами мережі. Відтерміновані нейрони, зі свого боку, адаптуються до

інтенсивності стимулів, сприяючи інтеграції та обробці більш складних сенсорних сигналів. Таке функціональне розмаїття дозволяє пластинці X ефективно реагувати на різні типи вхідної інформації, включаючи вісцеральні та больові сигнали.

Отримані дані свідчать про залученість пластинки X у передачу і обробку ноцицептивної інформації. порушення балансу між типами нейронів може призводити до розвитку патологічних станів, таких як гіпералгезія, алодинія або хронічний біль. Наприклад, дисфункція тонічних нейронів може ослабити гальмівний контроль, тоді як надмірна активність односпайкових і відтермінованих клітин здатна сприяти підвищеній збудливості системи.

Подальші дослідження повинні бути спрямовані на детальний аналіз синаптичної активності нейронів пластинки X та їхньої взаємодії з іншими пластинками спинного мозку. Застосування сучасних методів, таких як оптогенетика або хемогенетика, може допомогти краще зрозуміти внесок окремих типів нейронів у формування болю. Особливу увагу слід приділити дослідженню молекулярних механізмів, які визначають функціонування цих клітин, таких як експресія іонних каналів і нейромедіаторних рецепторів. Такі підходи дозволять розробити більш цілеспрямовані терапевтичні стратегії, спрямовані на усунення причин нейропатичного болю.

Вплив постсинаптичних і пресинаптичних ефектів TRPV1 на збудливість нейронів пластинки X

Отримані в цьому дослідженні дані свідчать, що TRPV1-рецептори, відомі своєю роллю у периферичній ноцицепції, мають суттєвий вплив і у центральних відділах, зокрема в пластинці X спинного мозку. Активація капсаїцином спричиняє значне зростання частоти мініатюрних збуджувальних постсинаптичних подій, а в деяких клітинах – і підвищення їхньої амплітуди. Це дає підстави вважати, що TRPV1, розташовані на пресинаптичних терміналях, збільшують імовірність екзоцитозу глутамату через кальцієвий та натрієвий

струм, а в окремих випадках можуть додатково активувати внутрішньоклітинні механізми у постсинаптичній мембрані, зумовлюючи суттєву перебудову синаптичної ефективності.

Особливої уваги заслуговують нейрони, які демонструють ще й повільний вхідний струм у відповідь на капсаїцин, що свідчить про можливу наявність TRPV1 безпосередньо на сомі або дендритах. Така активація створює пролонгований деполяризуючий ефект, а постійно підвищена концентрація іонів кальцію у цитоплазмі здатна запускати каскад внутрішньоклітинних подій, що істотно посилюють збудливість клітини та можуть реалізовуватися як довготривала пластичність.

Дані про дві групи нейронів, які мають різний ступінь чутливості до капсаїцину, розкривають гетерогенність клітинного складу пластинки X. Частина клітин, імовірно, містить більш щільну експресію TRPV1 тому відповідає різким зростанням частоти та додатковим підвищенням амплітуди мініатюрних збуджувальних струмів. Інші реагують помірно і демонструють меншу зміну параметрів синаптичних подій. Такий розподіл відображає складність нейронної мережі, де одні клітини можуть бути «центрами» больової модуляції і швидко переходити до станів гіперзбудження, тоді як інші виконують допоміжну чи регуляторну функцію.

Додатковим підтвердженням складної природи впливу капсаїцину є двофазна динаміка: спочатку спостерігається стрімке збільшення частоти мініатюрних збуджувальних подій, зумовлене посиленням пресинаптичним викидом глутамату, а згодом – деякий спад цієї активності та зростання амплітуди, що вказує на залучення негативних зворотних механізмів і водночас підвищення постсинаптичної чутливості.

Результати підкреслюють істотний внесок TRPV1 у формуванні центральної сенсibiliзації та її підтриманні в контексті болю, зокрема вісцерального, враховуючи, що пластинка X є важливою зоною інтеграції різних типів ноцицептивних сигналів і може бути залучена у появі хронічних больових

станів. Розуміння того, як саме TRPV1-рецептори підсилюють пресинаптичне вивільнення глутамату й водночас індукують постсинаптичні механізми, відкриває перспективу для фармакологічної корекції патологічної збудливості в цій ділянці.

Пошук інгібіторів чи селективних модуляторів TRPV1, здатних діяти на рівні спинного мозку, може стати наступним кроком у створенні нових стратегій терапії больових синдромів. Це особливо актуально з огляду на те, що виявлена гетерогенність відповіді від різних типів нейронів дозволяє потенційно впливати лише на високореактивні клітини і знижувати ризик небажаних ефектів, діючи таргетовано на певні механізми ноцицептивної обробки. Усе це вказує на складну природу інтеграції больового сигналу в глибинних пластинках спинного мозку й потребує подальших досліджень з урахуванням супраспінальних регуляторних впливів, участі не лише власне нейронів, а й гліальних клітин та ендоканабіноїдної системи, що може додатково модулювати TRPV1-залежні процеси. Такий багаторівневий підхід забезпечить глибше розуміння ролі пластинки X у механізмах больової сенсibiliзації та відкриє нові можливості для впливу на центральні ланки ноцицепції.

Роль AMPA- та NMDA-рецепторів у модуляції капсаїцин-індукованої активності

Застосування блокаторів NMDA-рецепторів (AP-5) та AMPA-рецепторів (CNQX) прояснило внесок кожного з цих типів рецепторів у модуляцію TRPV1-залежної активності. Результати показали, що блокада NMDA-рецепторів знижує частоту подій, однак не повністю усуває капсаїцин-індуковане збудження. Це свідчить про помірний, але істотний внесок NMDA-рецепторів у підтриманні та посиленні активності мережі, а також у тривалих внутрішньоклітинних процесах, пов'язаних із пластичністю. Водночас блокування AMPA-рецепторів призводило майже до повного зникнення синаптичної активності, індукованої капсаїцином,

підкреслюючи центральну роль саме цієї рецепторної системи у передачі швидкого збуджувального сигналу.

Пояснити таку картину можна тим, що після збільшення вивільнення глутамату основний деполяризуючий внесок забезпечують AMPA-рецептори, які миттєво реагують на його підвищену концентрацію. Ця швидка фаза дозволяє нейронам пластинки X оперативно включатися в обробку больової чи іншої сенсорної інформації. NMDA-рецептори, завдяки своїм кінетичним особливостям і високій проникності для іонів кальцію, створюють передумови для підтримання більш тривалих змін у мембранному потенціалі, а також для формування синаптичної пластичності – процесу, що може лежати в основі центральної сенсibilізації.

Встановлена залежність капсаїцин-індукованої активності від глутаматних механізмів підкреслює важливість взаємодії між TRPV1 і глутаматними рецепторними комплексами в пластинці X. Підвищення частоти екзоцитозу глутамату через пресинаптичну активацію TRPV1 створює основу для залучення обох типів рецепторів – AMPA та NMDA, кожен із яких робить специфічний внесок у сумарний збуджувальний ефект. Така взаємодія пояснює, чому блокування виключно NMDA-рецепторів не усуває повністю збільшення активності, в той час як блокада AMPA-рецепторів зводить її нанівець. Функціонально це означає, що TRPV1-опосередкована передача у пластинці X найперше залежить від AMPA-рецепторів, проте NMDA-рецептори долучаються до пролонгованих ефектів і можуть сприяти розвитку тривалої або патологічної збудливості.

Подібне поєднання двох типів глутаматних рецепторів може бути критичним для механізмів центральної сенсibilізації та формування хронічного болю [77,78]. Якщо вплив на TRPV1-рецептори поки що важко селективно реалізувати без побічних ефектів, то блокування чи модуляція AMPA- і NMDA-рецепторів залишається одним із перспективних напрямів терапії центральної сенсibilізації. Зрештою, результати експериментів із блокаторами глутаматних

рецепторів дають підстави для припущення, що найбільший клінічний ефект можна отримати за умови комплексного підходу, де мішенню для втручання стають як пресинаптичні TRPV1-канали, так і різні типи постсинаптичних глутаматних рецепторів, які забезпечують як швидку, так і тривалу деполяризацію нейронів пластинки X.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі згідно поставлених цілей і завдань були досліджені механізми передачі і обробки ноцицептивної інформації від первинних аферентів в I і X пластинках поперекового відділу спинного мозку щурів в нормі та при хронічному болю і зроблені висновки:

1. Визначені характерні патерни генерації потенціалів дії спинномозковими-парабрахіальними нейронами пластинки I які в умовах моделі нейропатичного болю зазнають суттєвої перебудови. Спостерігається поява нових форм активності спинномозкових-парабрахіальних нейронів: відповіді на стимуляцію низькопорогових аферентів; стан виникнення тривалої генерації потенціалів дії у відповідь на стимуляцію первинних аферентів та стан спонтанної тривалої генерації потенціалів дії. Всі три із нових наведених типів електрофізіологічної активності в нейронах пластинки I корелюють з клінічними ознаками алодинії, гіпералгезії та спонтанного болю відповідно.
2. Було вивчено функціональну гетерогенність нейронів пластинки X спинного мозку щура на основі патернів генерації потенціалів дії у відповідь на зміну мембранного потенціалу. Визначили три основні типи нейронів пластинки X: тонічні – генерують потенціали дії протягом всього часу стимуляції, односпайкові – генерують лише один потенціал дії відповідь на зміну мембранного потенціалу та відтерміновані – генерують потенціали дії з певною затримкою відносно початку стимулу. Отримані дані опосередковано підтверджують, що X пластинка залучена у регуляцію

больових сенсорно-моторних і рефлекторних процесів у спинному мозку, забезпечуючи одночасно як гальмівний, так і збуджувальний контроль.

3. Доведено залученість TRPV1 рецепторів у модуляцію спонтанної синаптичної активності нейронів X пластинки. Зокрема було показано, що:
а) активація TRPV1 агоністом (капсаїцином) призводить до значного зростання частоти мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (mEPSCs) у нейронах пластинки X, вказуючи на підвищений рівень вивільнення збуджувального медіатора; б) у частини клітин, разом зі збільшенням частоти, спостерігається одночасний ріст амплітуди mEPSCs та поява повільного входного струму, що може свідчити про додатковий постсинаптичний механізм (активація кальцієвих каналів, зміна чутливості AMPA-рецепторів); в) ефекти капсаїцину демонструють двофазний характер: початкове різке посилення вивільнення медіатора (було визначено як α -фаза) змінюється залученням механізмів негативного зворотного зв'язку й виснаженням синаптичних везикул (β -фаза). Отримані дані свідчать про інтегральну роль TRPV1-рецепторів у модуляції спонтанної синаптичної активності нейронів пластинки X та, можливе, формування больових синдромів.
4. Визначено внесок глутаматних рецепторів різних типів у капсаїцин-індуковану активність нейронів X пластинки. Зокрема, блокада NMDA-рецепторів (за допомогою антагоніста AP-5) лише частково знижує частоту збуджувальних подій, доводячи їхній внесок у підтримання активності та внутрішньоклітинних каскадів що сприяють синаптичній пластичності, але не є основним механізмом передачі. Блокування AMPA-рецепторів (за допомогою CNQX) майже повністю усуває активність, підтверджуючи їх ключову роль у швидкій передачі глутаматергічного сигналу, яка є основною для формування збудження нейронної мережі в X пластинці. Взаємодія між AMPA- та NMDA-рецепторами забезпечує внесок у модуляцію та підтримання активності нейронів пластинки X.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Webb CM, Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Clin Integr Care*. 01, ЖОВТЕНЬ 2022;14:100115.
2. De Ridder D, Adhia D, Vanneste S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 01, Листопад 2021;130:125–46.
3. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. Квітень 2002;66(6):355–474.
4. Mason D, McConachie H, Garland D, Petrou A, Rodgers J, Parr JR. Predictors of quality of life for autistic adults. *Autism Res*. 2018;11(8):1138–47.
5. Olsen SR, Bortone DS, Adesnik H, Scanziani M. Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature*. 22, Лютий 2012;483(7387):47–52.
6. Courtney CA, Fernández-de-Las-Peñas C, Bond S. Mechanisms of chronic pain - key considerations for appropriate physical therapy management. *J Man Manip Ther*. Липень 2017;25(3):118–27.
7. Chronic Pain: An Update of Clinical Practices and Advances in Chronic Pain Management [Інтернет]. [цит. за 14, Січень 2025]. Доступний у: <http://www.eajm.org/en/chronic-pain-an-update-of-clinical-practices-and-advances-in-chronic-pain-management-133430>
8. Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*. Вересень 2009;10(9):895–926.
9. Niederberger E. Novel Insights into Molecular Mechanisms of Chronic Pain. *Cells*. ЖОВТЕНЬ 2020;9(10):2220.
10. Hardy TA. Spinal Cord Anatomy and Localization. *Contin Minneap Minn*. 01, Лютий 2021;27(1):12–29.
11. Huang Y, Chen SR, Chen H, Zhou JJ, Jin D, Pan HL. Theta-Burst Stimulation of Primary Afferents Drives Long-Term Potentiation in the Spinal Cord and

Persistent Pain via $\alpha 2\delta$ -1-Bound NMDA Receptors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 19, Січень 2022;42(3):513–27.

12. Li J, Price TJ, Baccell ML. D1/D5 Dopamine Receptors and mGluR5 Jointly Enable Non-Hebbian Long-Term Potentiation at Sensory Synapses onto Lamina I Spinoparabrachial Neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 19, Січень 2022;42(3):350–61.

13. Kopach O, Medvediev V, Krotov V, Borisyuk A, Tsymbaliuk V, Voitenko N. Opposite, bidirectional shifts in excitation and inhibition in specific types of dorsal horn interneurons are associated with spasticity and pain post-SCI. *Sci Rep*. 19, Липень 2017;7(1):5884.

14. Billeter AT, Hellmann JL, Bhatnagar A, Polk HC. Transient receptor potential ion channels: powerful regulators of cell function. *Ann Surg*. Лютий 2014;259(2):229–35.

15. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*. 20, Квітень 2006;50(2):277–89.

16. Christoph T, Grünweller A, Mika J, Schäfer MKH, Wade EJ, Weihe E, et al. Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 10, Листопад 2006;350(1):238–43.

17. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 24, Березень 2006;124(6):1269–82.

18. Christoph T, Gillen C, Mika J, Grünweller A, Schäfer MKH, Schiene K, et al. Antinociceptive effect of antisense oligonucleotides against the vanilloid receptor VR1/TRPV1. *Neurochem Int*. Січень 2007;50(1):281–90.

19. Murray AJ, Croce K, Belton T, Akay T, Jessell TM. Balance Control Mediated by Vestibular Circuits Directing Limb Extension or Antagonist Muscle Co-activation. *Cell Rep*. 30, Січень 2018;22(5):1325–38.

20. Cregg JM, Leiras R, Montalant A, Wanken P, Wickersham IR, Kiehn O. Brainstem neurons that command mammalian locomotor asymmetries. *Nat Neurosci.* Червень 2020;23(6):730–40.
21. Capelli P, Pivetta C, Soledad Esposito M, Arber S. Locomotor speed control circuits in the caudal brainstem. *Nature.* Листопад 2017;551(7680):373–7.
22. Bouvier J, Caggiano V, Leiras R, Caldeira V, Bellardita C, Balueva K, et al. Descending Command Neurons in the Brainstem that Halt Locomotion. *Cell.* 19, Листопад 2015;163(5):1191–203.
23. Fernandes EC, Pechincha C, Luz LL, Kokai E, Szucs P, Safronov BV. Primary afferent-driven presynaptic inhibition of C-fiber inputs to spinal lamina I neurons. *Prog Neurobiol.* Травень 2020;188:101786.
24. Cervero F, Laird JMA. Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. *J Neurobiol.* 2004;61(1):45–54.
25. Eijkelkamp N, Kavelaars A, Elsenbruch S, Schedlowski M, Holtmann G, Heijnen CJ. Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS-induced colitis in mice: spinal cord c-Fos expression and behavior. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Жовтень 2007;293(4):G749-757.
26. Deuchars SA, Lall VK. Sympathetic preganglionic neurons: properties and inputs. *Compr Physiol.* Квітень 2015;5(2):829–69.
27. Bertrand SS, Cazalets JR. Cholinergic Partition Cells and Lamina X Neurons Induce a Muscarinic-Dependent Short-Term Potentiation of Commissural Glutamatergic Inputs in Lumbar Motoneurons. *Front Neural Circuits* [Інтернет]. 2011;5. Доступний у: <https://www.frontiersin.org/journals/neural-circuits/articles/10.3389/fncir.2011.00015>
28. Larsson M. Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing. *Mol Neurobiol.* Грудень 2009;40(3):260–88.
29. Bardoni R. Role of presynaptic glutamate receptors in pain transmission at the spinal cord level. *Curr Neuropharmacol.* Вересень 2013;11(5):477–83.

30. Huang Y, Chen H, Jin D, Chen SR, Pan HL. NMDA Receptors at Primary Afferent-Excitatory Neuron Synapses Differentially Sustain Chemotherapy- and Nerve Trauma-Induced Chronic Pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 24, Травень 2023;43(21):3933–48.
31. Palazzo E, Marabese I, Luongo L, Guida F, de Novellis V, Maione S. Nociception modulation by supraspinal group III metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*. Травень 2017;141(4):507–19.
32. Holden A, Winlow W, Usherwood P, Matthews B, Clarke R, Mumford J, et al. The neurobiology of pain. Вип. 61, *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1984. 462 с.
33. Di Maio G, Villano I, Ilardi CR, Messina A, Monda V, Iodice AC, et al. Mechanisms of Transmission and Processing of Pain: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(4).
34. 牛田 享宏. 慢性疼痛とそれを取りまく痛みの歴史や概念・定義. *BRAIN NERVE*. 01, Березень 2023;75(3):201–5.
35. Safronov BV, Szucs P. Novel aspects of signal processing in lamina I. *Neuropharmacology*. 01, Квітень 2024;247:109858.
36. Axon Diversity of Lamina I Local-Circuit Neurons in the Lumbar Spinal Cord. *J Comp Neurol*. 15, Серпень 2013;521(12):2719–41.
37. Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the mouse. *J Physiol*. 01, Квітень 2019;597(7):2097–113.
38. Sengul G, Liang H, Furlong TM, Paxinos G. Dorsal Horn of Mouse Lumbar Spinal Cord Imaged with CLARITY. *BioMed Res Int*. 01, Січень 2020;2020(1):3689380.
39. Schneider SP. Local Circuit Connections Between Hamster Laminae III and IV Dorsal Horn Neurons. *J Neurophysiol*. Березень 2008;99(3):1306–18.
40. Ralston III HJ. The fine structure of laminae IV, V, and VI of the macaque spinal cord. *J Comp Neurol*. 1982;212(4):425–34.

41. Candar E, Demircubuk I, Sengul G. Bror Rexed (1914–2002) and His Pioneer Works on Spinal Cord Cytoarchitecture. *The Neuroscientist*. 01, Грудень 2024;30(6):666–72.
42. Light AR, Durkovic RG. Features of laminar and somatotopic organization of lumbar spinal cord units receiving cutaneous inputs from hindlimb receptive fields. *J Neurophysiol*. 01, Вересень 1984;52(3):449–58.
43. Hammar I, Stecina K, Jankowska E. Differential modulation by monoamine membrane receptor agonists of reticulospinal input to lamina VIII feline spinal commissural interneurons. *Eur J Neurosci*. 2007;26(5):1205–12.
44. Cervical and cerebellar projections of lamina VII and VIII neurones of the S2 segment in the cat's spinal cord. *Arch Ital Biol*. 01, Липень 1998;136(3):181–9.
45. Krotov V, Tokhtamysh A, Safronov BV, Belan P, Voitenko N. High-threshold primary afferent supply of spinal lamina X neurons. *Pain*. Вересень 2019;160(9):1982–8.
46. Krotov V, Tokhtamysh A, Kopach O, Dromaretsky A, Sheremet Y, Belan P, et al. Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Front Cell Neurosci* [Інтернет]. 01, Листопад 2017 [цит. за 14, Січень 2025];11. Доступний у: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2017.00342/full>
47. Krotov V, Agashkov K, Krasniakova M, Safronov BV, Belan P, Voitenko N. Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X. *Pain*. 01, Жовтень 2022;163(10):2014–20.
48. Wahle P, Sobierajski E, Gasterstädt I, Lehmann N, Weber S, Lübke JH, et al. Neocortical pyramidal neurons with axons emerging from dendrites are frequent in non-primates, but rare in monkey and human. Krug K, Huguenard JR, Krug K, Rockland K, Levitt JB, за ред. *eLife*. 20, Квітень 2022;11:e76101.

49. Lin S de, Tang T, Zhao TB, Liu SJ. Central projections and connections of lumbar primary afferent fibers in adult rats: effectively revealed using Texas red-dextran amine tracing. *Neural Regen Res.* ЖОВТЕНЬ 2017;12(10):1695–702.
50. Prescott SA, Ratté S. Pain processing by spinal microcircuits: afferent combinatorics. *Curr Opin Neurobiol.* СЕРПЕНЬ 2012;22(4):631–9.
51. Brumovsky P, Hofstetter C, Olson L, Ohning G, Villar M, Hökfelt T. The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord. *Neuroscience.* 01, СІЧЕНЬ 2006;138(4):1361–76.
52. Rupprecht P, Fan W, Sullivan SJ, Helmchen F, Sdrulla AD. Spike rate inference from mouse spinal cord calcium imaging data. *bioRxiv.* 01, СІЧЕНЬ 2025;2024.07.17.603957.
53. Harding EK, Fung SW, Bonin RP. Insights Into Spinal Dorsal Horn Circuit Function and Dysfunction Using Optical Approaches. *Front Neural Circuits* [Інтернет]. 12, Червень 2020 [цит. за 14, Січень 2025];14. Доступний у: <https://www.frontiersin.org/journals/neural-circuits/articles/10.3389/fncir.2020.00031/full>
54. Iredale JA, Stoddard JG, Drury HR, Browne TJ, Elton A, Madden JF, et al. Recording Network Activity in Spinal Nociceptive Circuits Using Microelectrode Arrays. *J Vis Exp JoVE.* 09, Лютий 2022;(180).
55. W. Wu, S. He, Y. Chen, C. Chen, Y. Fu, K. Liu, et al. Minimally Invasive Microglial and Neuronal Imaging in Mouse Spinal Cord Dorsal Horn. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* СЕРПЕНЬ 2023;29(4: Biophotonics):1–13.
56. Kristensson K. Transport of fluorescent protein tracer in peripheral nerves. *Acta Neuropathol (Berl).* 01, Грудень 1970;16(4):293–300.
57. Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol.* Листопад 2000;62(4):327–51.

58. Lanciego JL, Wouterlood FG. A half century of experimental neuroanatomical tracing. *J Chem Neuroanat.* Листопад 2011;42(3):157–83.
59. Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci.* Грудень 2010;11(12):823–36.
60. Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci.* Листопад 2003;18(9):2433–48.
61. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* Серпень 2000;87(2):149–58.
62. Frey M von. Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut. 1. abhandlung: Druckempfindung und schmerz [Інтернет]. Leipzig, S. Hirzel; 1896 [цит. за 14, Січень 2025]. 114 с. Доступний у: <http://archive.org/details/untersuchungen00frey>
63. Ferrier J, Marchand F, Balayssac D. Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. *Bio-Protoc.* 20, Вересень 2016;6(18):e1933.
64. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* Січень 1988;32(1):77–88.
65. Safronov B, Pinto V, Derkach V. High-resolution single-cell imaging for functional studies in the whole brain and spinal cord and thick tissue blocks using light-emitting diode illumination. *J Neurosci Methods.* 01, Вересень 2007;164:292–8.
66. Hachisuka J, Omori Y, Chiang MC, Gold MS, Koerber HR, Ross SE. Wind-up in lamina I spinoparabrachial neurons: a role for reverberatory circuits. *PAIN.* Серпень 2018;159(8):1484.
67. Marchetto MC, Hrvoj-Mihic B, Kerman BE, Yu DX, Vadodaria KC, Linker SB, et al. Species-specific maturation profiles of human, chimpanzee and bonobo neural cells. *Zoghbi HY, Arlotta P, за ред. eLife.* 07, Лютий 2019;8:e37527.

68. Lee V, Maguire J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits* [Інтернет]. 03, Лютий 2014 [цит. за 14, Січень 2025];8. Доступний у: <https://www.frontiersin.org/journals/neural-circuits/articles/10.3389/fncir.2014.00003/full>
69. Liu X, Ma Q, Wu L, Zhao X, Zhu Y, Yi M, et al. Energy consumption of spontaneous transitions in a synaptic delay network. *Eur Phys J Plus*. 16, Березень 2024;139(3):264.
70. Molnár G, Oláh S, Komlósi G, Füle M, Szabadics J, Varga C, et al. Complex Events Initiated by Individual Spikes in the Human Cerebral Cortex. *PLOS Biol*. 02, Вересень 2008;6(9):e222.
71. Johnston M, Porter B, Colombo M. Delay Neurons: Comparative Overview. В: Vonk J, Shackelford T, за ред. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* [Інтернет]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [цит. за 14, Січень 2025]. с. 1–8. Доступний у: https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_2061-1
72. Chung YC, Baek JY, Kim SR, Ko HW, Bok E, Shin WH, et al. Capsaicin prevents degeneration of dopamine neurons by inhibiting glial activation and oxidative stress in the MPTP model of Parkinson's disease. *Exp Mol Med*. Березень 2017;49(3):e298–e298.
73. Rahaman O, Ganguly D. Endocannabinoids in immune regulation and immunopathologies. *Immunology*. 2021;164(2):242–52.
74. Torres-Rodriguez JM, Wilson TD, Singh S, Torruella-Suárez ML, Chaudhry S, Adke AP, et al. The parabrachial to central amygdala pathway is critical to injury-induced pain sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology*. Лютий 2024;49(3):508–20.

75. Righes Marafija J, Vendramin Pasquetti M, Calcagnotto ME. GABAergic interneurons in epilepsy: More than a simple change in inhibition. *Epilepsy Behav.* 01, Серпень 2021;121:106935.

76. Boakye PA, Tang SJ, Smith PA. Mediators of Neuropathic Pain; Focus on Spinal Microglia, CSF-1, BDNF, CCL21, TNF- α , Wnt Ligands, and Interleukin 1 β . *Front Pain Res* [Інтернет]. 25, Серпень 2021 [цит. за 15, Січень 2025];2. Доступний у:
<https://www.frontiersin.org/journals/pain-research/articles/10.3389/fpain.2021.698157/full>

77. Kopach O, Voitenko N. Spinal AMPA receptors: Amenable players in central sensitization for chronic pain therapy? *Channels.* 01, Січень 2021;15(1):284–97.

78. Li XH, Miao HH, Zhuo M. NMDA Receptor Dependent Long-term Potentiation in Chronic Pain. *Neurochem Res.* 01, Березень 2019;44(3):531–8.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЙ

1. Volodymyr Krotov, Kirill Agashkov, Sergii Romanenko, **Kostiantyn Koroid**, Marharyta Krasniakova, Pavel Belan, Nana Voitenko. (2023) Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. BBA Advances. 3. 100081. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2023.100081> (Q3)
2. **K.V. Koroid**, I.O. Blashchak, S.V. Romanenko (2024) The Role of TRPV1 and Glutamate Receptors in the Synaptic Activity of Lamina X Neurons of the Rat Spinal Cord. Fiziol. Zh. 2024; 70(5): 49-55. <https://doi.org/10.15407/fz70.05.049>

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **К. Короїд**; І. Блащак; С. Романенко; П. Белан, Пластинки X: вплив капсаїцину та тетродотоксину, XXIII читання ім. В. В. Підвисоцького, 2024, Одеса, Україна.
2. **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 люмбального 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.
3. 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

4. **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.
5. **К. В. Короїд**, І. О. Блашак, С. В. Романенко, В. В. Кротов, К. С. Агашков, М. Є. Краснякова, Сенсорна сигналізація в першій і десятій пластинці спинного мозку щурів у нормі та патології, Міжнародна конференція з нейронаук та Наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології, на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 19-21 листопада 2024 року, Київ, Україна.