

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

**КАТЕДРА ПО АНАТОМИЯ,
ХИСТОЛОГИЯ И ЕМБРИОЛОГИЯ**

Д-Р АНДРЕЙ ВЪЛКОВ ИВАНОВ

**МОРФО-ФУНКЦИОНАЛНА И НЕВРОХИМИЧНА
ХАРАКТЕРИСТИКА НА СПИНАЛНОТО ЯДРО
НА ТРИГЕМИНАЛНИЯ НЕРВ У ПЛЪХ**

ДИ С Е Р Т А Ц И Я

**за присъждане на образователна и научна степен
„доктор”**

СОФИЯ, 2024

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих искал да изразя най-дълбоката си благодарност на любимите ми майка Мария, баща Вълко и сестра Даниела, чиято непоколебима любов и подкрепа бяха моите пътеводни светлини по време на това пътуване. Вашето постоянно насърчение, разбиране и вяра в мен бяха безценни и аз съм ви завинаги благодарен за жертвите, които направихте, за да ми помогнете да преследвам мечтите си.

Безкрайно съм благодарен и на моя научен ръководител, проф. Николай Лазаров, чиито напътствия, мъдрост и менторство изиграха ключова роля в оформянето на моите академични и професионални начинания. Вашата отдаденост към моето израстване, желанието Ви да ме предизвиквате и способността Ви винаги да сте две крачки напред в плановете за моите развитие бяха от решаващо значение за формирането на академичното ми бъдеще и съм истински щастлив, че сте до мен.

Специална благодарност изказвам на скъпата ми колежка доц. Димитринка Атанасова, чиито опит, търпение и непоколебима подкрепа бяха постоянен източник на вдъхновение. Благодаря, че ме научихте на тънкостите на имунохистохимията и че бяхте източник на насърчение и напътствие на всяка стъпка по пътя.

Накрая, но не на последно място, изказвам сърдечните си благодарности на нашия лаборант госпожа Митова, чиято беззаветна и акуратна работа по изготвянето на хистологичните препарати беше незаменима за успеха на този проект. Твоята всеотдайност, внимание към детайлите и непоколебим стремеж към съвършенство допринесоха значително за качеството на нашето изследване.

На всеки от вас съм дълбоко благодарен за приноса, подкрепата и вярата ви в мен. Този труд е посветен на вас, с любов и признателност, за това, че сте неразделна част от моето академично пътешествие.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	7
I. ВЪВЕДЕНИЕ	9
II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	11
2.1 Възникване на представите за сетивната природа на тригеминалния нерв	11
2.2 Морфология на спиналното тригеминално ядро	14
2.3 Неврохимия на спиналното тригеминално ядро	17
2.3.1 Невротрансмитери и невромодулатори	18
2.3.1.1 Гама-аминомаслена киселина	18
2.3.1.2 Ацетилхолин	21
2.3.1.3 Серотонин (5-хидрокситриптами)	24
2.3.1.4 Субстанция Р	27
2.3.1.5 Калцитонин генно-свързан пептид	29
2.3.1.6 Невропептид Y	32
2.3.1.7 Азотен оксид	35
2.3.2 Невротрофни фактори и техните рецептори	38
2.3.2 Роля на неврохимичната сигнализация в краниофациалната сензорна обработка	40
2.4 Функция на спиналното тригеминално ядро	41
2.5 Състояние на проблема	46
III. ЦЕЛИ ЗАДАЧИ	47
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	48
4.1 Експериментални животни	48
4.2 Хистологични техники	49
4.2.1 Вземане и подготвяне на материала	49
4.2.2 Оцветяване с хематоксилин и еозин	51
4.2.3 Оцветяване с толуидиново синьо	52
4.2.4 Оцветяване с неутрално червено	52
4.3. Имунохистохимични методи	53
4.3.1 Имунохистохимична процедура	53
4.3.2 Контролни оцветявания за специфичност	59
4.3.3 Обработка и анализ на изображенията	59
4.3.4 Морфометрия и статистически анализ	60
V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ	62
5.1 Морфология и цитоархитектоника на спиналното тригеминално ядро	62
5.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро	62

5.1.2 Морфологични видове неврони в спиналното тригеминално ядро.....	68
5.1.2.1 Ладиевидни неврони	69
5.1.2.2 Удължени неврони.....	69
5.1.2.3 Лобулирани неврони	69
5.1.2.4 Неврони с дилатирани аксонални хълмчета	69
5.1.2.5 Пирамидни неврони	71
5.1.2.6 Овални (зърнести) неврони.....	71
5.1.2.7 Полиморфни (мултиморфни) неврони	72
5.1.3 Морфометричен анализ на невроните в спиналното тригеминално ядро.....	73
5.2 Неврохимична характеристика на спиналното тригеминално ядро.....	78
5.2.1 Невротрансмитери и невропептиди в спиналното тригеминално ядро.....	78
5.2.1.1 Гама-аминомаслена киселина	78
5.2.1.2 Ацетилхолин	81
5.2.1.3 Серотонин (5-хидрокситриптамин).....	84
5.2.1.4 Субстанция Р	87
5.2.1.5 Калцитонин ген-свързан пептид.....	90
5.2.1.6 Невропептид Y.....	93
5.2.2. Газови невромодулатори	96
5.2.2.1 Азотен оксид.....	96
5.2.3. Невротрофни фактори и техните рецептори	99
5.2.3.1 Невронален растежен фактор.....	99
5.2.3.2 Мозъчен невротрофен фактор (BDNF)	102
5.2.3.3 Невротрофин-3	104
5.2.3.4 Глиален невротрофен фактор.....	106
5.2.3.5 Тропомиозин рецепторна киназа-А.....	108
5.2.3.6 Тропомиозин рецепторна киназа-В.....	110
5.2.3.7 Тропомиозин рецепторна киназа-С.....	112
5.2.3.8 Глиален рецептор $\alpha 1$	114
5.2.4 Обобщение върху неврохимичната анатомия на спиналното ядро.....	118
VI. О Б С Ъ Ж Д А Н Е.....	121
6.1 Структурна организация на спиналното тригеминално ядро	121
6.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро	121
6.1.2 Видове неврони в спиналното тригеминално ядро	124
6.2 Химичен профил на спиналното тригеминално ядро.....	129
6.2.1 Невротрансмитери и невропептиди в спиналното тригеминално ядро.....	129

6.2.2 Газови невромодулатори	143
6.2.3. Невротрофни фактори и техните рецептори	147
6.3 Ограничения на проучването.....	158
6.4 Бъдещи насоки и перспективи	162
VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	168
VIII. ИЗВОДИ	170
IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	171
X. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД..	173
XI. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	174
XII. БИБЛИОГРАФИЯ.....	175
SUMMARY	210

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПНС	периферна нервна система
ХЕ	хематоксилин и еозин
ЦНС	централна нервна система
5-НТ	5-хидрокситриптамиин
АВС	авидин-биотин пероксидаза комплекс
АChE	ацетилхолинестераза
АМРА	α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова киселина
АТР	аденозин трифосфат
ВChE	бутирилхолинестераза
BDNF	мозъчен невротрофен фактор
CGRP	калцитонин генно-свързан пептид
CLR	рецептор, подобен на калцитонинов рецептор
CNV	пети черепномозъчен нерв, <i>nervus trigeminus</i> (троичен нерв)
CNV1	<i>nervus ophthalmicus</i> (очничен нерв)
CNV2	<i>nervus maxillaris</i> (горночелюстен нерв)
CNV3	<i>nervus mandibularis</i> (долночелюстен нерв)
CNVII	седми черепномозъчен нерв, <i>nervus facialis</i> (лицев нерв)
CN IX	девети черепномозъчен нерв, <i>nervus glossopharyngeus</i> (езиково-гълтачен нерв)
CNX	десети черепномозъчен нерв, <i>nervus vagus</i> (блуждаещ нерв)
GABA	гама-аминомаслена киселина (ГАМК)
GAD	декарбоксилаза на глутаминовата киселина
GDNF	глиален невротрофен фактор
GDR α 1	глиален рецептор α 1
KCC2	K ⁺ /Cl ⁻ котранспортер
NADPH	никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат
NGF	невронален растежен фактор

NKCC1	Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻ котранспортер
NMDA	N-метил-D-аспартат
nNOS	невронална азотен оксид синтаза
NO	азотен оксид
NPY	невропептид Y
NT-3	невротрофин 3
NT-4	невротрофин-4
p75NTR	невротрофинов рецептор p75
PBS	фосфатно-буфериран разтвор
PPT-A	протахикинин-A
PRiMA	богата на пролин мембранна котва
PYY	пептид YY
RAMP	протеин, модифициращи активността на рецепторите
SP	субстанция P
SpV	спинално тригеминално ядро
SpVc	каудално подядро на спинално тригеминално ядро
SpVi	интерполарно подядро на спинално тригеминално ядро
SpVo	орално подядро на спинално тригеминално ядро
SSADH	сукцинова семиалдехидна дехидрогеназа
TCA cycle	цикъл на трикарбоксилните киселини
TNF	туморен некротичен фактор
TPH	триптофан хидроксилаза
TrkA	тирозин киназа A
TrkB	тирозин киназа B
TrkC	тирозин киназа C
VGLUT2	везикуларен глутаматен транспортер 2
VPM	<i>nucleus ventralis posteromedialis thalami</i> (вентрално постеромедиално таламично ядро)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Спиналното тригеминално ядро (SpV) е едно от сетивните ядра на тригеминалния нерв, петият черепномозъчен нерв (CN V). Този нерв е най-големият от всички черепномозъчни нерви. Името му (*trigeminal* = tri-, три и- лат. *geminus*, близник: трима близнаци) произтича от факта, че този нерв има три основни клона: очничен нерв, *nervus ophthalmicus* (CNV1), горночелюстен нерв, *nervus maxillaris* (CNV2) и долночелюстен нерв, *nervus mandibularis* (CNV3). Очничният и горночелюстният нерв са чисто сензорни, докато мандибуларният нерв притежава както двигателни, така и сетивни функции (Bradley, 2014).

Спиналното тригеминално ядро се подразделя анатомично в ростро-каудална посока на три подядра, означавани съответно като орална, интерполарна и каудална част. Първата от тях се асоциира с трансмисията на дискриминативни (фини) тактилни усещания от орофациалната област и е продължение на основното сетивно ядро на *nervus trigeminus*. Интерполарното подядро също е свързано функционално с трансмисията на допирна информация и зъбната болка, докато каудалното подядро предава болковите стимули и температурните усещания от главата.

Изследванията върху спиналното тригеминално ядро през последните години са фокусирани главно върху изясняване на неговата структура, функционална организация и соматотопия като важна интегрална част от тригеминалния сетивен ядрен комплекс. От друга страна, неврохимичните изследвания върху опитни животни установяват присъствие на широк спектър от ендогенни невроактивни лиганди като например класически невротрансмитери, газови трансмитери, невропептиди и модулатори в невроните в спиналното тригеминално ядро, което представлява забележителна особеност за тях. Тези изследвания конкретно са доказали наличието на химични посредници като серотонин, гама-аминомаслена киселина, допамин, норадреналин и глутамат в спиналните тригеминални неврони (Grzanna et al., 1987; Bereiter and Gann, 1988; Costa, 1994; Viggiano et al., 2004; Liu et al., 2019). Освен тези класически медиатори, в невроните на спиналното

тригеминално ядро и техните израстъци е установено наличието и на някои невроактивни пептиди като субстанция Р, енкефалин и неuropeптид Y (Hökfelt et al., 1977; Priestley et al., 1982; Chronwall et al., 1985).

Настоящото проучване привежда подробни данни за структурните особености на спиналното тригеминално ядро у плъх, дава обширна представа за неговата цитоархитектоника и разширява наличното познание за невротрансмитерния профил на невроните в трите му подядра с акцент върху изясняване на техните функционални модалности.

II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1 Възникване на представите за сетивната природа на тригеминалния нерв

Първият учен, който описва сетивна функция на тригеминалния нерв в началото на XIX век, е френският физиолог и анатом, *François Magendie*, с което той допринася за разкриване природата на тригеминалната невралгия и локализиране на анатомичното място на болката при нея. Наред с него, сред основните визионери, свързващи анатомичните особености на петия черепномозъчен нерв с неговите модалности, са *Herbert Mayo* и *Charles Bell* (Tubbs et al., 2008).

Основавайки се на находките в своя труд, публикуван през 1811 година, *Charles Bell* предлага специфична „нова организация“ на периферните нерви, оригинално означени от него като прости, сдвоени, симетрични нерви, които присъстват във всички еволюционни нива на организмите, а също описва и добавени нерви, които извършват допълнителни функции с нарастваща сложност, пропорционална на видовата йерархия (Bell, 1821; Berkowitz, 2014). Наблюдавайки преплитащата се мрежа, изградена от петия и седмия черепномозъчен нерв около лицевата мускулатура, *Bell* твърди: „Ако част или орган имат много различни нерви, може да сме сигурни, че вместо да акумулира само нервна сила, той притежава ясно изразени сили или влиза в различни комбинации, пропорционални на броя на нервите си“ (Bell, 1821). *Bell* счита и че лицевите мускули са двойно инервирани от петия и седмия краниален нерв и посочва, че "при това широко разпространение нервът (седмия) прониква във всички мускули на лицето: мускулите са снабдени също от клоновете на петата двойка (черепномозъчни нерви)" (Bell, 1821). Нещо повече, авторът прозира, че петият черепномозъчен нерв контролира волево движението на лицето и неговата сетивност, а седмият нерв е отговорен за координацията на лицевата мускулатура с дишането и неволното изразяване на емоцията.

В трактата си от 1821 г. *Bell* заявява, че тази оригинална невронална система включва „*нервите на гръбначния стълб, десетия краниален нерв или субокубиталния нерв, както и петия нерв, наречен тригеминус*“ (Bell, 1821). Той доразвива своята идея с твърденията, че: „*всички тези нерви са чифтни при наличните съществени обстоятелства; всички те имат двоен произход; всички те имат ганглии на един от корените си; те излизат странично към определени отдели на тялото; те не си пречат да обединят разклоненията си; всички те са мускулни нерви, които координират волеви движения; всички те са изцяло волеви; и са източникът на общата чувствителност на повърхностите на тялото: когато са точно представени на схема, те се виждат като проникващи във всяка част (на тялото)*“ (Bell, 1821).

Заедно с гореописаните прости, сдвоени, симетрични нерви, в новата организация, която *Bell* представя, се въвеждат и добавените нерви, които са дихателните нерви „*които свързват вътрешните органи на дишане с чувствителността на отдалечените части (на тялото) и с дихателните мускули, и се отличават от онези (първоначални нерви) (...). Те не възникват от двойни корени; те нямат ганглии по произход; те излизат от продълговатия мозък и горната част на гръбначния мозък; и от този произход те (...) са свързани с движенията при дишането*“ (Bell, 1821). Основните дихателни нерви, оригинално описани от *Bell*, включват *par vagum* (пневмогастричен нерв); респираторен нерв на лицето (*portio dura*); горен дихателен нерв на туловището (допълнителен нерв); голям вътрешен респираторен нерв (или *nervus phrenicus*); и външен дихателен нерв (дълъг гръден нерв) (Bell, 1821) .

При по-нататъшно изясняване на функцията и връзката между тези две системи чрез анатомични изследвания и експерименти, *Bell* заявява, че дихателният нерв на лицето инервира устните, ноздрите и мекото небце; служи за разширяване на мембранните тръби, за да се движат свободно по време на дишане (Bell, 1821). Той обяснява как неволното движение на лицето от емоции се медира от дихателната система. *Bell* посочва че троичният нерв е нервът на вкуса, на

слюнчените жлези, на мускулите на лицето и челюстта и на тяхната сетивност, притежавайки клонове, които влизат във всички мускули, особено към мускула, който движи устните по зъбите, *m. orbicularis oris* (Bell, 1821). В описанието си *Bell* неправилно заявява, че чрез нерва на *chorda tympani* клоновете на дихателния нерв на лицето имат достъп до мускулите на небцето, за да координират дишането, а не да пренасят информация за вкуса от езика (Bell, 1821).

В същото време в своите проучвания *Herbert Mayo* прилага вивисекции, вярвайки, че те са крайъгълен камък на физиологичните открития, свързани с нервната функция (Bell, 1821). Чрез поредица от остроумно планирани и добре описани опити, той съобщава, че срязването на *nervus trigeminus* води до загуба на чувство и причинява болка, но не променя позицията на устните над зъбите (Mayo, 1823). Освен това, според него срязването на *portio dura* (седмия черепномозъчен нерв) над *musculus masseter* причинява парализа на устните и носа без загуба на чувствителност, а прищипването на дисталния му край води до конвулсия на мускулите на устните и ноздрите (Mayo, 1823). След като подробно описва резултатите от шест отделни експеримента, в коментара си от 1822 г. *Mayo* пише: „От предходните експерименти заключавам, че *portio dura* е прост нерв на волевото движение; и че челният, инфраорбиталния и долния максиларен са само нерви на усещането; те са клонове на петия нерв (...) и (...) че други клонове на третото разделение на петия нерв са волевите нерви към *musculi pterygoideus, masseter, temporalis* и *buccinator*“ (Mayo, 1822). Една година по-късно в своя анатомичен и физиологичен коментар от 1823 г. *Mayo* излага отново своите предишни описания и заключения, с изключение на забелязаната грешка, че двигателната функция на *musculus buccinator* се предава изключително чрез *portio dura* (Mayo, 1823).

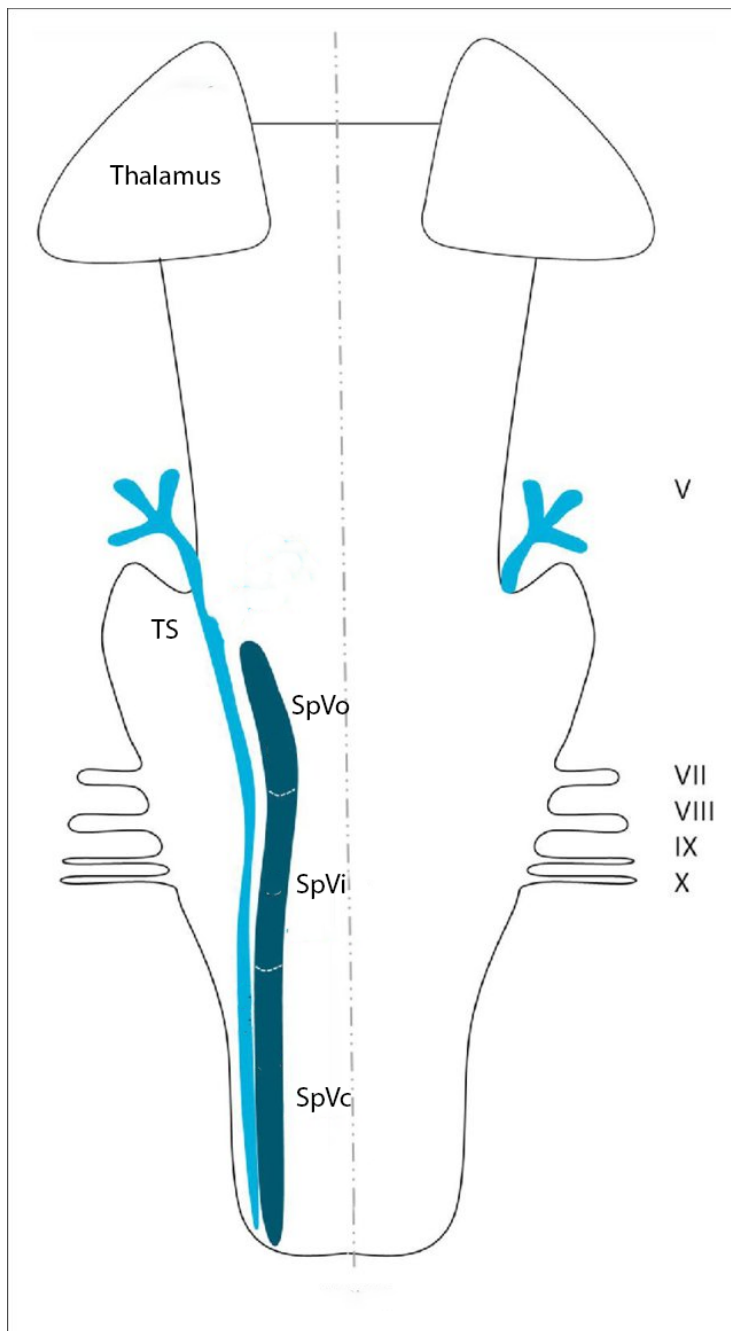
В двете си дисертации, *Mayo* отхвърля становището на *Bell* за добавените дихателни нерви, показвайки чрез експерименти, че всъщност те не се различават от първоначалните симетрични нерви, от които *Bell* ги разграничава (Mayo, 1823). Той допълнително опровергава хипотезата на *Bell*, че „лека парализа на мускулите от едната страна на лицето“ (т.е. частична парализа на лицевия нерв) се развива,

когато дихателният нерв на лицето е засегнат и дори увреден, което засяга движения, свързани с мимики на лицето като усмихване (Bell, 1821; Mayo, 1823).

2.2 Морфология на спиналното тригеминално ядро

Преди публикуване на изследванията на *Olszewski* (1950) върху спиналното тригеминално ядро се е смятало, че то представлява непрекъсната надлъжна структура, която е директно продължение на задните рога на гръбначния мозък, достигайки до главното сетивно ядро на петия черепномозъчен нерв в моста. Този начин на представяне на спиналното тригеминално ядро с подчертана еднородност в структурата е давал основание на изследователите да се предполага, че цялото ядро притежава униформеност и във функцията си. Благодарение на данните на *Olszewski*, получени от изследване на експериментален материал от човек и представители на коткоподобни маймуни, макаци резус, *Macaca mulatta* понастоящем е ясно, че ядрото може да се раздели на три лонгитудинални части. Автентично той ги нарича „*spinalis, medullaris, and pontina*”, които съответстват на каудалното, интерполарно и орално подядро на спиналното тригеминално ядро (Olszewski, 1950).

По-конкретно *Olszewski* демонстрира, че непосредствено на нивото на кръстосването на пирамидите присъстват три подядра (схематично представени на фигура 2.1). В най-каудалното ядро, *subnucleus caudalis* (SpVc), *Olszewski* описва три части, които са съставени от различни групи неврони. Невроните в първата група са описани като малки, овални, плътно подредени клетки. Той назовава оригинално тази част на спиналното тригеминално ядро *subnucleus gelatinosus*, воден от идеята, че *substantia gelatinosa* от задните рога на гръбначния мозък продължава в спиналното тригеминално ядро без забележима граница. В него невроните са малки по размери, вариращи от 7 до 20 микрометра. Втората група нервни клетки включва мултиполарни неврони, подредени в три класа в зависимост от големината на техните тела, а частта, в която те са разположени, е назована *subnucleus magnocellularis*. Според размерите си невроните тук са описани от *Olszewski* като



Фигура 2.1. Сагитален разрез на мозъчния ствол на плъх. Невроанатомично представяне на спиналното тригеминално ядро и черепномозъчните нерви в мозъчния ствол на плъх.

Тази фигура разширява нашите представи и разбирането ни за тънкостите на сетивната обработка в мозъчния ствол, като предлага цялостно невроанатомично представяне на спиналното тригеминално ядро и пространственото му съотношение с важни черепномозъчни нерви. Както е видно от фигурата, спиналното тригеминално ядро е разделено на три отделни подядра, които се означават като каудално (SpVc), интерполарно (SpVi) и орално (SpVo). Използвани са анотации, за да се подчертае

относителното разположение на тези подядра в целия мозъчен ствол. Представен е също хода и разклоненията на tractus spinalis nervi trigemini (TS), както и редица други структури в централната нервна система, които са близо до SpV са свързани функционално с неговите подядра – тригеминален нерв (V), лицев нерв (VII), слухово-равновесен нерв (VIII), езиково-гълтачен нерв (IX), блуждаещ нерв (X) и таламус, thalamus. Адаптирана фигура от Henssen et al. (2016).

малки клетки с размери от 10 до 25 микрометра, средни по размери клетки от 15 до 30 микрометра и големи клетъчни елементи с размери между 20 и 35 микрометра.

В третата група се описват по-малобройни, но големи мултиполарни неврони с дебели и дълги дендрити (Olszewski, 1950). Тази част първоначално е описана от автора като *subnucleus marginalis*, която граничи с латеродорзалната повърхност на *subnucleus gelatinosus*. Размерите на клетките се дефинират в границите от 20 до 30 микрометра. Olszewski също счита, че *nucleus magnocellularis* е пряко продължение на *nucleus proprius*, а *subnucleus marginalis* – на постеромаргиналните клетки от задния рог на гръбначния мозък.

В същото изследване, *subnucleus interpolaris* (SpVi) е описано като униформна структура, съставена от два вида клетъчни елемента – малки и големи невронални групи, които са овални, вретеновидни или триъгълни по форма, като големите неврони (до 40 микрометра) са спорадични. Малките или средни неврони притежават размери от 12 до 15 микрометра и от 25 до 30 микрометра, респективно. Olszewski описва изцяло нова цитоархитектоника на ядрото, подчертавайки че трите подядра постепенно се размиват и изчезват като се заместват от клетъчна материя, която не може да бъде подразделена в субядра.

От своя страна, *subnucleus oralis* (SpVo) представлява съвкупност от малобройни и големи по размери неврони. Olszewski показва, че междинното подядро, *subnucleus interpolaris*, не достига до равнището на основното сензорно ядро на тригеминалния нерв, като от това ниво нагоре е налице новата клетъчна организация на третата, най-рострално разположена част на спиналното тригеминално ядро. Клетките тук са описани като триъгълни, тънки по форма, плътно подредени и без конкретно разположение, със сравнително дълги дендрити. Размерите им варират от 12 до 25 микрометра.

Резултатите на Olszewski явно показват наличие на морфологични и цитоархитектонни прилики на спиналното тригеминално ядро със задния рог на гръбначния мозък. Приблизително по това време (50-те години на миналия век) Rexed представя работата си по разделянето на гръбначния мозък на успоредни

пластинки и въвежда ламинарния строеж на сивото мозъчно вещество в гръбначния мозък (Rexed, 1952, Rexed 1954).

Този концептуално нов принцип на цитоархитектониката в сивото вещество на гръбначния мозък разделя клетките на девет паралелни ивици, в зависимост от вида и гъстотата на разпределение на невроните в тях. Първите шест от тези пластинки се разполагат в задния рог. Според *Rexed lamina I* е тънък клетъчен слой, покриващ горната част на задния рог и отговарящ на неговия връх. Изградена е от равномерно разпределени клетки, сред които се срещат т. нар. *cellulae marginales*. Странично първият слой се огъва около върха, за да покрие също страничната страна на задния рог. Този страничен завой е характерен за първите три слоя. *Lamina II* е много по-дебел слой от първия, но със същото топографско отношение към задния рог. Тази ламина отговаря на *substantia gelatinosa*. *Lamina III* и *lamina IV* заемат по-голямата част от задния рог, ангажирайки неговата шийка и основа. Те включват *nucleus proprius cornu dorsalis* и големите клетки на задния рог на гръбначния мозък. Третият и четвъртия слой според *Rexed* се различават един от друг по вида на своите нервни клетки. Третият слой е изграден само от малки клетки, докато *lamina IV* съдържа малки, средни и големи клетки.

Изхождайки от цитоархитектонното описание на гръбначния мозък, *Rexed* продължава обследването в краниална посока, като на свой ред обрисова спиналното тригеминално ядро, което той нарича медуларен дорзален рог (*medullary dorsal horn*), представляващо роstralно продължение на задния рог на гръбначния мозък.

2.3 Неврохимия на спиналното тригеминално ядро

Спиналното тригеминално ядро е важен компонент на краниофациалната сензорна система, която е отговорна за обработката на сетивната информация от главата и лицето. Описаният досега неврохимичен състав на ядрото е многостранен и участва активно в предаването и модулацията на сетивните усещания от устно-лицевата област. В тази връзка, детайлното разбиране на неврохимичната природа на

спиналното тригеминално ядро, включително на неговите невротрансмитерни системи и ролята им в краниофациалната сензорна обработка, е от съществено значение за разбиране на функционалните механизми на орофациалната сетивност.

Спиналното тригеминално ядро изобилства от невротрансмитерни системи, които играят значителна роля в сетивната обработка. Невротрансмитерният спектър на ядрото включва класически трансмитери – аминокиселини и биогенни амини, невроактивни пептиди и газове невромодулатори. Понастоящем в ядрото е описано наличие на невротрансмитерни аминокиселини като глутамат, който е най-разпространеният възбуждащ невротрансмитер в мозъка, и гама-аминомаслена киселина (GABA), основният инхибиторен невромедиатор в централната нервна система (ЦНС), като те регулират в синергия баланса на възбуждащите и инхибиращите сигнали в спиналното тригеминално ядро. Освен това, наличието на биогенни амини, включително серотонин (Beitz, 1982; Costa et al., 1994), и катехоламините допамин (Liu et al., 2019) и норадреналин (Brentegani and Lico, 1982), допринася за сложната обработка на сетивната информация.

От друга страна, невропептидите са важни участници в краниофациалната сензорна обработка в SpV. Субстанция P (Hökfelt et al., 1977; Priestley et al., 1982), калцитонин генно-свързан пептид (CGRP) (Eftekhari and Edvinsson, 2011), и невропептид Y (NPY) (Chronwall et al., 1985; Dumont et al., 1992) са сред описаните в ядрото невроактивни пептиди, които модулират предаването на болка и сетивни усещания. Тези невропептиди взаимодействат с другите невротрансмитерни системи, като влияят върху възприемането на краниофациалната болка и други сетивни възприятия в устно-лицевата област.

2.3.1 Невротрансмитери и невромодулатори

2.3.1.1 Гама-аминомаслена киселина

Гама-аминомаслената киселина (GABA) играе централна роля в теорията на невронния контрол, откакто е открита за първи път през 1950 година (Roberts, 1986;

Jellinger, 2001). Тя е основният инхибиторен невротрансмитер в човешката ЦНС, като конкретно е установено, че GABA служи като основен инхибиторен невротрансмитер при 20% до 44% от кортикалните неврони в мозъка (DeFelipe, 1993).

GABA се образува от алфа-декарбоксилирането на глутамат от декарбоксилазата на глутаминовата киселина (glutamic acid decarboxylase, GAD) и се метаболизира до сукцинат чрез последователното действие на ензимите GABA-трансаминаза (GABA-transaminase, GABA-T) и сукцинова семиалдехид дехидрогеназа (succinic semialdehyde dehydrogenase, SSADH). Смята се, че активността на GAD е основно отговорна за регулирането на концентрацията на GABA, готова за утилизация *in vivo* чрез зависимата от пиридоксал-5'-фосфат интерконверсия на активната (holo-GAD) и неактивната форма (apo-GAD) (Martin, 1993; Jellinger, 2001). Apo-GAD представлява най-малко 50% от общото количество GAD, налично в мозъка. Активирането на GAD се стимулира от неорганичен фосфат и се инхибира от аденозин трифосфат (АТР), GABA и аспартат. АТР насърчава образуването на apo-GAD и го стабилизира. При отсъствие на АТР, периодът на полуразпад на apo-GAD е няколко минути при 37°C (Petroff, 2002).

Синаптичните действия на GABA се прекратяват от системите за високоафинитетно поглъщане (GABA транспортери) на невроните и глиалните клетки (Merrill, 1996). GABA, поета от GABA-ергичен неврон, може да бъде преупакована в невротрансмитерни везикули (Jellinger, 2001). След като се катаболизира от GABA-T и SSADH, тя може да попълни междинните продукти в митохондриалния цикъл на трикарбоксилните киселини (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle), познат също като цикъл на Кребс (GABA шънт) (Petroff, 2002).

Рецепторите за GABA са мембранни рецептори, които реагират, когато GABA се освобождава в постсинаптичното нервно окончание. Те се считат за основните инхибиторни рецептори за ЦНС, където са повсеместно разположени (von Blankenfeld et al., 1991). GABA рецепторите се подразделят на GABA_A и GABA_B. GABA_A се класифицира като лиганд-зависим (ligand-gated) йонен канал и

представлява йонотропен рецептор, който медира ефектите на бързото синаптично инхибиране. При свързване на рецептора с GABA се отваря йонна пора, която позволява на хлорида да се придвижи през клетъчната мембрана. Хлоридът е отрицателно зареден йон и ще се насочи към зона с положителен заряд. Обикновено хлорните йони ще се влеят във вътреклетъчното пространство. Добавянето на отрицателен заряд ще намали потенциала на клетката в покой, като по този начин ще предизвика инхибиторен ефект.

GABA_B рецепторът е G-протеин свързан рецептор. GABA_B рецепторите се считат за бавни синаптични инхибитори. След като GABA се свърже с рецептора, калиевата проводимост се увеличава. Активира се аденилилциклазата, която предотвратява навлизането на калций и по този начин инхибира пресинаптичното освобождаване на други невротрансмитери. Местоположението на GABA_B включва таламичните пътища и мозъчната кора (Balasubramanian et al., 2004). Тези рецептори модулират синаптичното инхибиране и имат ключово значение за GABA-ергичното сигнализиране.

Първите доказателства, че GABA се локализира в тригеминалните структури за предаване на сетивна информация, идват от работата на Szabat и сътрудници (1992) върху тригеминален ганглий на плъх (Szabat et al., 1992). По-нататъшните изследвания върху тригеминален ганглий на котка също показват, че някои неврони в този орган са имунореактивни на GABA (Stoyanova et al., 1998). Редица изследвания също така документират GABA-ергична инервация в тригеминален ганглий у морски свинчета (Turman and Chandler, 1994), котки (Lazarov and Chouchkov, 1995), плъхове (Coprav et al., 1990; Ginestal and Matute, 1993) и зайци (Kolta et al., 1990). Освен това е доказано, че регионите, които инервират мускулите за затваряне на челюстите у възрастни плъхове, включват GABAергични интерневрони (Ginestal and Matute, 1993). Предишни констатации предполагат, че подгрупа от по-малки клетки може да има GABAергичен характер, когато са разположени до големи неврони в мезенцефалното тригеминално ядро (Chouchkov and Lazarov, 1994; Lazarov and Chouchkov, 1995). Теорията, че малките по размери

GABA-ергични неврони могат да влияят върху дейността на по-големите неврони в това ядро на тригеминалния нерв, се подкрепя допълнително от това разположение.

В контекста на тригеминалната сетивна система, тригеминалната невропатична болка е един от най-често срещаните хронични болкови синдроми, чиято етиология все още не е известна. Напоследък се приема, че в патогенезата на невропатичната болка са замесени катион-хлоридни котранспортери (cation–chloride cotransporters, CCC) (Price et al., 2005; De Koninck, 2007; Kahle et al., 2008). $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ котранспортерът (NKCC1) е въввлечен в складиране на Cl^- в клетката, докато K^+/Cl^- котранспортерът (KCC2) нормално извежда Cl^- извън клетката, като така те взаимно контролират невроналната Cl^- хомеостаза и модулират GABA-ергичната функция (Rivera et al., 1999; Delpire, 2000; Blaesse et al., 2009). Установеното трансинаптично изместване на градиента на Cl^- чрез намаляване на KCC2 в невроните на гръбначния мозък от *lamina I* като механизъм на невропатичната болка подсказва, че загубата на инхибиране (дезинхибиране) в дорзалния рог на гръбначния мозък е решаващ субстрат за синдромите на хроничната болка (Coull et al., 2003; Kahle et al., 2008; Price et al., 2009).

Независимо от приведените досега данни, че тригеминалната система използва GABA като невротрансмитер при обработката на сензорна и моторна информация, а KCC2 и NKCC1 се експресират в SpVc (Toyoda et al., 2005), малко се знае все още за подробния механизъм на GABA-ергичната ноцицептивна медиация в спиналното тригеминално ядро.

2.3.1.2 Ацетилхолин

Невротрансмитерът ацетилхолин е класически възбуден медиатор в мозъка с кратък ефект поради бързото му разграждането му от ензима холинестераза. Холинестеразите са серинови хидролази, които действат предимно върху холинови естери. Гръбначните животни притежават два типа холинестерази, съответстващи на два различни гена: специфична ацетилхолинестераза (AChE) и неспецифична бутирилхолинестераза (BChE). Тези два ензима се разграничават въз основа на

спецификата на субстратите и чувствителността им към селективни инхибитори (Mendel and Rudney, 1943; Austin and Berry, 1953). Основната функция на AChE е ефективно да хидролизира невротрансмитера ACh в холинергичните синапси (Massoulié, 2002), докато физиологичната функция на BChE при гръбначните животни остава предмет на различни спекулации (Xie et al., 2000; Duysen et al., 2001). Проучванията на AChE knockout мишки показват, че BChE може частично да компенсира липсата на AChE в нервната система; следователно BChE може да хидролизира ацетилхолин функционално (Chen et al., 2011).

При гръбначните животни генът AСHE произвежда няколко вида кодиращи последователности, различаващи се по алтернативния избор на местата за приемане на splice участък в 3' областта. Този процес генерира различни изоформи на AChE, наречени AChER, AChEH и AChET (Massoulié, 2002). Те съдържат един и същ каталитичен домейн, но са свързани с различни С-крайни пептиди (Chen et al., 2011). Молекулярните форми на AChET и BChET в мозъка и мускулите са от особен интерес, тъй като те са свързани с техните закотвящи протеини: колаген Q или богатата на пролин мембранна котва (proline-rich membrane anchor, PRiMA). Комплексите с ColQ представляват асиметричните (A) форми в мускулите (Krejci et al., 1997), докато комплексите с PRiMA представляват мембранносвързана тетрамерна глобуларна форма (G4), която се наблюдава главно в мозъка (Xie et al., 2009).

Наличието на AChE извън холинергичните синапси предполага, че този ензим може да участва във функции, различни от хидролизата на ACh. На тази ензимна активност се приписват много функции, включително способността ѝ да разцепва субстанция P (Chubb et al., 1980), енкефалини (Chubb et al., 1983) и амилоидния прекурсорен протеин (Small et al., 1991). Връзката между AChE и пептидазната активност, обаче, е много противоречива (Chatonnet and Masson, 1986).

Проведени са редица изследвания за разпределението и ултраструктурната локализация на AChE в ЦНС на възрастни гръбначни животни, включително в синапсите им (McDonald and Rasmussen, 1971; Brown and Palay, 1972; Csillik et al., 1973). Проучванията на *Westrum* и *Stevan* (1976) дават детайлна информация за

електронно-микроскопската локализация на AChE в спиналното тригеминално ядро на възрастна котка, според който местата, експресиращи AChE, са локализиращи в синаптичната цепка, както и върху пре- и постсинаптичните мембрани (Westrum and Broderson, 1976).

Въпреки изказаното хипотетично предположение на *Giacobini* от средата на миналия век, че някои първични аферентни неврони са холинергични (Giacobini, 1956), много изследвания не успяват да открият наличието на ензима AChE, който метаболизира ацетилхолин, в сетивните неврони на тригеминалната система (Butcher et al., 1993). Методи като имунохистохимия и ретрограден транспорт с хрянова пероксидаза бяха използвани за разкриване на холинергични проекции към мезенцефалното тригеминално ядро (Lai et al., 1993). За целта е прилагано също имунохистохимично маркиране за везикуларен транспортер на ацетилхолин за идентифициране на потенциални холинергични невронални клетъчни тела в мезенцефалното тригеминално ядро. Имунохистохимично доказване на синтезиращия ензим, холин ацетилтрансфераза е използвано за потвърждаване на холинергичния характер на тези клетъчни тела (Schäfer et al., 1998). Смята се, че невроните на мезенцефалното тригеминално ядро, които са положителни за холин ацетилтрансфераза, са мишени на норадреналинергични терминали, които произхождат от близките неврони в *locus coeruleus* (Lazarov, 2002).

Въпреки че има многобройни изследвания относно разпределението и активността на AChE в структурите на ЦНС, вкл. на ядра от тригеминалния сетивен ядрен комплекс, на различни видове (McDonald and Rasmussen, 1971; Brown and Palay, 1972; Westrum and Broderson, 1976; Satoh et al., 1983; Almond et al., 1996), все още няма налична информация за локализацията на активността на този ензим в подядрата на спиналното тригеминално ядро.

2.3.1.3 Серотонин (5-хидрокситриптамин)

Както в ЦНС, така и в периферните тъкани на животните, аминокиселината L-триптофан е основният източник на серотонин. Под катализиращото действие на ензима триптофан хидроксилаза (tryptophan hydroxylase, TPH) към L-триптофана се добавя хидроксил, за да се образува 5-хидрокситриптофан (5-HTP). Превръщането на L-триптофан в 5-HTP е ограничаващата скоростта стъпка в синтеза на серотонин (Lovenberg et al., 1967; Ichiyama et al., 1970). Съществуват две изоензимни форми на TPH – широко експресирана TPH1 и такава, намерена в ЦНС, TPH2 (Steinbusch, 1981). Въпреки че TPH1 се експресира главно в периферните тъкани като черва, кожа, епифиза и жлеза, има налични данни, че тази изоформа присъства и в ЦНС (Zill et al., 2009). По подобен начин TPH2 се открива и в областта на заложбата аорта-гонада-мезонефрос (aorta-gonad-mesonephros, AGM) на ембриони на zebrafish и мишки чрез RNA-seq и имунофлуоресцентен анализ (Zhang et al., 2015; Lv et al., 2017). Впоследствие 5-HTP се превръща в серотонин чрез процеса на декарбоксилиране, медиран от декарбоксилазата на ароматните аминокиселини (aromatic amino acid decarboxylase, AADC) (Lovenberg et al., 1967; Ichiyama et al., 1970). Освен в превръщането на 5-HTP в серотонин, AADC може да участва и в други реакции на декарбоксилиране, като например превръщането на L-dopa в допамин в допаминергични, норадренергични и адренергични неврони (Christie et al., 2014).

Понастоящем е прието, че мозъкът експресира 7 вида серотонинови (5-HT) рецептори (5-HT1-7), включващи общо 14 подтипа, въпреки че два от тези рецептори, 5-HT1e и 5-HT5b, запазват изписването си с малки букви и все още се класифицират като генни продукти, тъй като те все още не са свързани с функционален отговор в нативни клетки/тъкани. Всички подтипове 5-HT рецептори се срещат както в мозъка, така и в периферните тъкани, с изключение на рецепторите 5-HT1e, 5-HT2C и 5-HT6, за които има съобщения за ограничена експресия извън ЦНС. Също така са докладвани множество изоформи на някои 5-HT рецептори (по-

специално 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄ и 5-HT₇ рецептори), но фармакологичното и функционалното значение на това разнообразие остава неясно. Например чрез прилагане на тритирани лиганди е доказано, че 5-HT₂ рецепторният подтип е често срещан в мезенцефалното тригеминално ядро на зайци (Kolta et al., 1993; Cornea-Hébert et al., 1999). Установено е и, че мезенцефалните тригеминални неврони у морското свинче по идентичен път предават информация чрез 5-HT_{1D} рецептора (Bonaventure et al., 1997). Също така, в края на миналия век е доказано, че невроните в мезенцефалното тригеминално ядро на плъхове експресират 5-HT₃ рецептори (Morales et al., 1998).

Нещо повече, подобно рецепторно разнообразие е сравнимо с това на най-сложните невротрансмитерни системи, включително тези на глутамата и пурините. Въпреки тази сложност, понастоящем е позната широка гама от селективни агонисти, антагонисти и радиолиганди, насочени към специфични подтипове 5-HT рецептори и е изследвана тяхната локализация, сигнални свойства и функция в ЦНС (Sharp and Barnes, 2020).

След като биологичната функция на серотонина е осъществена, метаболизмът на серотонина ще се извършва от ензима във външната митохондриална мембрана моноаминооксидаза А (monoamine oxidase A, MAO-A) за генериране на 5-хидроксииндол оцетна киселина (5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA). 5-HIAA е метаболит на серотонина без никаква биологична активност (Shih et al., 1999; Singh et al., 1999), който се отделя от организма чрез бъбреците.

Голяма част от наличните доказателствата сочат, че 5-HT-съдържащите неврони в каудалната част на мозъчния ствол, особено тези в ростралния вентромедиален продълговат мозък, оказват аналгетично влияние върху обработката на соматосензорната информация, като освобождават 5-HT от своите низходящи аксони в дорзалния рог на гръбначния мозък (Basbaum and Fields, 1978, 1984; Fields and Basbaum, 1978; Besson and Chaouch, 1987; Fields et al., 1991). Добре известно е, че дорзалният рог на гръбначния мозък на плъха е силно инервиран с мрежа от влакна, притежаващи 5-HT-подобна имунореактивност (Steinbusch, 1981; Harding et

al., 2004), както и че 5-НТ-подобните имунопозитивни неврони, изпращащи проекционни влакна към дорзалния рог на гръбначния мозък на плъха, са разположени в роstralната вентромедиална част на продълговатия мозък и каудалната част на моста, включително в *nucleus raphe magnus*, *nucleus reticularis paragigantocellularis* и вентралните части на *nucleus reticularis gigantocellularis* (Jones and Light, 1990; Kwiat and Basbaum, 1992).

Считани за едни от най-значимите невротрансмитери или невромодулатори с широко разпространение в ЦНС, включително в невроните на мозъчния ствол при плъх (Dahlström, 1964) и котка (Poitras and Parent, 1978), са катехоламините допамин, норадреналин, адреналин и серотонин. Lazarov и Chouchkov (1995) установават, обаче, че, невроните на мезенцефалното тригеминално ядро са имунонегативни за тирозин хидроксилаза, но са заобиколени от имунореактивни нервни влакна, прилепени към повърхността им (Chouchkov and Lazarov, 1995; Lazarov and Chouchkov, 1995). Изглежда, че катехоламинергични нервни влакна въздействат върху невроните на мезенцефалното тригеминално ядро, вместо да използват катехоламини като потенциален невротрансмитер (Chouchkov and Lazarov, 1995).

За описанието на серотонинергичните неврони в спиналното тригеминално ядро, важен научен принос имат изследванията на Lin-Lian Li и сътрудници (Li et al., 1997). Изследователският екип проучва взаимовръзката между серотонинергичните аксонни терминали и ноцицептивните проекционни неврони в SpVc на плъх. Както бе отбелязано, SpVc, заедно с прилежащата му ретикуларна формация, често се нарича медуларен дорзален рог с оглед на близките му структурни и функционални връзки с дорзалния рог на гръбначния мозък (Li et al., 1997). Маргиналната зона (*lamina I*) и *substantia gelatinosa (lamina II)* на SpVc отговарят съответно на *lamina I* и *lamina II* на дорзалния рог на гръбначния мозък, а магноцелуларният слой на SpVc (*lamina III*) изглежда съответства на *lamina III* и *IV* или *ламина III-V* на дорзалния рог на гръбначния мозък според наблюденията на гореспоменатите изследователи (Dubner and Bennett, 1983; Moore and Moore, 1983; Li et al., 1997;). По-конкретно, същите автори установяват че в *lamina I* и *II* на SpVc на плъх се съдържат значителен

брой 5-НТ-подобни имунореактивни аксонални окончания, осъществяващи синаптични контакти с дендритни и соматични профили на неврони, които са били маркирани ретроградно с WGA-HRP (wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase), инжектирана в парабрахиялната или таламичната област (Li et al., 1997).

2.3.1.4 Субстанция Р

Субстанция Р е идентифицирана за първи път в началото на миналия век, като първоначално тя е изолирана от суров екстракт от мозъка и червата на еднокопитни животни и е установено, че има мощни хипотензивни и контрактилни свойства за гладката мускулатура (von Euler and Gaddum, 1931). Впоследствие *Gaddum u Schild* (1934) са нарекли това новоизолирано вещество субстанция Р, като буквата Р в наименованието на пептида се отнася до праха, получен след процедурата по екстракцията му (Gaddum and Schild, 1934). В следващите години пионерната работа на *Lembeck* (1953) довежда до предложението, че субстанция Р е невронален сензорен трансмитер, свързан с предаването на болка, поради високите концентрации на този пептид, установени в дорзалния рог на гръбначния мозък (Lembeck, 1953). Допълнителни доказателства за ролята на този пептид се появяват по-късно с изследванията на *Otsuka* и *Konishi* (1976), които показват че имунореактивността за субстанция Р е повишена в експериментален материал, взет от изолиран гръбначен мозък на новородени плъхове след прилагане на електрически стимули (Otsuka and Konishi, 1976). Експресията на субстанция Р е ограничена до ЦНС и периферната нервна система (ПНС). Днес е напълно признато, че субстанция Р се освобождава както от централните, така и от периферните окончания на първичните аферентни неврони и функционира като невротрансмитер (Erspamer, 1983).

Аминокиселинната структура на този ундекапептид е Н-arginine¹ -proline² -lysine³ -proline⁴ -glutamine⁵ -glutamine⁶ -phenylalanine⁷ -phenylalanine⁸ -glycine⁹ -leucine¹⁰-methionine¹¹- NH₂ и той е част от семейството на тахикинините (Erspamer,

1983), наред с неврокинин А (НКА) и неврокинин В, които имат една и съща карбоксилна терминална последователност – phenylalanine-X-glycine-leucine-methionine-NH₂, като означението Х е съответно фенилаланин или валин (Otsuka and Yoshioka, 1993). Структурната организация на субстанция Р изглежда силно зависи от използвания разтворител и липидната среда, в която се намира този пептид. В метанол структурата съдържа смес от β-завои, докато във вода има удължена верижна структура (Sumner et al., 1990). С помощта на ядрено-магнитна резонансна спектроскопия се установяват следните характеристики в химичната природа на субстанция Р: α-спирално ядро от Pro4 до Phe8, което се стабилизира от две водородни връзки между Phe7 -NH/Lys3 -CO, Phe8 - NH и Pro4 -CO; удължен силно гъвкав NH₂ терминал Arg1 -Pro2 -Lys3; и централен завой на Gly9, като по този начин COOH-терминалният амид влиза в контакт с -карбонилния О-атом на двата глутамина (Lavielle et al., 1988; Regoli et al., 1994). Субстанция Р при бозайниците произлиза от гена на протахикинин-А (protachykinin-A, PPT-A), който произлиза от общ ген-предшественик чрез дупликация (Carter and Krause, 1990). Генът PPT-A кодира и други тахикинини, включително неврокинин А, невропептид К (NPK) и невропептид гама (NP) (Carter and Krause, 1990).

В ЦНС експресията на NK1 рецепторите е най-висока в стриатума, включващ *nucleus caudatus-putamen* и *colliculus superior*, като умерени до ниски нива на NK1 рецептори се откриват в *colliculus inferior*, обонятелната луковица, хипоталамуса, хипокампа, *substantia nigra* и мозъчната кора, *septum*, хипоталамуса, средния мозък и дорзалния рог на гръбначния мозък (Shults et al., 1984; Dam and Quirion, 1986;). Напоследък за определяне на локализацията на NK1 рецепторите се използва нова техника чрез комбиниране на имунохистохимия с флуоресцентна и конфокална микроскопия. При тези изследвания се установяват доказателства, че субстанция Р може да предизвика интернализация на NK1 рецептори в неврони в *lamina I, II, X* и редица неврони в *lamina III-V* на гръбначния мозък (Drew et al., 1986).

По отношение на разпределението на субстанция Р в тригеминалната сетивна система работата на Tornwall и колектив (1994) дава информация за наличието на

този пептид в тригеминалния ганглий. Според тяхната работа около 10-20% от клетките на тригеминалния ганглий имат сходна и значителна имунореактивност както към субстанция Р, така и към NKA (Törnwall et al., 1994). Предишни имунохистохимични изследвания разкриват наличието на субстанция Р в първичните сензорни неврони на тригеминалния ганглий при бозайници, включително у плъх (Hökfelt et al., 1976), морско свинче (Lehtosalo et al., 1984), заек (Tervo et al., 1981), котка (Lazarov, 1994), маймуна (Ng et al., 1993) и човек (Del Fiasso et al., 1990). Също така, въпреки, че не открихме данни за имунопозитивност към субстанция Р на невроните на мезенцефалното тригеминално ядро, техните масивни перикариони са заобиколени от и минаващи в непосредствена близост до SP-имунореактивни нервни влакна според проучванията на *Chouchkov* и *Lazarov* (Chouchkov and Lazarov, 1995).

Начално картографиране на нормалното разпределение на субстанция Р имунореактивността в спиналното тригеминално ядро у котка прави екипът на *Drew* и сътрудници (Drew et al., 1986). Според техните резултати най-голяма интензивност на субстанция Р-подобна имунореактивност се наблюдава в SpVc и периобексовата област на SpVi. Моделът на наблюдаваната реакция за субстанция Р в спиналните тригеминални неврони се идентифицира основно с тънка луннообразна ивица по латералния периметър на SpVc (Drew et al., 1986). На практика моделите на разпределение на субстанция Р имунореактивност са изследвани в дорзалния рог на гръбначния мозък и в по-каудалните части на спиналното тригеминалното ядро, но не и по протежение на целия спинален тригеминален комплекс у плъх (Chan-Palay and Palay, 1977; Ljungdahl et al., 1978; Barber et al., 1979; Henry et al., 1980).

2.3.1.5 Калцитонин генно-свързан пептид

Калцитонин генно-свързан пептид (CGRP) е 37-аминокиселинен неврпептид, идентифициран през 1982 година (Amara et al., 1982). Той е пептид, който се произвежда в някои тъкани чрез специфичен алтернативен сплайсинг на калцитониновата информационна РНК (CGRP α). В други тъкани уникален ген

кодира специфична форма на CGRP (CGRPbeta), която се различава от CGRPalpha с една и три аминокиселини при плъхове и хора, съответно. И двете форми са широко разпространени в ЦНС и ПНС, и се намират във високи концентрации също и в ентэралната нервна система на стомашно-чревния тракт. Диапазонът на действие на CGRP е обширен и включва мощни вазодилаторни действия, директни йонотропни и хронотропни активности, както и действия в имунната система, а също и в ЦНС и ПНС (Russo and Hay, 2023). CGRP е член на генно семейство от шест сродни пептида: калцитонин, α -CGRP, β -CGRP, амилин, адреномедулин и адреномедулин 2 (известен също като интермедин) (Hay et al., 2018).

В семейството на CGRP двата най-близко свързани пептида са α -CGRP и β -CGRP. Изоформите α - и β - се експресират от два гена. Човешкият CALCA (Calca при гризачи) кодира α -CGRP, който често се нарича просто CGRP. Човешкият CALCB (Calcb при гризачи) кодира β -CGRP и се различава от α -CGRP само по няколко аминокиселини в зависимост от вида. Пептидите на α - и β -CGRP имат почти неразличими функционално активности, но се регулират различно и се експресират по припокриващ се модел (Amara et al., 1985; Muddhrry et al., 1988; Russo et al., 1988). Въпреки че понякога β -CGRP се нарича ентэрална форма на CGRP, това определяне е подвеждащо, тъй като както α -, така и β -CGRP се срещат в стомашно-чревния тракт, а и двата се намират в ЦНС. Всъщност, като се има предвид припокриването на експресията и неспособността на всички настоящи антисеруми да разграничат α - от β -CGRP, възражението на почти всички проучвания върху CGRP е, че наистина не знаем относителния принос на единия ген спрямо другия (Russo and Hay, 2023).

Във връзка и с оглед на разпределението на CGRP в нервната тъкан, понастоящем е известно че в дорзалния рог на гръбначния мозък CGRP може да засили предаването на глутамат чрез пресинаптични механизми, които водят до централна сенсублизация (Marvizón et al., 2007; Seybold, 2009). Съобщава се, че CGRP рецепторът се намира върху пресинаптичните влакна и в клетъчните тела на някои неврони (Gu and Yu, 2007; Marvizón et al., 2007). Освен това днес се знае, че функционално CGRP подпомага трафика на глутаматните рецептори от класа на α -

амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовата киселина (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) към клетъчната повърхност и потенцира ефектите на субстанция P както върху AMPA рецепторите, така и върху глутаматните рецептори от класа на N-метил-D-аспартата (N-methyl-D-aspartate, NMDA) (Seybold, 2009). По този начин CGRP може потенциално да доведе до централна сенсibiliзация, като такава се наблюдавана след интратекално инжектиране на CGRP, което причинява механична алодиния (Marquez de Prado et al., 2009). В допълнение към описания ефект на действие върху глутаматните рецептори, за CGRP се съобщава също, че той въздейства съвместно с везикуларния глутаматен транспортер VGLUT2 в гръбначния мозък, като по този начин насърчава топлинната хипералгезия, болката и сърбежа при мишки (Rogoz et al., 2014a, b).

В литературата са налице редица данни, доказващи че невроните в тригеминалния ганглий съдържат този пептид у много животински видове, включително плъхове (Lee et al., 1985), морски свинчета и маймуни (Terenghi et al., 1985), котки (Lazarov, 1995), хора (Terenghi et al., 1985; Hanks et al., 1986). Според тези изследвания приблизително 35% до почти 50% от клетките при плъхове и човек са CGRP имунореактивни и те представляват малки по размер, предимно кръгли или с овална форма неврони (Lee et al., 1985; Terenghi et al., 1985). От друга страна, изследванията върху плъхове (Coprav et al., 1990) и пилета (Scott et al., 1994) не откриват имунопозитивни неврони за CGRP в интактно мезенцефално тригеминално ядро, а само следи от имуноположителност са наблюдавани в нервни влакна и техните окончания в същото ядро на котки (Lazarov, 1995).

От сравнително скоро е известно, че освобождаването на CGRP в тригеминалните неврони е свързано с контрола на мозъчния съдов тонус и той играе важна роля при мигрена (O'Connor and Van der Kooy, 1988; Edvinsson et al., 2012). По тази причина в момента се проучват лекарства, насочени към CGRP, които да се използват клинично за лечение на мигрена. Първият непептиден антагонист на CGRP, BIBN 4096 BS, е показал ефективност при животни и хора (Doods et al., 2000; Olesen et al., 2004). Понастоящем в процес на разработване са терапии, включващи

редица моноклонални антитела и антагонисти на CGRP, които показват добра ефикасност при мигрена.

2.3.1.6 Невропептид Y

Невропептид Y (neuropeptide Y, NPY) е 36-аминокиселинен пептид, изолиран и секвениран за първи път от мозъка на свиня през 1982 г., който е широко експресиран в ЦНС и ПНС на бозайниците (von Euler and Gaddum, 1931). Този неvroактивен пептид, заедно с пептид YY (peptide YY, PYY) и панкреатичния полипептид (pancreatic polypeptide), с които има съответно от 70% и 50% хомоложност на аминокиселинната последователност, съставляват така нареченото семейство NPY пептиди (Dumont et al., 1992). Сходството в последователността на трите молекули се изразява в обща U-образна, подобна на фуркет за коса, третична структура, състояща се от амфибилна α -спирала, свързана чрез β -завой с полипролиноподобна спирала тип II. Тази триизмерна структура определя афинитета и ефикасността, с които пептидите се свързват с многобройните си рецептори (Gaddum and Schild, 1934).

Биосинтезата на NPY включва транслация на молекулата pre-pro-NPY, която се пренася директно в ендоплазмения ретикулум, където се отстранява нейният сигнален пептид. След това прекурсорът pro-NPY се разцепва на NPY и C-терминален пептид на NPY (C-terminal peptide of NPY, CPON) от прохормон конвертази, а пептидът на NPY претърпява две последващи изрязвания (от карбоксипептидаза и пептидилглицин алфа-амидираща монооксигеназа), за да достигне зрялата и биологично активна форма на NPY. Тази крайна молекула се характеризира със C-крайната си амидация, която предотвратява разграждането ѝ от карбоксипептидазите (Lembeck, 1953).

В съответствие с широкото си разпространение в ЦНС и ПНС, NPY е замесен в много биологични ефекти и мозъчни разстройства, включително енергийна хомеостаза, затлъстяване и анорексия (Loh et al., 2015), тревожност (Heilig et al., 1993; Sørensen et al., 2004), епилепсия (Baraban et al., 1997; Woldbye et al., 1997),

депресия (Farzi et al., 2015), наркомания (Gonçalves et al., 2016), опиоидна абстиненция (Woldbye et al., 1998; Sørensen et al., 2004) и болка (Brumovsky et al., 2007; Arcourt et al., 2017). Интересно е, че повечето от тези разстройства се характеризират със споделяне на поведенчески и психологически компоненти.

До момента са клонирани пет различни рецептора на NPY при бозайниците: Y1, Y2, Y4, Y5 и у6 (Gerald et al., 1995, 1996; Gregor et al., 1996; Herzog et al., 1992; Larhammar et al., 1992; Rose et al., 1995). Въпреки че у6 е активен, функционален рецептор при мишки и зайци, той отсъства при плъхове, а функционалността му е загубена при хора поради делеция на една двойка бази (Gregor et al., 1996). Както NPY, така и PYU имат сходен профил на свързване с Y-рецептора (Lin et al., 2004), но въпреки това моделът на разпределение на всеки рецептор е различен.

Всички NPY рецептори са свързани с Gi/o протеин и по този начин оказват своето въздействие, като насърчават конформационни промени в свързаните протеини, които водят до активиране на няколко молекулярни пътя. Например пътят на митоген-активираната протеин киназа (mitogen-activated protein kinase, MAPK) може да бъде задействан при свързването на NPY, което води до инхибиране на активността на аденилилциклазата (Brumovsky et al., 2007) и следователно до намаляване на нивата на cAMP. Всъщност не е задължително свързването на NPY с неговия рецептор да задейства директно този път, а по-скоро непрякото трансактивиране на рецептора за инсулиновия растежен фактор (insulin growth factor receptor, IGFR), което води до активиране на ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 и 2) (Lecat et al., 2015). Това, в допълнение към модулацията на пътя на инозитол 1,4,5-трифосфата (inositol 1,4,5-triphosphate, IP3), води до модификации на вътреклетъчната концентрация на калций в неврона и следователно до промени в мембранния му потенциал (Brumovsky et al., 2007). Освен това, свързването на NPY с Y1 рецептора може директно да повлияе на вътреклетъчната концентрация на Ca²⁺ чрез активиране или инхибиране на невроналните Ca²⁺ канали от N- и P/Q-тип (Wang, 2005) и на Ca²⁺ каналите от R- и L-тип, както и на K⁺ каналите (Xiong and Cheung, 1995; Sun et al., 2001), докато действието му върху Y2 рецептора се

ограничава до модулиране на Ca^{2+} каналите от N- и P/Q-тип (McCullough et al., 1998; Wang, 2005).

В гръбначномозъчните ганглии NPY-подобната имунореактивност присъства, макар и с ниски нива на интензивност, с изключение на много малко на брой малки първични аферентни неврони (Wakisaka et al., 1992; Magnussen et al., 2015). Независимо от това, експресията на NPY след увреждане на периферните нерви е значително повишена в клетъчните тела с голям и среден диаметър на първичните сензорни неврони, чиито нервни влакна достигат до дорзалния рог на гръбначния мозък; явление, което е описано от няколко изследователски групи през годините (Wakisaka et al., 1992; Noguchi et al., 1993; Sten Shi et al., 1999; Benoliel et al., 2001; Hökfelt et al., 2007; Magnussen et al., 2015). Новият синтез на NPY може да се обясни като адаптивен отговор на индуцираната от хипералгезия възбуждаща сигнализация (Munzl et al., 1995).

В контекста на тригеминалната система по-малко от 1% от всички неврони в интактните тригеминални ганглии при котки съдържат NPY (Lazarov, 1995). Цитоплазмата на клетките с голям диаметър е единственото място, където се открива активна субстанция. След увреждане на тригеминалния нерв е доказано, че този пептид се регулира в субпопулациите неврони от тригеминалния ганглий със среден и голям размер. Това е особено забележимо в споменатите ганглии при плъхове. Многобройни изследвания освен това разкриха поразителна вариабилност в експресията на неврохимичните маркери, генерирани в невроните на мезенцефалното тригеминално ядро. Производството *de novo* на NPY заедно с други невроактивни съединения и техните мРНК е един от отговорите на невроните в мезенцефалното тригеминално ядро след прекъсването на нерва за *m. masseter* (Lazarov, 2002; Дандов, 2016).

През последните две десетилетия разработването на животински модели за артритна и невропатична болка, както и промените в генната експресия, свързани с тези модели, доведоха до разрастване на изследванията върху патофизиологичните невронални промени, които са в основата на хроничната болка (Taylor, 2005). Смята

се, че промените в генната експресия на пептидергичните невротрансмитери и рецептори на нивото на първичния аферентен неврон, дорзалния рог на гръбначния мозък и главния мозък водят до преминаване на увредения индивид от състояние на остра болка към състояние на хронична болка (Zhang et al., 1995). Основните кандидати включват невропептид Y и неговия рецептор NPY Y1 (Allen et al., 1984; Gibson et al., 1984; Ji et al., 1994; X. Zhang et al., 1997). И двата са силно експресирани на ключови места за предаване на болката, включително *lamina II* на дорзалния рог на гръбначния мозък (Mark et al., 1997; Mark et al., 1998; Abdulla and Smith, 1999; Moran et al., 2004; Miyakawa et al., 2005), и тъканното увреждане или лезиите на периферен нерв драматично променя профила на експресията им. Тези анатомични открития подчертават значението на системата на NPY за развитието на патологичната болка.

2.3.1.7 Азотен оксид

Азотният оксид (NO) е необичайна ендогенна сигнална газова молекула, която участва в различни процеси. Той контролира регулаторни функции като невротрансмисията (O'Dell et al., 1991) или съдовия тонус (Forstermann et al., 1986) (чрез стимулиране на NO-чувствителната гуанилилциклаза), регулира генната транскрипция (Khan et al., 1996) и транслацията на mRNA (Pantopoulos and Hentze, 1995), и предизвиква посттранслационни модификации на белтъците (напр. чрез ADP рибозилиране) (Pozdnyakov et al., 1993). Важен начин на инактивиране на NO е реакцията му със супероксидния анион ($O_2^{\cdot-}$), водеща до образуване на мощния оксидант пероксинитрит ($ONOO^{\cdot-}$). Това съединение може да причини окислително увреждане, нитриране и S-нитрозилиране на биомолекули, включително протеини, липиди и ДНК (Mikkelsen and Wardman, 2003). Нитрозативният стрес, причинен от $ONOO^{\cdot-}$, е свързан с прекъсването на една верига на ДНК, последвано от активиране на поли-АДП-рибоза полимераза (Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) (Ridnour et al., 2004).

При бозайниците NO може да се генерира от неговия прекурсор L-аргинин чрез ензима азотен оксид синтаза (NOS). Съществуват три различни изоформи на този ензим, които се означават като невронална nNOS (или NOS I), индуцируема iNOS (или NOS II) и ендотелна eNOS (или NOS III). Всички изоформи на NOS използват като субстрат L-аргинин, а като косубстрати молекулярен кислород и редуциран никотинамид-аденин-динуклеотид фосфат (nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate, NADPH). Флавин аденин динуклеотид (flavin adenine dinucleotide), флавин мононуклеотид (flavin mononucleotide) и (6R-)5,6,7,8-тетрахидро-L-биоптерин (BH4) са кофактори на всички изозими. Всички протеини на NOS са хомодимери.

Невроналната nNOS се експресира конститутивно в определени неврони на мозъка. Ензимната активност се регулира от Ca^{2+} и калмодулин. Мозъчната nNOS се намира в разтворима форма в клетките като диференцираната субклетъчна локализация на nNOS може да е отговорна за разнообразните му функции. Невроналната nNOS съдържа PDZ (модули за взаимодействие с протеини, разпознаващи аминокиселинни мотиви в C-края на таргетните си протеини, които регулират процеси като транспорт, сигнализация на йонни канали и други) домейн и може да взаимодейства директно с PDZ домейните на други протеини. Тези взаимодействия определят субклетъчното разпределение и активността на ензима (L. Zhou & Zhu, 2009) Освен в мозъчната тъкан, nNOS е идентифицирана чрез имунохистохимия в различни други тъкани и органи като гръбначния мозък, симпатиковите ганглии и надбъбречните жлези, в епителните клетки на различни органи, в *macula densa* на бъбрека, в клетките на Лангерхансовите острови в панкреаса, както и в гладката мускулатура на съдовете (Förstermann et al., 1994).

Наличието на nNOS в повърхностните слоеве на дорзалния рог на гръбначния мозък предполага, че NO има функции в сетивната и болковата обработка (Lam et al., 1996). Съществуват доказателства, че NO има ключова роля в хипералгезията и сенсибилизацията на сензорните неврони (Latremoliere and Woolf, 2009). Така например, след подкожно инжектиране на формалин в лапата на плъх броят на nNOS

положителните неврони се увеличава в ипсилатералния дорзален рог на съответния лумбален сегмент на гръбначния стълб (Hunt et al., 1988; Lam et al., 1996). Прилагането на инхибитор на NOS намалява активирането на c-fos, което предполага, че NO медира експресията на гена и участва в механизмите за контрол, влияещи върху ноцицепцията (Wang et al., 1999; Wu et al., 2000).

Основните аферентни неврони на тригеминалната система у котка произвеждат NOS, както периферно в своите нервни влакна, така и в своите перикариони. NOS-имунопозитивни неврони са наблюдавани в мезенцефалното тригеминално ядро и в тригеминалния ганглий (Lazarov and Dandov, 1998). Несъмнено няколко по-ранни открития показват широко разпространена експресия на nNOS-имунореактивност в тригеминалните ганглии при бозайници (Aimi et al., 1991; Tajti et al., 1999) както и при птици (Brüning et al., 1994) и влечуги (Brüning et al., 1994). Малките и средните по размер тела на невроналите клетки съставляват по-голямата част от тези, които произвеждат NOS (Lazarov and Dandov, 1998).

Що се отнася до спиналното тригеминално ядро, при използване на електрическа стимулация на тригеминалните влакна, разположени около горния сагитален синус в експериментален модел на съдова болка в главата при котка, е установено, че активирането на невроните от втори ред в SpVc намалява след предварително третиране с инхибитор на NOS (Hoskin et al., 1999). Подкожното инжектиране на нитроглицерин предизвиква активиране на c-fos, който представлява ген за ранен отговор, участващ в клетъчната пролиферация и диференциация след извънклетъчни стимули, и се използва като маркер за невронална активност, в невроните на тригеминалната система, подобно на това в различни други структури на мозъчния ствол и предния мозък (Tassorelli and Joseph, 1995). Смята се, че активирането на тези неврони се осъществява чрез първичния ефект на NO върху дребнокалибрените ноцицептивни тригеминални нервни влакна (Tassorelli et al., 1997).

2.3.2 Невротрофни фактори и техните рецептори

Като се има предвид неврохимичния им ефект, невротрофните фактори са в състояние да променят силата на невронните връзки чрез прецизна модулация на пресинаптичната активност, като директно засилват количественото освобождаване на невротрансмитери (Tyler et al., 2002) чрез два различни класа рецептори: рецепторното семейство на тирозин киназите (Trk) и невротрофиновия рецептор p75 (p75NTR), член на суперфамилията на рецепторите за туморния некротичен фактор (TNF) (Huang and Reichardt, 2001). Семейството на невротрофините включва нервния растежен фактор (nerve growth factor, NGF), мозъчния невротрофен фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), невротрофин-3 (neurotrophin-3/NT-3) и невротрофин-4 (neurotrophin-4, NT-4) (Skaper, 2012), известен също като невротрофин-5 (NT-4/5) (Ceni et al., 2014; Skaper, 2012). По-конкретно, NGF се свързва с висок афинитет към тропомиозин рецепторната киназа А (TrkA); BDNF и NT-4 се свързват с висок афинитет към тропомиозин рецепторната киназа В (TrkB), а NT-3 се свързва с висок афинитет към тропомиозин рецепторната киназа С (TrkC) (Pataroutian and Reichardt, 2001). Освен активирането на TrkC, NT-3 активира и TrkA и TrkB, макар и с по-нисък афинитет (Davies et al., 1995), а всички зрели невротрофни фактори се свързват с p75NTR с подобен афинитет (Ceni et al., 2014).

Невротрофините фактори участват в регулирането на оцеляването, невропластичността и поддържането на морфологията, растежа и развитието на невроните. Сред тях NGF се счита за съществен за тези функции (Khan and Smith, 2015; Kumar et al., 2017), но също така той е добре познат като медиатор на болката, сърбежа и възпалението (Ikoma et al., 2006; Pezet & McMahon, 2006; Indo, 2010), както и с незначителната си роля в антиноцицепцията (Diogenes et al., 2007). Освен това, BDNF играе роля в модулацията на ноцицептивната възбудимост (Boucher and McMahon, 2001; Takeda et al., 2013) и има незначително участие в антиноцицепцията (Eaton et al., 2002; Sarhan et al., 2013). От друга страна, NT-3 има предимно антиноцицептивна роля (Khan and Smith, 2015), а също и незначителна роля в про-

ноцицепцията (White, 1998; Zhou et al., 2000), докато NT-4 има строго проприоцептивна роля (Khan and Smith, 2015). Описани са и NT-6 и NT-7, но гените за тях са идентифицирани само при риби и вероятно нямат аналози при бозайниците (Götz et al., 1994; Nilsson et al., 1998). Сигнализирането на NGF-TrkA се свързва най-вече с повишаване на регулацията на transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) (Zhang et al., 2019), субстанция P, калцитонин генно-свързания пептид (CGRP) и някои натриеви канали (Khan and Smith, 2015). Сигнализацията на BDNF-TrkB оказва влияние върху няколко сигнални каскади надолу по веригата и насърчава активирането на N-метил-d-аспартат (NMDA) рецепторите и обратната регулация на калиево-хлоридния котранспортер 2, който е износител на калий и хлорид в невроните (Kitayama, 2018), и/или на GABA-ергичните инхибиторни сигнални механизми (Gupta et al., 2013).

Източникът на невротрофни фактори е хетерогенен и включва от таргентните органи на нервната система до самата нервна система. NGF се синтезира и секретира от симпатикови таргетни органи и от органи, инервирани сетивно (Korsching, 1993). Впоследствие той се улавя в нервните терминали чрез рецепторно-медирана ендоцитоза и се транспортира през аксоните до невроналните клетъчни тела, където действа за насърчаване на оцеляването и диференциацията на невроните. Освен това, много неврони също синтезират невротрофни фактори. Например, доказано е, че няколко популации от сетивни неврони синтезират BDNF (Brady et al., 1999; Mannion et al., 1999). И четирите невротрофни фактора и техните рецептори се синтезират в ЦНС, макар и на различни нива и с различно регионално разпределение (Nishio et al., 1994; Zhou and Rush, 1994; Sasi et al., 2017). В мозъка невроните се считат за основен клетъчен източник на невротрофни фактори, по-специално на BDNF (Hofer et al., 1990; Biane et al., 2014). Освен това е установено, че астроцитите (Fernández-García et al., 2020) и микроглиалните клетки са друг физиологичен източник на невротрофни фактори (Trang et al., 2009; Parkhurst et al., 2013; Sasi et al., 2017). Някои данни насочват към хипотезата, че BDNF може да действа по автокринен или паракринен начин в подкрепа на сетивните неврони на спиналните ганглии (Acheson

et al., 1995). В други случаи той може да се транспортира антероградно и да действа трансинаптично върху централните аферентни влакна на тези неврони в мозъка (Brady et al., 1999). Счита се, че NGF и други невротрофни фактори, синтезирани в увредени нерви, са от съществено значение за оцеляването и регенерацията им. И накрая, когато се експресира прекомерно в кожата, от телата на тригеминалните сетивни неврони се освобождава достатъчно NGF, получен от таргетния орган, за да поддържа аберантна инервация от симпатикови влакна, зависими от NGF (Walsh et al., 1999). По този начин при някои обстоятелства невротрофните фактори, осигурявани от една клетка, не само ефективно подкрепят невроните, чиито аксони се намират в близост до нея, но също така могат да осигурят подкрепа на по-отдалечени неврони чрез трансцелуларен транспорт.

2.3.2 Роля на неврохимичната сигнализация в краниофациалната сензорна обработка

Модулирането на входните сензорни сигнали в спиналното тригеминално ядро е изключително сложен и многостранен процес, който се управлява от взаимодействието на различни неврохимични елементи. Централно място в тази регулаторна парадигма заема ключовата роля на глутаматергичната сигнализация, която служи като основен канал за предаване на сетивна информация към висшите мозъчни центрове (Zhou and Danbolt, 2014). Сложната оркестрация на глутаматергичните процеси е от решаващо значение за оформянето на перцептивния пейзаж на сетивните стимули в спиналното тригеминално ядро.

В допълнение към кардиналната роля на глутамата, GABA-ергичната инхибиторна система заема позиция от първостепенно значение за усъвършенстване на предаването на сетивните сигнали (Schmidt-Wilcke et al., 2018). Чрез инхибиторната си модулация системата действа като проницателен пазач, упражнявайки щателен контрол върху потока от сетивна информация в спиналното тригеминално ядро. Това нюансирано инхибиторно въздействие допринася за фината настройка на сетивната рецепция и обработка, като по този начин повишава точността

и специфичността на възходящите сигнали към невронните структури от по-висок порядък.

Допълнителна сложност внася участието на неuropeптиди, по-специално субстанция P и CGRP, които активно участват в модуляцията на усилването на болката в краниофациалната област (Lee and Kim, 2007). Сложните взаимодействия между тези неuropeптиди формират ноцицептивните реакции в спиналното тригеминално ядро, като по този начин подчертават сложността на сензорната обработка в този невронен локус.

В конкретен план относно ролята на невроактивните пептиди, NPY се очертава като ключов модулатор, който внася допълнителен слой сложност в пейзажа на сетивната обработка в рамките на спиналното тригеминално ядро. Допуска се, че чрез своя предполагаем принос NPY играе съществена роля в модуляцията на възприемането на болката и емоционалните реакции, като по този начин добавя измерение на сетивните сигнали, преминаващи през ядрото (Diaz-del Castillo et al., 2018).

В обобщение, модуляцията на сетивните входни сигнали в спиналното тригеминално ядро е сложен и фино организиран процес, управляван от синергичните действия и антагонистичните действия на различни биоактивни субстанции на нивото на спиналното тригеминално ядро. Този сложен неврохимичен гоблен подчертава сложността, с която ядрото обработва сензорната информация, предлагайки цялостно разбиране на механизмите, лежащи в основата на усилването на болката и емоционалните реакции от краниофациалната област.

2.4 Функция на спиналното тригеминално ядро

Тригеминалният нерв се образува от два корена. По-големият от тях е сетивен и навлиза в мозъчния ствол на нивото на моста. Веднага в съседство със сетивния корен се намира по-малък моторен корен, който излиза от моста на същото ниво (Usunoff et al. 1997). Моторните влакна преминават през тригеминалния ганглий по

пътя си към лицевите мускули, но техните клетъчни тела се намират в моторното ядро на петия черепномозъчен нерв, разположено дълбоко в моста. Сетивността като една от основните модалности на тригеминалния нерв се представя по повърхността на лицето като отделни дерматоми. Областите на кожно разпределение (дерматоми) на трите клона на тригеминалния нерв имат остри граници с относително малко припокриване на инервираните зони, за разлика от дерматомите в останалата част на тялото, които имат значително припокриване (Brodal, 2010).

Първият клон на тригеминалния нерв, очничният нерв (CNV1) провежда сетивна информация от скалпа и челото, горния клепач, конюнктивата и роговицата на окото, носа (включително неговия връх, с изключение на *alae nasi*), носната лигавица, фронталните синуси и части от менингите (*dura mater* и кръвоносните съдове). Горночелюстният нерв (CNV2) носи сензорна информация от долния клепач и бузата, ноздрите и горната устна, зъбите на горната челюст и венците, носната лигавица, небцето и покрива на фаринкса, максиларните, етmoidните и сфеноидните синуси и части от менингите. Долночелюстният нерв (CNV3) предава сензорната информация от долната устна, зъбите на долната челюст и венците, брадичката и челюстта (с изключение на ъгъла на челюстта, която се доставя от C2-C3), части от външното ухо и части от мозъчните обвивки. Този нерв носи също усещания за пространствената позиция за допир и температурна болка от устата (Leblanc, 1992; Roda and Blanton, 1998; Singh, 2019). Въпреки, че не пренася вкусова информация (*chorda tympani* от *n. facialis* е отговорен за вкуса), един от неговите клонове, т.нар. езичен нерв, *nervus lingualis* носи информация за допир по езика (Brodal, 2010). Чрез него се пренася сетивна информация, осигуряваща тактилната, проприоцептивна и ноцицептивна сетивност на лицето и устата.

Освен наличието на общи соматични аферентни влакна, инервиращи кожата на лицето, тригеминалният нерв съдържа и висцерални еферентни аксони, който инервират дъвкателните мускули чрез мандибуларния нерв. Моторният компонент на мандибуларния клон (CNV3) на тригеминалния нерв контролира движението на осем мускула, включително четирите дъвкателни мускула, *musculus masseter*,

musculus temporalis, *musculus pterygoideus medialis* и *musculus pterygoideus lateralis*. Останалите четири инервирани от него мускула са *musculus tensor veli palatini*, *musculus mylohyoideus*, предното коремче на *musculus digastricus* и *musculus tensor tympani* (Martin, 2003).

Въпреки, че сензорните пътища често са изобразени като вериги от отделни неврони, свързани последователно, подобно схващане е прекалено опростено. Сензорната информация се обработва и модифицира на всяко ниво във веригата чрез интерневрони и се въвежда от други области на нервната система. Например, клетките в сетивното тригеминално ядро получават информация и от ретикуларната формация и мозъчната кора (Torvik, 1956). Тази информация, от своя страна, допринася за изходящата информация от тригеминалните сетивни неврони към таламуса (Hassler, 1982).

Цялата сензорна информация от лицето, както за допир, така и температура и болка, се изпраща до сетивното тригеминално ядро в моста. В класическата анатомия най-чувствителната информация от лицето се носи от петия черепномозъчен нерв, но стимулите от части от устата, части от ухото и части от менингите се пренасят от общи соматични аферентни влакна в черепномозъчните нерви CN VII (лицевия нерв), IX (езиково-гълтачния нерв) и X (блуждаещия нерв). Всички сензорни влакна от тези нерви завършват в основното сетивно тригеминално ядро. При навлизане в мозъчния ствол, сетивните влакна от CN V, VII, IX и X се сортират и изпращат към главното сетивно тригеминално ядро (Usunoff et al., 1997).

Сетивният тригеминален ядрен комплекс е разделен на три съставни части. От каудална към роstralна посока, те са спиналното ядро, главното сензорно и мезенцефалното ядра. Различните сетивни тригеминални ядра пренасят различни видове сензорна информация. Спиналното тригеминално ядро притежава влакна, пренасящи болкови и температурни сигнали, основното сензорно тригеминално ядро съдържа влакна за общосетивна информация, а мезенцефалното тригеминално ядро провежда дълбоката сетивна информация от проприоцепторите и механорецепторите на челюстите и зъбите (Huff, 2022).

Най-каудалното ядро от сетивния ядрен комплекс на тригеминалния нерв е спиналното тригеминално ядро (Usunoff et al., 1997). То обработва информацията за усещането на болка и температура от лицето. Влакната за болка от периферните ноцицептори се пренасят чрез черепномозъчните нерви CN V, VII, IX и X (схематично представени на фигура 2.1). При навлизане в мозъчния ствол, сетивните влакна се групират и достигат до спиналното тригеминално ядро. Този сноп от входящи влакна може да бъде идентифициран в напречни сечения на моста и продълговатия мозък като т.нар. спинален тракт на тригеминалното ядро, който върви паралелно на спиналното тригеминално ядро. Спиналният тригеминален тракт се приема за аналог на *fasciculus dorsolateralis* в гръбначния мозък (Van Der Cruyssen and Politis, 2018).

Спиналното тригеминално ядро съдържа сензорната карта на болката и температурата на лицето и устата. Централните израстъци на спиналните тригеминални неврони пресичат срединната линия и се насочват във възходяща посока в състава на тригеминоталмичния тракт, *tractus trigeminothalamicus*, достигайки до контралатералния таламус. Влакната за болка и температура достигат множество таламични ядра. Централната обработка на информацията за температурата и болката се различава от обработката на информацията за позицията на допир (Hassler, 1982).

Моделът, по който се разпределят болковите и температурните влакна от лицето към спиналното тригеминално ядро, все още не е напълно изяснен и е предмет на обсъждане. Настоящото общо разбиране е, че във вътрешността на спиналното тригеминално ядро информацията се представя под формата на аналогията на листовете на лука. Най-долните части на ядрото (в горната шийна част на гръбначния стълб и долната част на продълговатия мозък) представляват периферните области на лицето (скалпа, ушите и брадичката). По-високите нива (в горната част на продълговатия мозък) представляват централните области (нос, бузи и устни). Най-високите нива (в моста) представляват устата, зъбите и фарингеалната кухня (Lübbert et al., 2013). Това означава, че слоевидното, „луково“ разпределение

се различава от дерматомното разпределение на периферните клони на петия черепномозъчен нерв.

Спиналното тригеминално ядро изпраща информация за температура и болка към таламуса и провежда информация до средния мозък и ретикуларната формация на мозъчния ствол. Последните пътища са аналогични на *tractus spinomesencephalicus* и *tractus spinoreticularis* на гръбначния мозък, които пътища изпращат информация за температура и болка от останалата част на тялото към същите области (Leblanc, 1992).

За разясняването на проекциите на спиналното тригеминално ядро имат принос редица учени през последното столетие. Например *Ganchrow* (1978) инжектира SpVc на спиналното тригеминално ядро с тритиеви аминокиселини в саймири (вид маймуна) и установява, че еференции от SpVc имат контралатерални проекции към медиодорзалното таламично ядро (*Ganchrow*, 1978) (за връзката между SpV и таламус вж. фигура 2.1). Също така, билатерални връзки са наблюдавани до медиодорзалното таламично ядро заедно с ипсилатерални връзки между главното сетивно ядро и SpVc на тригеминалния ствол. *Burton* и сътрудници (1979) изследват проекциите от SpVc с техники за ретрограден и антерограден аксонен транспорт при котки (*Burton et al.*, 1979) и установяват, че проекциите до таламуса са билатерални до дорзомедиалния регион на *nucleus posteromedialis ventralis* и *nucleus posterior thalami* на таламуса. Други еференции, произхождащи от SpVo на SpV, преминават към контралатералния VPM като част от *lemniscus trigeminalis* (*Brodal*, 2010). Това води до обособяване на *tractus trigeminothalamicus* от SpV. Освен това *Panneton* и *Burton* (1982) инжектират ретроградна хрянова пероксидаза в ростралната тригеминална област и показват, че невроните във всички ламини, но главно в III и IV от медулария дорзален рог, дават проекции към интрануклеарния път. В рамките на слой III и IV орофациалните влакна се сливат с тези на отделните си ядра (*Panneton and Burton*, 1982). Също така, слой III и IV съдържат, освен орофациалните влакна и тригеминалните ядра, много интерневрони, които могат да бъдат отговорни за поддържането на вътреядрения път (*Sessle*, 2014). Следователно може да се опише

трети тракт, така нареченият вътреядрен тракт, който върви към или в рамките на сивото мозъчно вещество около мозъчния акведукт в средния мозък, *substantia grisea centralis* или periaqueductal gray (PAG) от SpVi и SpVc на SpV. SpVi на SpV също получава входяща информация от предния участък на лицето и от аферентните нервни влака, *n. auriculotemporalis*, *n. mylohyoideus*, *nn. zygomatici* и от нервите на роговицата (Shigenaga et al., 1986).

Горепосочената информация ясно показва, че въпреки наличието на обширни литературни данни от проведените през годините експерименти, конкретната функция на всички подядра на спиналното тригеминално ядро все още остава ненапълно уточнена.

2.5 Състояние на проблема

Очевидно е, че независимо от многобройните изследвания през годините и постиженията в изясняване морфологията на спиналното тригеминално ядро и разкриване на невротрансмитерната принадлежност на неговата клетъчна популация, все още са налице нерешени проблеми. Прегледът на наличната литература недвусмислено демонстрира, че въпреки натрупаните познания в разкриване на детайлната структура и цитоархитектониката, не е изяснен напълно неврохимичния профил на невроните в спиналното тригеминално ядро, както и ролята на ендогенните невротрансмитери и невромодулатори използвани от тях.

Ето защо, настоящото проучване е насочено към по-детайлно изясняване на морфо-функционалните особености на спиналното тригеминално ядро у плъх с подчертан акцент върху идентифициране на неврохимичните вещества, и в частност на невротрансмитерите, които участват в трансдукцията на болковите импулси и последващото им предаване към субкортикалните и кортикални соматосетивни центрове.

Ш. Ц Е Л И З А Д А Ч И

Целта на настоящето изследване е да се установят структурната организация и цитоархитектониката на спиналното тригеминално ядро у плъх, както и да се разкрие невротрансмитерната/невромодулаторна и невротрофична природа на неговите неврони.

За осъществяването на тази цел си поставихме следните основни **задачи**:

1. С помощта на класически хистологични техники да се представи нормалната морфология на спиналното тригеминално ядро у плъх, включително цитоархитектониката на невроните в отделните му подядра.
2. Чрез използването на светлинномикроскопски имунохистохимични техники да се разкрие невротрансмитерния, невропептиден и невротрофичен профил на невроните в спиналното тригеминално ядро у плъх.
3. На базата на проведените имунохистохимични експерименти да се анализира количествено неврохимичния профил на отделните подядра и да се направи сравнителен статистически анализ на разпределението на изследваните биоактивни вещества в трите подядра.
4. Да се даде функционално обяснение на ролята на установените невроактивни вещества в отделните подядра на спиналното тригеминално ядро при плъха.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1 Експериментални животни

Експериментите в настоящето изследване са осъществени върху материал от полови зрели плъхове, порода *Wistar*. Изследвани бяха общо двадесет и шест възрастни плъха от мъжки пол с телесно тегло 180 – 300 g. Експериментите бяха проведени основно в Института по невробиология при Българска академия на науките (БАН), а малка част от тях бяха извършени в лабораториите на катедрата по анатомия, хистология и ембриология на Медицински университет (МУ)-София. Всички животни бяха редовно наблюдавани да бъдат в добро здравословно състояние, беше им осигурено неограничен достъп до храна и вода и бяха обезпаразитявани от персонала на вивариума към Института по невробиология при БАН.

Всички изследвания са проведени съгласно нормативната уредба за работа с експериментални животни в България при съблюдаване на правилата на Етичната комисия на Института по невробиология, БАН (регистрация *FWA 00003059 US Department of Health and Human Services*) и тези на Комисията по етика на научните изследвания в МУ-София (КЕНИМУС).

Лабораторните плъхове са широко използвани в научни изследвания по много причини. Гризачите са едни от най-разпространените бозайници с прилики с хората както по физиология, така и по генетика, и следователно могат да служат за полезни животински модели за изследване на различни биологични процеси и заболявания в тях. Тяхната привлекателност като експериментални животни е допълнително повлияна от малкия им размер, бързите репродуктивни цикли и лесното боравене и отглеждане в лабораторни условия.

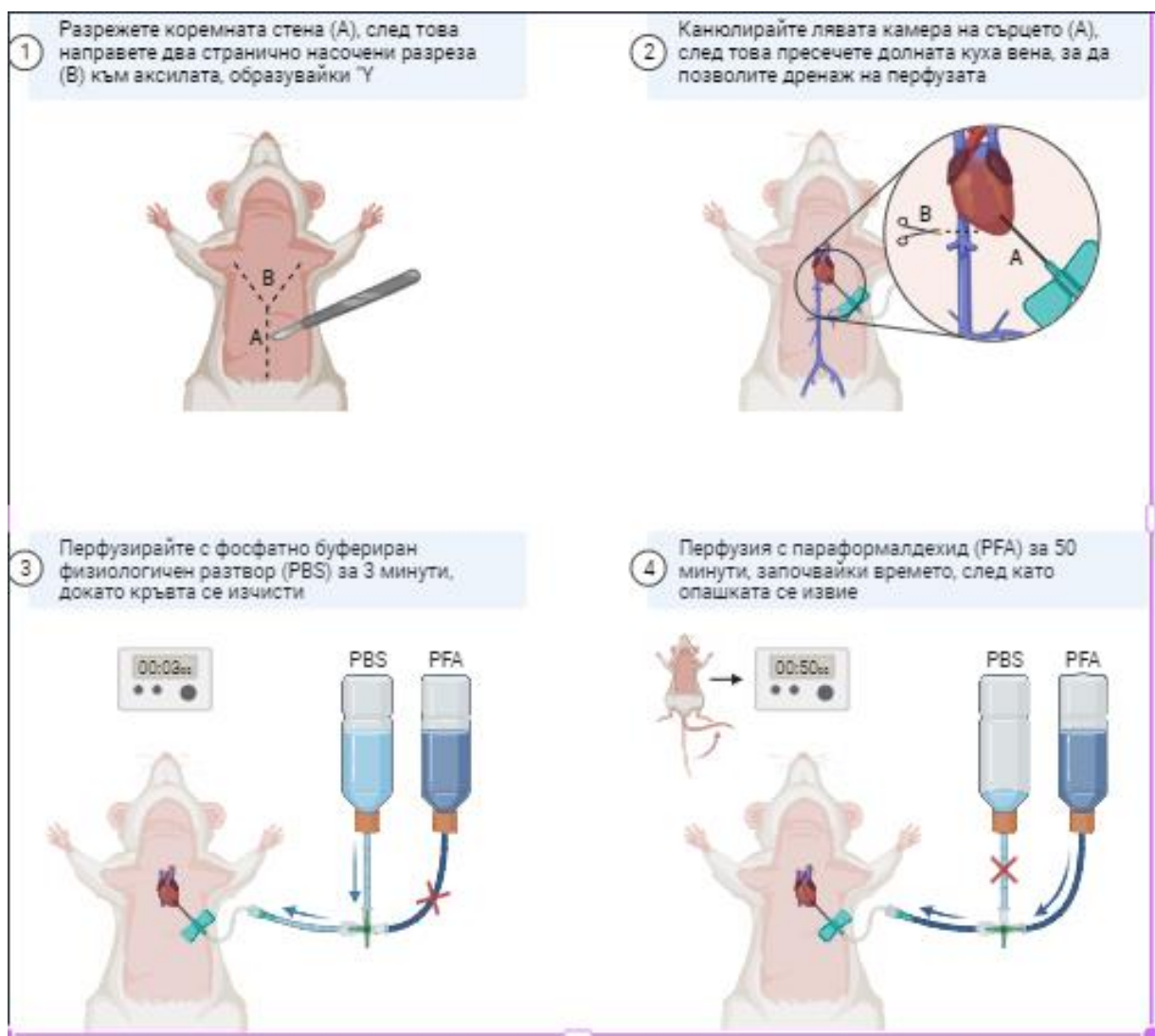
Плъховете *Wistar* са линия, получена чрез кръстосване на плъхове албиноси, принадлежащи към видове *Rattus norvegicus*. Тази линия е разработена през 1906 година във *Wistar* институт във Филаделфия, за да послужи като полезен животински модел за използване в биологични и медицински изследвания.

4.2 Хистологични техники

4.2.1 Вземане и подготвяне на материала

Експерименталните животни първо получиха повърхностна анестезия с етер, а след това им бе инжектиран тиопентал в доза 40 mg/kg интраперитонеално. Те получиха анестезия и възходящата аорта беше използвана за перфузия, като канюлата се вкарваше през лявата камера на сърцето (фигура 4.1). Първоначално кръвоносната система се промиваше за около 5 минути с 0.05 M фосфатно-буфериран разтвор на натриев хлорид (PBS) с pH 7.36. След промиването се пускаше системата с фиксатора, състоящ се от 4% параформалдехид (Merck) в 0.1 M фосфатен буфер (PB) за около 20 минути. За всяко едно от животните сме приготвяли непосредствено преди употребата по 500 ml фиксатор. Конкретните стъпки на процедурата на перфузионна фиксация са представени на фигура 4.2.

След перфузията и изваждането на мозъка от черепната кухина отпрепарирахме под лупа областта на интерес, простираща се от нивото на средния мозък до горния отдел на гръбначния мозък. Оформените тъканни блокчета се оставяха през нощта за дофиксиране в същия фиксатор на 4°C. След фиксирането материалът се промиваше от остатъчното количество фиксатор до другия ден под течаща струя чешмяна вода. Включването на материала в парафин налагаше неговото дехидратиране през възходяща редица от алкохоли, започвайки с поставянето му в 50% етанол за 2 h, след което късчето тъкан се прехвърля в 70% етанол до другия ден, последвано от престой в 80% етанол за 2 h, 96% етанол – 2 пъти по 20 min, 100% етанол – 2 пъти по 15 min. Следващата стъпка е просветляване на материала в кедрово масло в пеницилинови шишенца, които се оставят отворени, за да може етиловият алкохол да се изпарява. Материалът престоюва в кедрово масло, докато придобие кехлибарен цвят или докато потъне на дъното на шишенцето, което може да отнеме няколко дни. След двукратно промиване в ксилол (2 пъти по 10 min), материалът се включва в парафин.



Фигура 4.1. Схема на експерименталната процедура на перфузионна фиксация съгласно Rodent Transcardial Perfusion Protocol, адантирана от BioRender.com (2023).

Източник: <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Тази процедура започва с поставяне на материала в течен парафин за 1 h на 56°C в термостат, след което късчето тъкан се премества във втори парафин за 2 h на 56°C и накрая следва изливане и включване на изследваният материал в парафиново блокче.

С помощта на микротом Leica RM 2125 RTF парафиновите блокове бяха нарязани на срезове с дебелина 7 μm и серийните срезове бяха поставени върху хром-желатинизирани предметни стъкла.

4.2.2 Оцветяване с хематоксилин и еозин

Този метод на оцветяване е най-често и рутинно използван в хистологичната практика, тъй като благодарение на подходящото съчетание на оцветителите, отнасящи се към две противоположни групи – основни и кисели бои, той позволява да се получи цялостна хистологична представа за строежа на изследваната структура. Хематоксилинът е природна боя от растителен произход, която е разтворима във вода и спирт. В разтвор хематоксилинът притежава базични свойства, благодарение на което много добре се открояват структурните компоненти на ядрата, които съдържат нуклеинови киселини. Еозинът е синтетична боя, разтворима във вода или спирт, притежаваща киселинни свойства и оцветяваща цитоплазмата на клетките в розов цвят (Давидов, 1981).

Оцветяването хематоксилин-еозин сме приложили върху материал от всички изследвани от нас експериментални животни. Всяко пето предметно стъкло се оцветяваше с хематоксилин-еозин, за да установим в кои срезове от редицата е налице спиналното тригеминално ядро и да проследим неговата структурна промяна в срезовете на различни нива. Преди да пристъпим към самото оцветяване, срезовете се депарафинираха чрез поставяне на предметните стъкла в кювета с ксилол (2 пъти по 10 min), последвано от преминаването им през низходяща редица от алкохоли, а именно: 100% етанол – 3 min, 96% етанол – 3 min, 80% етанол – 3 min, 70% етанол – 3 min, дестилирана вода – 5 min и накрая те се изплакват 2 пъти с чешмяна вода. След това срезовете се прехвърляха в разтвор на хематоксилин за 5 min. След оцветяването отново следва изплакване на срезовете с чешмяна вода няколко пъти и поставяне на препаратите в кювета с леко затоплена дестилирана вода за 20 min в термостат на 37°C, след което те се поставяха в разтвор на еозин за 4 min и повторно се изплакваха 2-3 пъти с чешмяна вода. Еозинът лесно се отмива във вода и в спиртове с ниска концентрация, и затова препаратите се превеждат през тези разтвори бързо, като кратко се потапят няколко пъти, и то само в 96% етанол и в 100% етанол, в които те може да престоят по 1-2 min. Следва просветляване на

монтираните върху предметни стъкла мозъчни срезове в ксилол и включването им в ентелан.

4.2.3 Оцветяване с толуидиново синьо

Това хистологично оцветяване е използвано от нас като метод за описание на цитоархитектониката на ядрото и неговите части. Депарафинираните и доведени до вода тъканни срезове се прехвърлят в 0.5% разтвор на толуидиново синьо (500 mg от боята до 100 ml дестилирана вода) за 5-10 min. Срезове се изплакват в дестилирана вода, след което те се диференцират в 70% етанол, докато се отмие излишната боя, което се контролира под микроскоп. Следва дехидратиране, просветляване и включване на срезове в ентелан.

4.2.4 Оцветяване с неутрално червено

Неутралното червено представлява багрило, използвано за витално оцветяване в хистологията. То се използва в хистологичната практика като контрастно оцветяване в комбинация с други багрила и в много други методи за оцветяване. Ние прилагаме оцветяването за визуализиране на апарата на *Golgi* и *Nissl* гранулите в невроните на ядрото (Давидов, 1981).

Неутралното червено е слабо катионно азиново багрило, което се използва широко като ядрена боя в разнообразни биологични оцветявания. Стандартният протокол за подготовка на тъканите за хистологично оцветяване, описан по-горе, бе следван в първоначалните етапи на депарафиниране и рехидратация, след което в оцветителната среда се добавя разтвор на неутрално червено за оцветяване, в който тъканните проби се инкубират в продължение на 5 min при стайна температура, последвано от 2-минутно промиване с дестилирана вода. Предметните стъкла с монтираните срези на тях срезове впоследствие се дехидратират, просветляват в ксилол и покриват с покривно стъкло за дълготрайно съхранение и последващо наблюдение под микроскоп и заснемане.

4.3. Имунохистохимични методи

4.3.1 Имунохистохимична процедура

При имунохистохимичните реакции в тази работа е използван методът на авидин-биотин пероксидазния комплекс (АВС) в съответствие с *Hsu et al* (Hsu et al., 1981). Всяка имунохистохимична реакция е извършена върху парафинови срезове с дебелина 7 μm във влажна среда. Материал от едни и същи експериментални животни беше използван за морфологично и имунохистохимично изследване (Давидов, 1982).

В тази група експерименти бяха използвани първични антисеруми/антитела, закупени от различни търговски източници (Alpha Diagnostic, Amersham, INCSTAR, Sigma), които бяха насочени срещу биогенни амини, възбудни и задръжни аминокиселини, невропептиди, невротрофни фактори и техните кореспондиращи рецептори. Имунореакциите бяха визуализирани чрез индиректния метод с помощта на видово-специфични биотинилирани вторични антитела (за детайли относно работните разреждания и източниците на антителата вж. таблици 1 и 2). По-конкретно имунохистохимичните реакции бяха стъпално осъществени по следния начин (фиг. 4.3):

1. Парафиновите срезове се депарафинират, след което се потапят във вода, като се използват последователните процеси, изброени по-долу, които означават разтворите и времето, необходимо за всяка стъпка: ксилол I и II отнемат по пет минути, а ксилол I – две минути, 2 минути в 96% етилов алкохол, 2 минути в 80% етилов алкохол, 2 минути при 70% етилов алкохол, 5 минути в дестилирана вода, 5 минути в дестилирана вода II.
2. За да се подобри пенетрацията на антителата по време на последващата инкубация, срезове се пермеабелизират три пъти за по пет минути, като се използва 0.01 М PBS, рН 7.36, съдържащ 0.3% Triton X-100 (Merck).

Вместо тази стъпка, при имунохистохимичните реакции за доказване на невротрофни фактори и техните рецептори извършихме антигенно демаскиране чрез

изплакване на срезове два пъти за пет минути с 0.01 М PBS и последващо третиране с 0.01 М цитратен буфер, рН 6.0.

Преди да приложим цитратния буфер, първо направихме два стволови разтвора: стволов разтвор А, представляващ 0.1 М разтвор на лимонена киселина (21.01 грама лимонена киселина в 1 л AD) и стволов разтвор Б, представляващ 0.1 М разтвор на натриев цитрат (29.41 грама натриев цитрат в 1 литър AD).

За да се получи 0.1 М буферен разтвор на цитрат с рН 6.0, комбинирахме 9 ml от разтвор А плюс 41 ml от разтвор В, като се получават 50 ml разтвор, като неговото рН се жустираше с електронен рН метър до 6.0.

За да се получат крайните 500 ml 0.01 М цитратен буферен разтвор се комбинират 450 ml AD и 50 ml 0.1 М цитратен буферен разтвор.

Препаратите с тъканните срезове се потапят в този разтвор, който е бил загрят на водна баня, и остават в уреда за варене за 30-35 минути. След като препаратите се оставят да се охладят в цитратния буфер за около 20 минути, се предприема следната процедура:

Изплакват се препаратите три пъти през пет минути с 0.01 М PBS, рН 7.36.

3. Инхибиране на ендогенната пероксидаза за 30 минути при стайна температура с помощта на 1.2% водороден пероксид в абсолютен метанол, последвано от 15-минутно промиване в 0.01 М PBS/0.3 % Triton X-100.

Ендогенната пероксидаза се блокира при имунохистохимичните реакции за демонстриране на невротрофните фактори и техните рецептори в следната комбинация от два разтвора:

- Разтвор А: 200 μ l = 20 μ l метанол плюс 180 μ l PBS

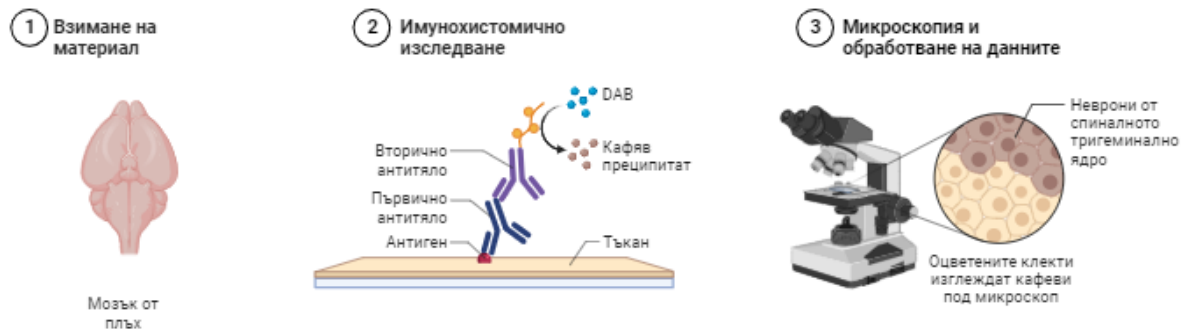
- Разтвор Б: 1.5 ml PBS + 450 μ l H₂O₂ (30 %) = 1950 μ l.

За да потиснем ендогенната пероксидаза, комбинирахме 1950 μ l от разтвор В със 150 μ l от разтвор А и го накапвахме върху препаратите, след което оставихме крайният разтвор да действа в продължение на около 30 минути.

След това три пъти през 5 минути промиваме срезове с 0.01 М PBS, рН 7.36.

4. Тъканните срезове бяха последващо пермеаблизирани с помощта на 0.01 M PBS и 0.3% Triton X-100.
5. Срезове се обработват отново за един час на стайна температура в 0.01 M PBS, съдържащ 5% нормален кози серум, за да се намали неспецифичното пероксидазно оцветяване, след което
6. Извършихме две 5-минутни кратки промивания с 0.01 M PBS и 0.3 % Triton X-100.
7. Срезове се инкубират в разреждания от 1:100 до 1:5000 със съответните първични антисеруми (вж. таблица 1). За разреждане на поликлоналните антисеруми се използва 0.01 M PBS разтвор, съдържащ 1% нормален кози серум. Инкубирането с първичните антитела продължи общо 48 часа, като 24 от тях бяха проведени при стайна температура, а останалите 24 – в хладилник при 4 °C.
8. Нанасяне на 3 x 5 минути на 0.01 M PBS (pH 7.36) върху препаратите.

Имунохистохимия с DAB



Фигура 4.3. Схематично представяне на имунохистохимична реакция, визуализирана с хромогена диаминобензидин (DAB) съгласно Rodent Transcardial Perfusion Protocol, адаптирана от BioRender.com (2023).

Източник: <https://app.biorender.com/biorender-templates>

9. Инкубиране с вторично антитяло, или биотинилиран антикози IgG, произведен в заек, в разреждане 1:250 с 0.01 М PBS, или биотинилиран антизаешки IgG, произведен в коза (Sigma). Инкубацията във второто антитяло се извърши при стайна температура в продължение на два часа.
10. Използвахме 0.01 М PBS, рН 7.36 за да промием срезове три пъти за пет минути.
11. Срезове се инкубират в АВС комплекса (Vector Laboratories). Половин час преди да се използва, се приготвя инкубационен разтвор, като се смесват 6.26 μ l от А и 6.26 μ l от В реагента с 1 ml 0.01 М PBS. Инкубационният период е два часа при стайна температура във влажна среда.
12. Нанасяне на 0.01 М PBS върху срезове два пъти за пет минути.
13. Последващо 5-минутно промиване на препаратите с Tris/HCl буфер с рН 7.54 за 5 минути.
14. Като прилагахме 3,3' диаминобензидин (DAB) като хромоген, ние проявявахме реакциите в продължение на пет до петнадесет минути на тъмно под визуален контрол на оцветяването.
15. Следва бързо промиване с 0.05 М Tris/HCl буфер, изплакване с дестилирана вода, преминаване на монтираните срезове през възходяща редица от алкохоли, просветляване с ксилол и включване в ентелан (Merck), както следва: 5 минути с дестилирана вода, две минути в 70% етилов алкохол, две минути в 80% етилов алкохол, 2 минути в 96% етилов алкохол, абсолютен етилов алкохол – две минути, ксилол два пъти в продължение на десет минути.

Таблица 1. Списък на първичните антисеруми, прилагани при описаните имунохистохимичните реакции

Първичен антисерум/ Антиген	Каталожен номер	Снабдител	Гостоприемник/Тип	Разреждане
Гама-аминомаслена киселина (GABA)	A-2052	Sigma BioSciences	заек/поликлонално	1:1000
Ацетилхолин естераза (AChE)	PA5-86086	Thermo Fisher Scientific	заек/поликлонално	1:500
5-хидрокси-триптамин (5-HT)	S 5545	Sigma-Aldrich	заек/поликлонално	1:5000
Субстанция P (SP)	8834033	INCSTAR	заек/поликлонално	1:1000
Невропептид Y (NPY)	PRN 1702	Amersham	заек/поликлонално	1:500
Калцитонин ген-свързан пептид (CGRP)	PEPA27	Serotec	заек/поликлонално	1:1000
Невронална азотен оксид синтаза (nNOS)	610308	BD Biosciences	мишка/моноклонално	1:100
Невронален растежен фактор (NGF)	sc-548	Santa Cruz	заек/поликлонално	1:500
Мозъчен невротрофен фактор (BDNF)	sc-546	Santa Cruz	заек/поликлонално	1:500

Първичен антисерум/ Антиген	Каталожен номер	Снабдител	Гостоприемник/Тип	Разреждане
Невротрофин 3 (NT-3)	sc-13380	Santa Cruz	коза/поликлонално	1:500
Тирозин киназа А (TrkA)	sc-118	Santa Cruz	заек/поликлонално	1:500
Тирозин киназа В (TrkB)	sc-8316	Santa Cruz	заек/поликлонално	1:500
Тирозин киназа С (TrkC)	sc-117	Santa Cruz	заек/поликлонално	1:500
Глиален невротрофен фактор (GDNF)	sc-13147	Santa Cruz	мишка/моноклонално	1:500
GFR α 1	sc-10716	Santa Cruz	заек/поликлонално	1:500

Таблица 2. Списък на вторичните антитела, използвани при проведените имунохистохимични реакции

Вторичен антисерум	Снабдител	Разреждане
Конски антимиши IgG, биотинилиран	Vector Labs	1:250
Кози антизаешки IgG, биотинилиран	Sigma	1:250
Заешки антикози IgG, биотинилиран	Santa Cruz	1:250

4.3.2 Контролни оцветявания за специфичност

За да оценим специфичността на реакциите и антителата, използвани в това изследване, прилагаме както положителни, така и отрицателни контроли. За целта при всяка имунохистохимична процедура, проведохме паралелни контролни реакции, за да проверим специфичността на имунохистохимичната реакция. В тези реакции върху контролните срезове, монтирани в съседство, или пропуснахме да добавим в инкубационната смес специфичните първични антитела, или ги заменихме с PBS или неимунен серум в същото разреждане като първичния антисерум. И в двата случая не успяхме да наблюдаваме специфично имунооцветяване. Освен това използвахме т.нар. абсорбционни контроли, за да контролираме специфичността на прилаганите антитела. При тези контролни оцветявания първичните антисеруми бяха предварително абсорбирани със съответния синтетичен антиген в концентрация 20-200 $\mu\text{g/ml}$ антисерум в работния разтвор за два часа при стайна температура или за двадесет и четири часа при 4 °C. След това част от тъканта се инкубира със сравним преабсорбиран антисерум, като в този случай резултатът е отрицателен (отрицателна контрола). При този сценарий тестът за абсорбция може да бъде приет като сигурно средство за специфичен имунохистохимичен отговор. Наред с негативните контролни оцветявания, в нашето изследване ние използвахме и участъци от тригеминалния и горния шиен ганглий на плъх като релевантни позитивни контроли на извършените от нас имунохистохимични експерименти.

4.3.3 Обработка и анализ на изображенията

Препаратите бяха разглеждани и заснети с изследователски светлинен микроскоп *Olympus VS120-L100 Virtual Slide System.*, а след това получените дигитални снимки бяха записани в TIF-формат, след което бе проведен морфометричен и статистически анализ на цифровите изображения.

4.3.4 Морфометрия и статистически анализ

След имунохистохимичното оцветяване препаратите бяха обследвани и фотографирани с *Olympus VS120-L100 Virtual Slide System*, оборудван със софтуер за получаване на изображения *VS-ASW 2.9*. Преди да се използва системата за получаване на изображения, тя е претърпяла прецизно калибриране, за да се прецизират настройките при заснемането на изображенията. За по-голяма прецизност, източникът на светлина, включително цветни филтри, и настройките на камерата останаха еднакви за всяко отделно изображение. Освен това настройките за яркост, контраст, цвят и острота бяха калибрирани предварително. Цифровите изображения бяха съхранение във формат TIF.

Над сто и седемдесет изображения, взети от трите части на спиналното тригеминално ядро на двадесет и шест плъха, осигуряваха напълно адекватен размер на пробата. За морфометричния анализ измерихме размерите на над 1000 неврона с пакета за обработка на изображения Fiji (Schindelin et al., 2012).

Имунооцветените дигитализирани изображения бяха транспортирани до лаптоп с платформата с отворен код за анализ на биологични изображения Fiji (Schindelin et al., 2012) за последващ анализ на експресията на биоактивните субстанции. От всяко подядро бяха подбрани три произволно избрани полета със позитивно оцветяване. За морфометричния анализ снимките на имунооцветените участъци първо бяха превърнати в изображения в сиви скали. След това бе определен интензитета на сивото (диапазон 0–255: черно = 0, бяло = 255), съответстващ на имунооцветяването на биоактивното вещество и бе екстрахирана зоната на реакция. Всяко изображение в сива скала беше бинаризирано автоматично, докато операцията за надпрагова стойност (thesholding operation) преобразува пикселите на преден план в черен цвят и пикселите на фона в бял цвят. По този начин двоичните изображения представляваха анализираната реакция и бяха използвани допълнително за измервания на положителни площи. Площта на положителна имунна реакция бе

оценявана по броя на черните пиксели от диапазона на нивата на сивото в телата на невроните.

Най-малко 2400 неврона бяха измерени на случаен принцип за всеки срез, произлизащ от плъх. Невроните бяха очертани и тази трансекционна област беше обединена с изображението на съответната имунореактивност на субстанцията, което се изследва. Количествените измервания на интензитета на имунооцветяване бяха извършени върху цветни изображения. За да илюстрираме разпределението на данните, ние сме ги показали като *Box-and-Whisker* графики. Централната линия във всяка графика представлява медианата, докато долната и горната половина на кутията са съответно 25-ия и 75-ия перцентил. Мустаците на кутията са минималните и максималните точки за групата. Статистическият анализ беше извършен с помощта на програма *Excel 2016 (Microsoft Inc)* и бе осъществен от софтуер *GraphPad Prism 8 (GraphPad, San Diego, California, USA)*. Нивата на експресия на изследваните биоактивни субстанции бяха сравнени между трите групи за всяко подядро. Експерименталните данни, разпределени параметрично, бяха оценени чрез t-теста на *Student* или *Mann-Whitney U* теста, съответно за параметрични и непараметрични данни. Разликите бяха считани за статистически значими, ако р-стойностите са <0.05 . При непараметрични данни беше използван еднопосочен дисперсионен анализ на *Kruskal-Wallis (ANOVA)* по рангове, последван от post-hoc анализ с прилагане на тестове на *Dunn* за множествоно сравнение по двойки. Разликите се считаха за статистически значими, ако р-стойностите са <0.05 .

V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

5.1 Морфология и цитоархитектоника на спиналното тригеминално ядро

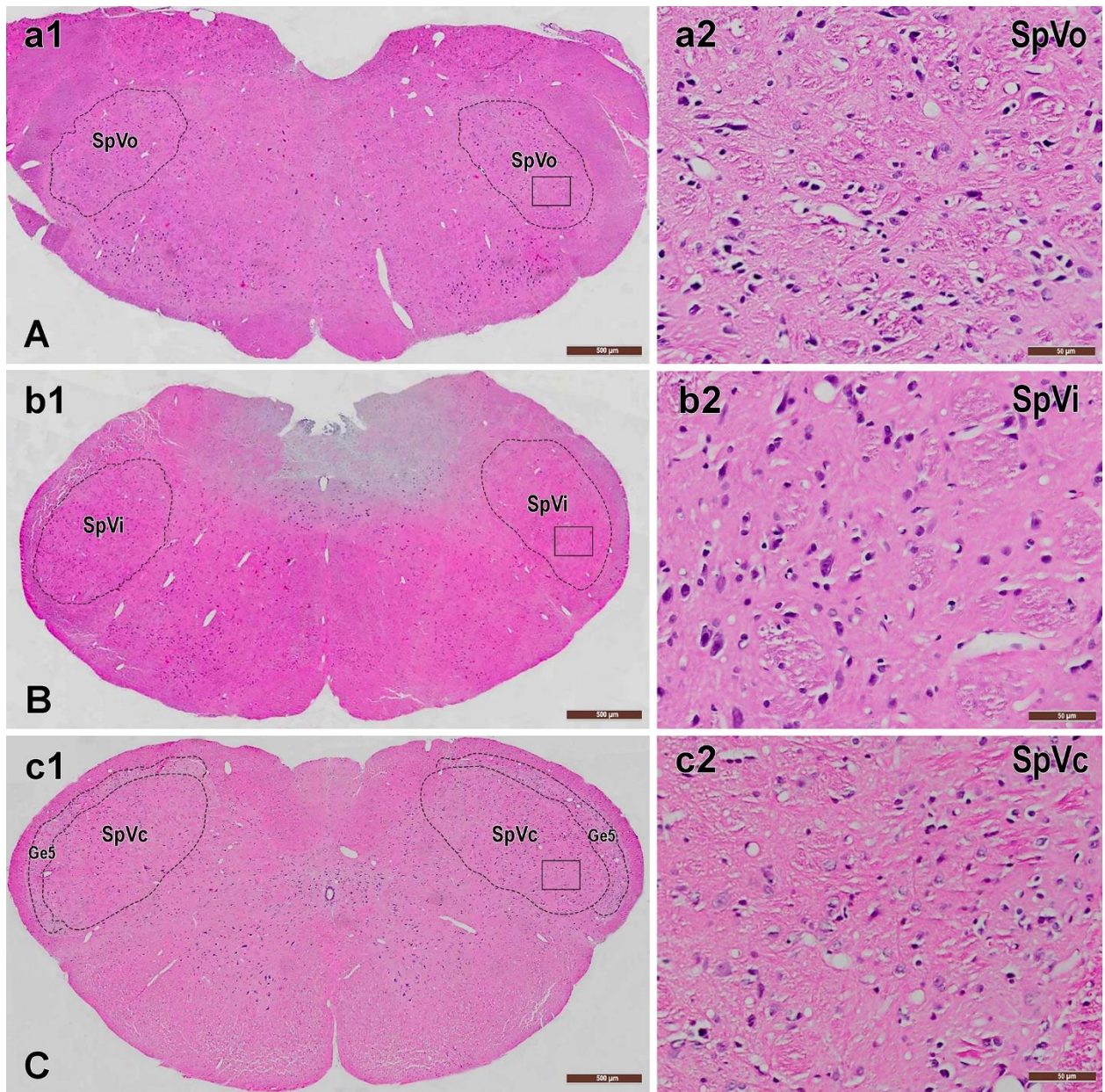
5.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро

Чрез систематично разглеждане на невронните тела, нервните влакна и капилярите в оралното, интерполарното и каудалното подядро е представена информацията, която осигурява базисно разбиране на нормалните морфологични характеристики в рамките на спиналното тригеминално ядро. Сравнителният анализ на тези подядра, чиято точна локализация е определена според координатите от стереотаксичния атлас на мозъка на плъх на *Paxinos* и *Watson* (2014), подобрява разбирането ни за сложната им микроархитектура на специфични нива (*Paxinos and Watson, 2014*).

Спиналното тригеминално ядро представлява най-голямото тригеминално ядро и се простира в латералния тегментум на продълговатия мозък и каудалната част на моста. Ядрото е изградено от неврони, които имат ясно изразено клетъчно тяло със спорадични Нислови телца, заобиколени от мрежа от миелинизирани аксони. Около него могат да се наблюдават миелинизирани влакна. Тези влакна се свързват със сигнала за болка от периферните ноцицептори, които се пренасят чрез черепномозъчните нерви V, VII, IX и X. При навлизане в мозъчния ствол, сензорните влакна се групират и проникват в спиналното тригеминално ядро. По своето протежение от рострално към каудално, спиналното тригеминално ядро се подразделя на три анатомично разграничени подядра: орално, интерполарно и каудално (фиг. 5.1-5.3).

5.1.1.1 Каудално тригеминално ядро

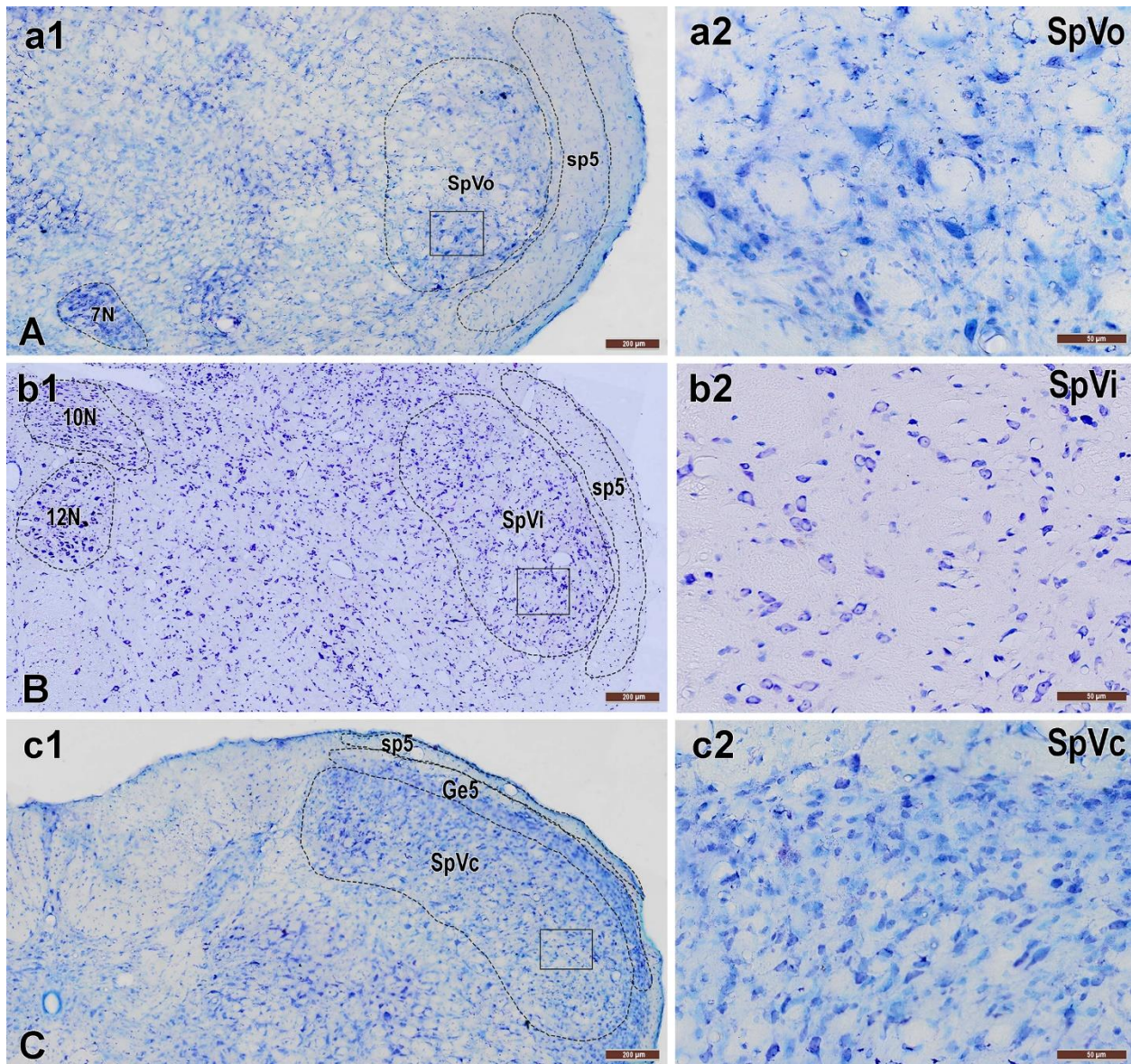
Най-забележимото сетивно тригеминално подядро се простира от каудалната част на продълговатия мозък, ниво, съответстващо на каудалния полюс на долния оливарен комплекс и *obex*, а надолу достига до втория сегмент на шийния гръбначен мозък (фиг. 5.1-5.3c1). Рострално то продължава в интерполарното тригеминално подядро,



Фигура 5.1. Хистологичен изглед на спиналното тригеминално ядро, оцветено с HE. Очертани са трите отделни подядра, означени като и орално SpVo (A), интерполарно SpVi (B) и каудално, SpVc (C) заедно с подядро на последното subnucleus genalinosus (Ge5). Мащабна скала: 200 μm (a1, b1, c1), 50 μm (a2, b2, c2).

а каудално прелива в задния рог на гръбначния мозък. Традиционно каудалното тригеминално подядро се подразделя на три подядра, които съответстват на върха на задния рог на гръбначния рог: най-латералното е разположено *subnucleus zonalis*, следвано от *subnucleus gelatinosus*, а най-медиалното се намира *subnucleus magnocellularis*. Първите две подядра са дъговидни в напречно сечение, изпъкнали странично, а последното заема "хилуса" на арката.

Subnucleus zonalis е тънък лист, който съдържа малко неврони, но лесно се разпознава поради наличието на големи неврони (фиг. 5.1-5.3c2). Повечето от тях са неправилно издължени мултиполарни клетки, като най-големите достигат до 21 μm в диаметър (фиг. 5.1c2). Другите перикариони са средноголеми. И двата типа клетки притежават многобройни телца на *Nissl* в цитоплазмата им. Между големите и средните по размер клетки са разпръснати малки неврони. Медиално от *subnucleus zonalis*, в латералната част на *subnucleus gelatinosus*, се разполагат единични, разпръснати клетки, но медиално гъстотата на невроните се увеличава значително. *Subnucleus gelatinosus* е парвоцелуларна, непроучвана досега област, съставена от овални или удължени неврони. Повечето от овалните неврони са с малки клетъчни тела и диаметър до 15 μm . Както е обичайно за малките неврони, ядрото им е относително голямо, а оскъдната цитоплазма образува тънък, блед перинуклеарен обръч около него. Магноцелуларното подядро заслужава името си само когато се сравнява с *subnucleus gelatinosus* (фиг. 5.1c2). Повечето от неговите клетки са неправилно овални, средно големи клетки (около 12 μm в диаметър), с умерена, дифузна базофилия (фиг. 5.1-5.3.c2). Значителен брой процент от невроните са малки, притежаващи дребни ядра, които наподобяват по размер тези на *subnucleus gelatinosus*. Големите неврони рядко надвишават по брой седем до осем на участък от всяка страна. Те са неправилно удължени, като най-големите достигат 21 μm . В някои клетки телцата на *Nissl* са много ясно изразени. По цялата си рострокаудална дължина, каудалното спинално тригеминално подядро е оградено латерално от каудалната част на *tractus spinalis nervi trigemini*. Дорзално от спиналното

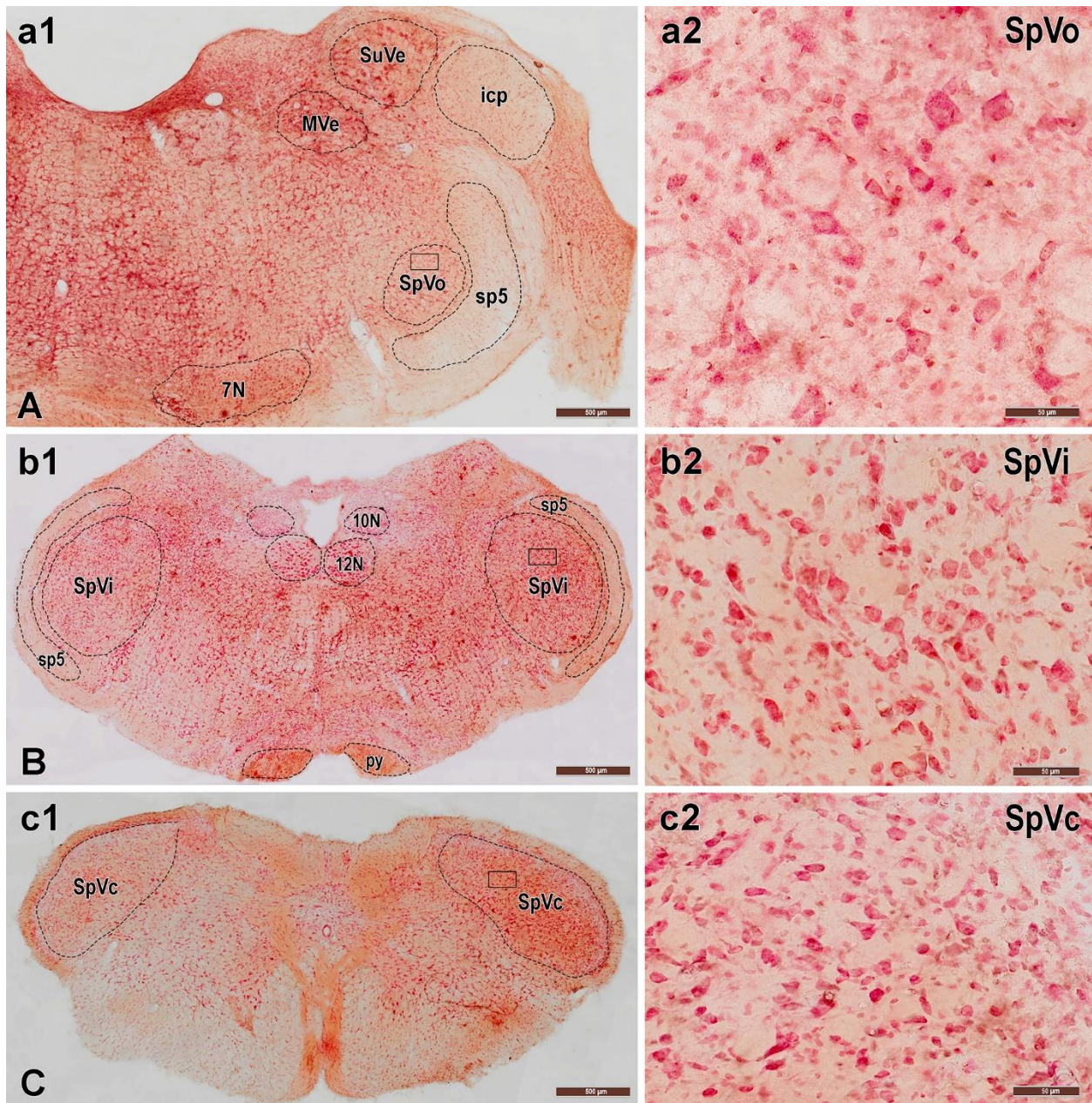


Фигура 5.2. Хистологичен изглед на спиналното тригеминално ядро, оцветено с толуидиново синьо. Изображението подчертава трите отделни подядра: SpVc (C), SpVi (B) и SpVo (A). Ge5, subnucleus gelatinosus; sp5, tractus spinalis nervi trigemini; 10N, nucleus dorsalis nervi vagi; 12N, nucleus nervi hypoglossi. Мащабна скала: 200 μm (a1, b1, c1), 50 μm (a2, b2, c2).

тригеминалното подядро се разполага *fasculus cuneatus*. Медиално и венстромедиално от него се намира дорзалното подядро на централното ретикуларното ядро на продълговатия мозък, означавано като дорзално ретикуларно ядро на Paxinos и Huang (Mai and Paxinos, 2012). То, заедно с асцендентните спинални пътища, бележат вентралната граница на спиналното тригеминално подядро. На прехода към гръбначния мозък, спиналното тригеминално подядро образува подобен на буца връх и се продължава медиално от *lamina V* на гръбначния мозък.

5.1.1.2 Интерполарно тригеминално подядро

Това подядро се разполага в продълговатия мозък. Рострално то продължава в оралното спинално тригеминално ядро, а каудално граничи с каудалното. Каудалният полюс на интерполарното тригеминално ядро се намира малко по-рострално до каудалния полюс на *nucleus olivaris inferior*. Популацията от неврони в това подядро е хетерогенна (фиг. 5.1-5.3b2). По-голямата част от клетките в него са малки до средни по размер (вариращи между 6 и 15 μm), неправилно овални или удължени, с умерена, дифузна базофилия (фиг. 5.2b2). С оглед на тяхната външна морфология, те са подобни на клетките в оралното тригеминално подядро. Характерни за това подядро са големите неврони (с диаметър 20-35 μm), притежаващи елиптични перикариони и със силна, дифузна цитоплазмена базофилия (фиг. 5.1b2, 5.2b2). Такива големи неврони обикновено са единично разпръснати сред малки клетки. На напречни разрези интерполарното тригеминално подядро има неправилна овална форма с дълга ос, насочена дорзомедиално. Рострално то представлява една тънка пластника, която постепенно увеличава размерите си в каудална посока. По цялото си рострокаудално протежение, интерполарното тригеминално подядро граничи латерално с *tractus spinalis nervi trigemini*. В каудална посока *nucleus solitarius* се придвижва медиално и тази граница на подядрото се замества от *nucleus cuneatus*. Медиално интерполарното тригеминално подядро се ограничава от *nucleus reticularis parvocellularis*, ядро на продълговатия мозък, а близо до прехода към каудалното тригеминално подядро то граничи с централното ретикуларно ядро на продълговатия мозък. Съществуват



Фигура 5.3. Хистологичен изглед на спиналното тригеминално ядро, оцветено с неутрално червено. Изображението подчертава трите отделни подядра: SpVc (C), SpVi (B) и SpVo (A). SuVe, nucleus vestibularis superior; MVe, nucleus vestibularis medialis; icp, pedunculus cerebellaris inferior; 7N, nucleus nervi facialis; 10N, nucleus dorsalis nervi vagi; 12N, nucleus nervi hypoglossi; sp5, tractus spinalis nervi trigemini; py, tractus pyramidalis. Мащабна скала: 500 μm (a1, b1, c1), 50 μm (a2, b2, c2).

сравнително малко невронни перикариони по цялата медиална граница, тъй като тази област се пресича от видими снопове влакна (фиг. 5.2a1, 5.2a2).

5.1.1.3 Орално тригеминално подядро

То се простира в каудалната част на моста и в ростралния продълговат мозък. Рострално това подядро продължава в главното сетивно тригеминално ядро, а каудално – в интерполарното спинално тригеминално подядро. Невронните перикариони в него са малки и средни по размер. Последните се наблюдават по-често в ростралната част на ядрото, която има и по-големи размери. Малките клетки са неправилно овални, с едва разпознаваеми дендритни полюси (фиг. 5.1a1). Ядрата им са сравнително големи и са заобиколени от тънък цитоплазмен участък, който е слабо оцветен (фиг. 5.1-5.3a2). Средните по размер неврони са с овални или фузиформени профили. Последните могат да достигнат диаметър на клетъчното тяло от 20 μm (фиг. 5.3a2). Невроните притежават дифузно базофилна цитоплазма (фиг. 5.2a2). Частта на оралното тригеминално подядро, разположена в моста, граничи латерално със *tractus spinalis nervi trigemini* и снопчетата от нервни влакна в последния често пресичат подядрото, разделяйки го на неравномерни групи, които се различават в отделните участъци. Непосредствено дорзално от оралното спинално тригеминално подядро се разполагат ядрата на вестибуларния сетивен комплекс. Вентромедиално оралното спинално тригеминално ядро е отделено от лицевото ядро с тясна олигоцелуларна и парвоцелуларна ивица, която представлява вентролатерално продължение на *nucleus reticularis parvocellularis*.

5.1.2 Морфологични видове неврони в спиналното тригеминално ядро

Препарати от мозъчния ствол на нивото на SpVc, SpVi и SpVo бяха оцветени с толуидиново синьо за да се диференцират различните неврони в отделните подядра на спиналното тригеминално ядро. Установено бе, че трите подразделения включват клетки със сходни външни морфологични характеристики, но с отчетливи вариации между тях. Невроните бяха характеризирани въз основа на формата и размера на

техните перикариони, и категоризирани в отделни морфологични видове, включващи седем вида неврони (фиг. 5.4, 5.5).

5.1.2.1 Ладиевидни неврони

Проучването ни върху морфологичните характеристики на невроните в SpV установи уникален фенотип на невроните, който се характеризира с необичайни по форма клетъчни тела, наподобяващи лодка (фиг. 5.4А). Наблюдавани под светлинен микроскоп, перикарионите на тези неврони приличат на лодки; те имат широка, издължена форма и гладка повърхностна структура. Морфометричното измерване на техните размери установи, че те варират между 20 и 30 μm , като средният им диаметър е $25 \mu\text{m} \pm 3.8$ ($n = 11$), което показва значително ниво на соматична вариабилност сред тази група неврони.

5.1.2.2 Удължени неврони

Друг морфологичен тип неврони с уникални анатомични черти е характерен за средните по размер неврони в SpV. Тази популация неврони се характеризира с фузиформени или удължени клетъчни тела (фиг. 5.4В), с вариращи по размер перикариони в диапазона от 14 до 21 μm и със среден диаметър $15 \mu\text{m} \pm 2.1$ ($n = 24$).

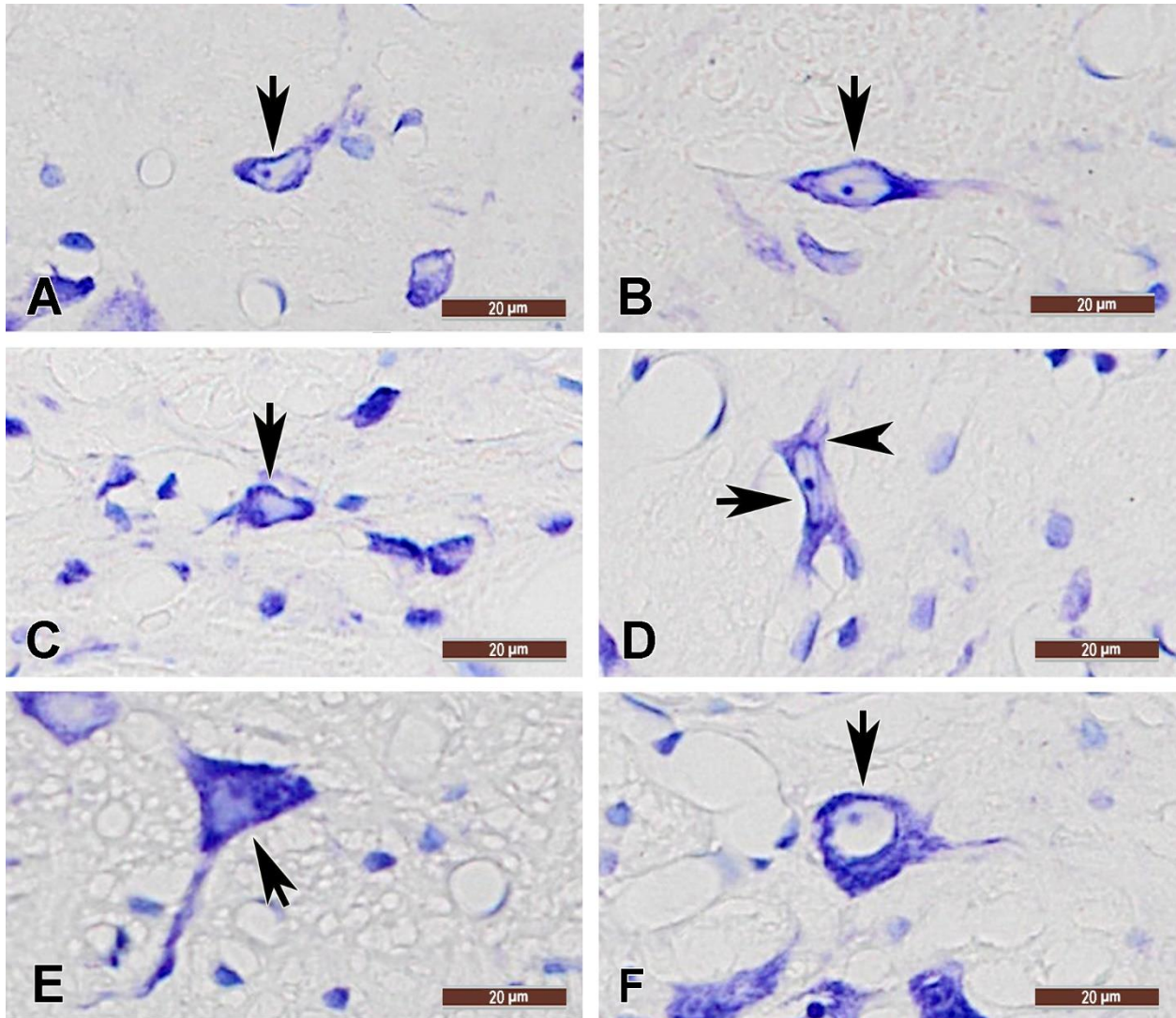
5.1.2.3 Лобулирани неврони

Нашето изследване разкри и наличие на популация от спинални тригеминални неврони с лобулирани клетъчни тела и неравномерни повърхностни изпъкналости или вдлъбнатини (фиг. 5.4С). Тези лобулирани неврони имат среден диаметър $16 \mu\text{m} \pm 1.3$ ($n = 9$), като диаметрите на техните перикариони варират между 15 и 21 μm .

5.1.2.4 Неврони с дилатирани аксонални хълмчета

Ние идентифицирахме също и неврони, по чиито тела наблюдавахме разширени области, които са особено видими в близост до аксоналните хълмчета и местата на разклоняване на техните дендритни израстъци. Вероятно, при тези профили е налице и значителна дилатация на дендритната архитектура, тъй като разширените области

често показват широчина, която е подобна или почти равна на диаметъра на невронните клетъчни тела (фиг. 5.4D). Перикарионите на невроните с дилатации се различават значително един от друг по отношение на техните размери и форма. Тази



Фигура 5.4. Морфологични видове неврони в спиналното тригеминално ядро, оцветени с толуидиново синьо за визуализиране на клетъчните им тела. (A) Неврон с ладиевидно тяло (стрелка); (B) Неврон с биполярен профил и удължено клетъчно тяло (стрелка); (C) Неврон с лобулирано клетъчно тяло (стрелка); (D) Неврон с дилатация (глава на стрелка) в началото на един от неговите израстъци; (E) Неврон с характерна пирамидна форма на перикариона; (F) Типичен представител на невроните с овална форма на клетъчното тяло (стрелка). Мащабна скала 20 µm.

структурна хетерогенност представлява отличителна черта в морфологията на този тип неврони вътре в спиналното тригеминално ядро.

5.1.2.5 Пирамидни неврони

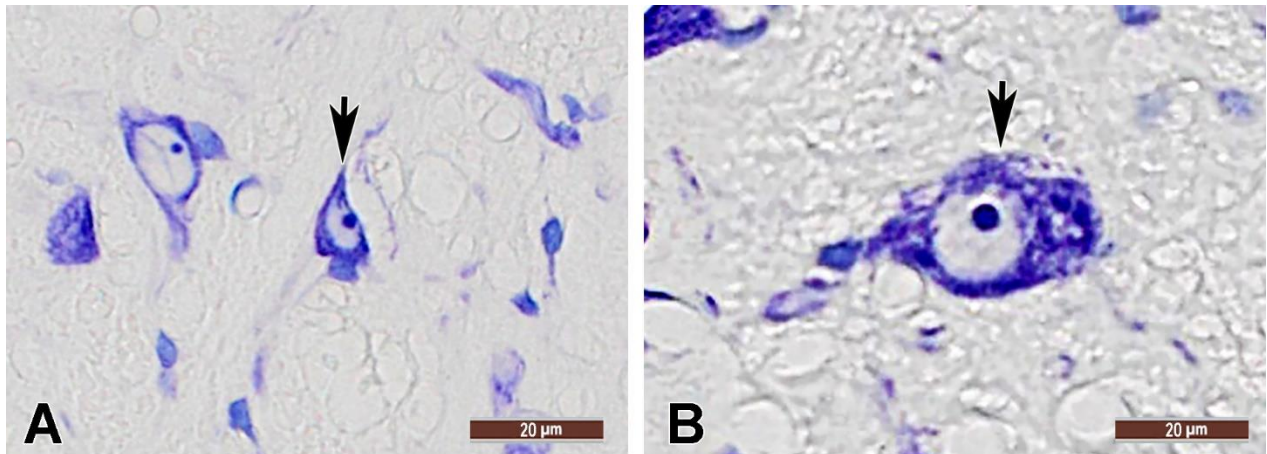
Някои от невроните в SpV притежават характерна триъгълна сома (фиг. 5.4E). При детайлното им разглеждане ние установихме, че тази популация от неврони показва известно морфологично разнообразие, проявяващо се със среден диаметър на перикарионите $17 \mu\text{m} \pm 1.2$ ($n = 12$) и диапазон на вариация в размерите им от 13 до 21 μm . Дендритната морфология се определя от наличието на два базални и един апикален израстък във всеки неврон, открояваща се добре при този тип оцветяване.

5.1.2.6 Овални (зърнести) неврони

В хода на проучването беше идентифицирана и една подгрупа от неврони в SpV, притежаващи овални или сферични клетъчни тела (фиг. 5.4F). Тези неврони са малки по размери, със среден диаметър на техните клетъчни тела по-малък от $12 \mu\text{m} \pm 4.75$ ($n=1000$). За по-лесно представяне на хетерогенността в размерите им, разделихме тази подгрупа неврони на три подгрупи, чиито тела са овални или сферични. Невроните, класифицирани като малки, притежават соматичен диаметър между 5 и 10 μm със среден диаметър от $8,5 \mu\text{m} \pm 1.1$ ($n = 509$). Перикарионите на невроните със среден размер са малко по-големи от тези в първата подгрупа и също така имат сходна форма. Клетъчното тяло на невроните е със среден диаметър $13,6 \mu\text{m} \pm 1.33$ ($n = 351$), като диапазонът му варира от 11 до 15 μm . Невроните от третия подвид имат перикариони, които са малко по-големи от тези на вече изброените типове неврони, но са структурно идентични. Диаметърът на телата на невроните от този подтип варира от 16 до 20 μm , като средната му стойност е $17.3 \mu\text{m} \pm 1.28$ ($n = 107$). Всички перикариони от третия подтип имат една и съща форма, дори ако размерите им варират.

5.1.2.7 Полиморфни (мултиморфни) неврони

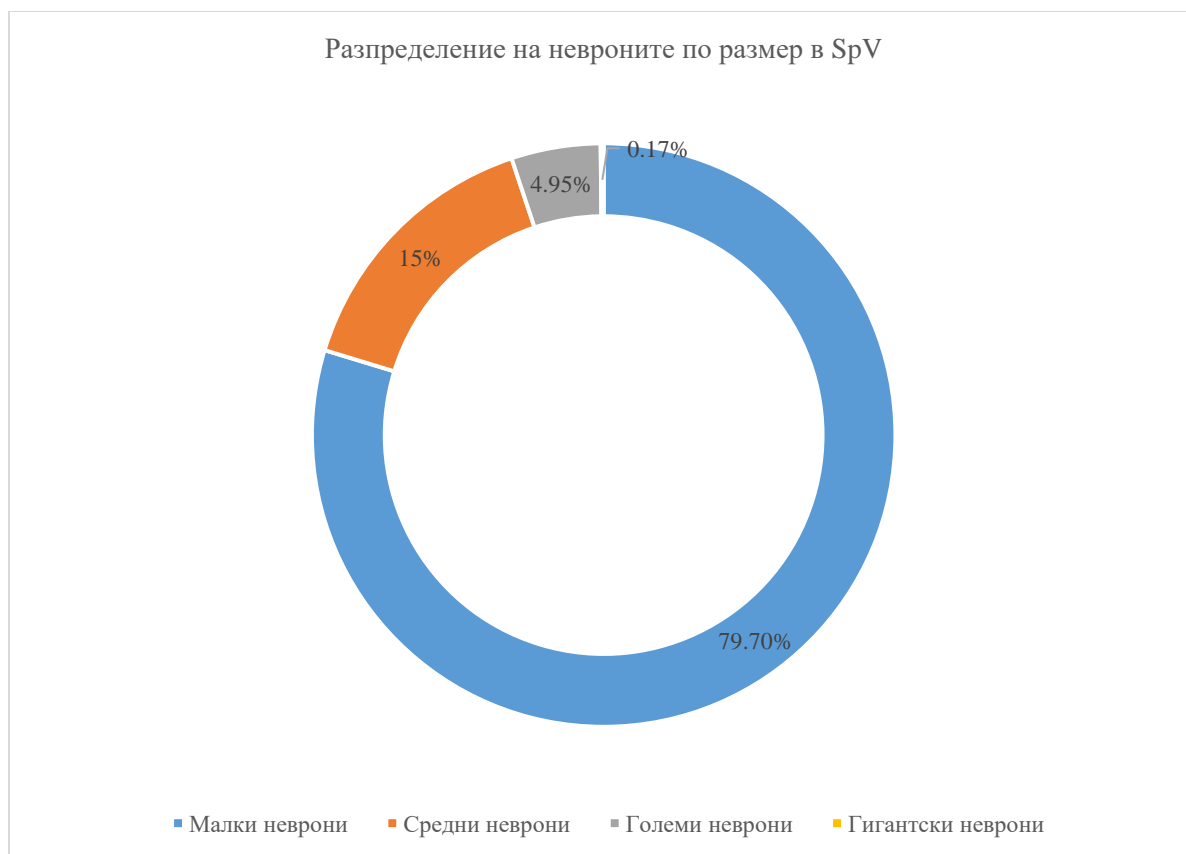
В SpV наблюдавахме спорадично наличие на отделна популация от много големи неврони (фиг. 5.5). Генерално тези неврони имат размери над 21 μm в диаметър на техните перикариони. В рамките на тази популация от неврони, средният диаметър на клетъчните им тела е $26.7 \mu\text{m} \pm 5.5$ ($n = 33$), което предполага, че размерът на сомата е доста променлив. Най-голямото клетъчно тяло на неврон, което беше измерено, беше с диаметър от почти 44 μm (43.92 μm). Разнообразието в соматичната морфология сред тези неврони се отнася до различия във формата на техните клетъчни тела, които включват кръгли, овални и крушовидни форми (фиг. 5.5A, B).



Фигура 5.5. Неврони с голям размер на перикарионите. Наблюдава се видимо разнообразие в соматичната морфология с различна форма на клетъчните тела, описани с крушовидни (A) и овални форми (B). Мащабна скала 20 μm .

5.1.3 Морфометричен анализ на невроните в спиналното тригеминално ядро

Проведеният от нас морфометричен анализ с програмата Fiji идентифицира три различни подгрупи неврони в рамките на SpV въз основа на размерите на техните клетъчни тела, както е показано на фигура 5.6. Невроните, класифицирани като малки, имат соматичен диаметър от 5 до 15 μm , със среден диаметър $9.89 \mu\text{m} \pm 2.16$ ($n = 798$). Тези неврони представляват приблизително 79.7 % от общата популация на невроните в рамките на спиналното тригеминално ядро (фиг. 5.6). Средно големите неврони притежават перикариони със среден диаметър $16.66 \mu\text{m} \pm 1.51$ ($n = 151$), попадащи в диапазона от 15 до 20 μm . Тези неврони съставляват приблизително 15 % от общата популация на невроните в ядрото. Невроните, категоризирани като големи, имат соматичен диаметър от над 25 μm , със среден диаметър $26.68 \mu\text{m} \pm 4.58$ ($n = 50$). Освен това, беше наблюдаван един много голям (гигантски) неврон с размери, надвишаващи 40 μm в соматичен диаметър ($n = 1$). Невроните с големи размери общо представляват приблизително 5% от общата популация на невроните в рамките на спиналното тригеминално ядро при плъха.



Фигура 5.6. Процентно разпределение на различните по размер неврони в SpV.

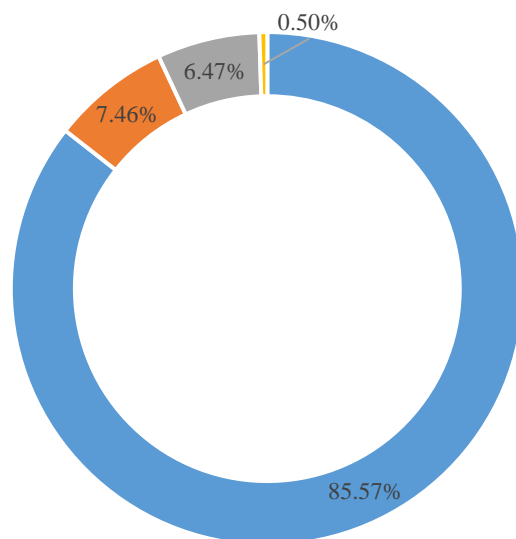
По-нататъшният анализ разкри различни разпределения на размерите на невроните в отделните подядра на SpV. По-конкретно, в каудалното спинално тригеминално подядро (SpVc) малките клетки са голямата част от невроните (почти 85%), средните неврони са представени като 14.93%, следвани от големите по размери неврони, които са по-малко от 1% от всички неврони в ядрото. В интерполарното подядро (SpVi) преобладават малките неврони (86%), следвани от средните неврони (7.46%), големите неврони (6.47%) и спорадичните гигантски неврони (по-малко от процент). По-конкретно, най-големият диаметър на клетъчно тяло на неврон е измерен в SpVi – 43.93µm. Точно в това подядро правят впечатление огромните размери на неврони, разпръснати сред по-малки такива. В оралното подядро (SpVo) малките неврони са почти три пъти повече от средните по размер клетки, като съставляват съответно 70% и около 23%, докато големите неврони са почти 7% от всички клетки в него.

Средният диаметър на малките неврони в спиналното тригеминално ядро на плъха варира от 8.84 до 10.52 μm , този на средните неврони е от 16.39 до 16.80 μm , а на големите се колебае от 25.45 до 27.82 μm във всички подядра.



Фигура 5.7. Процентно разпределение на различните по размер неврони в SpVc.

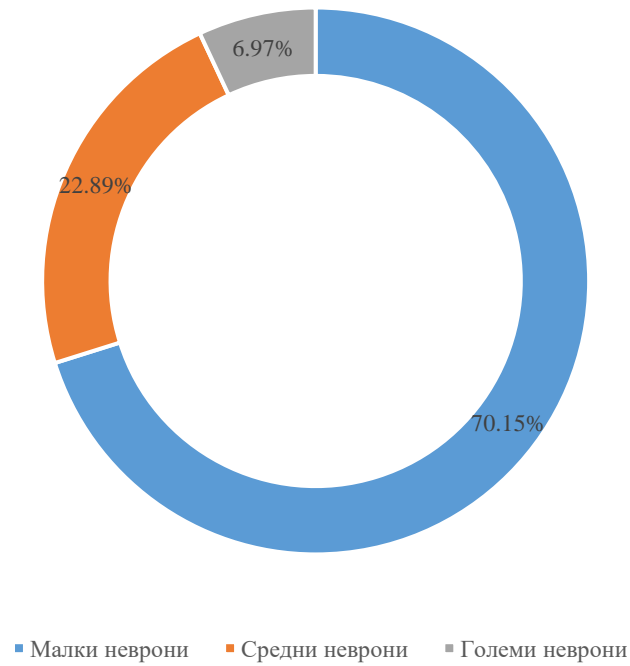
Разпределение на невроните по размер в SpVi



■ Малки неврони ■ Средни неврони ■ Големи неврони ■ Гигантски неврони

Фигура 5.8. Процентно разпределение на различните по размер неврони в SpVi.

Разпределение на невроните по размер в SpVo



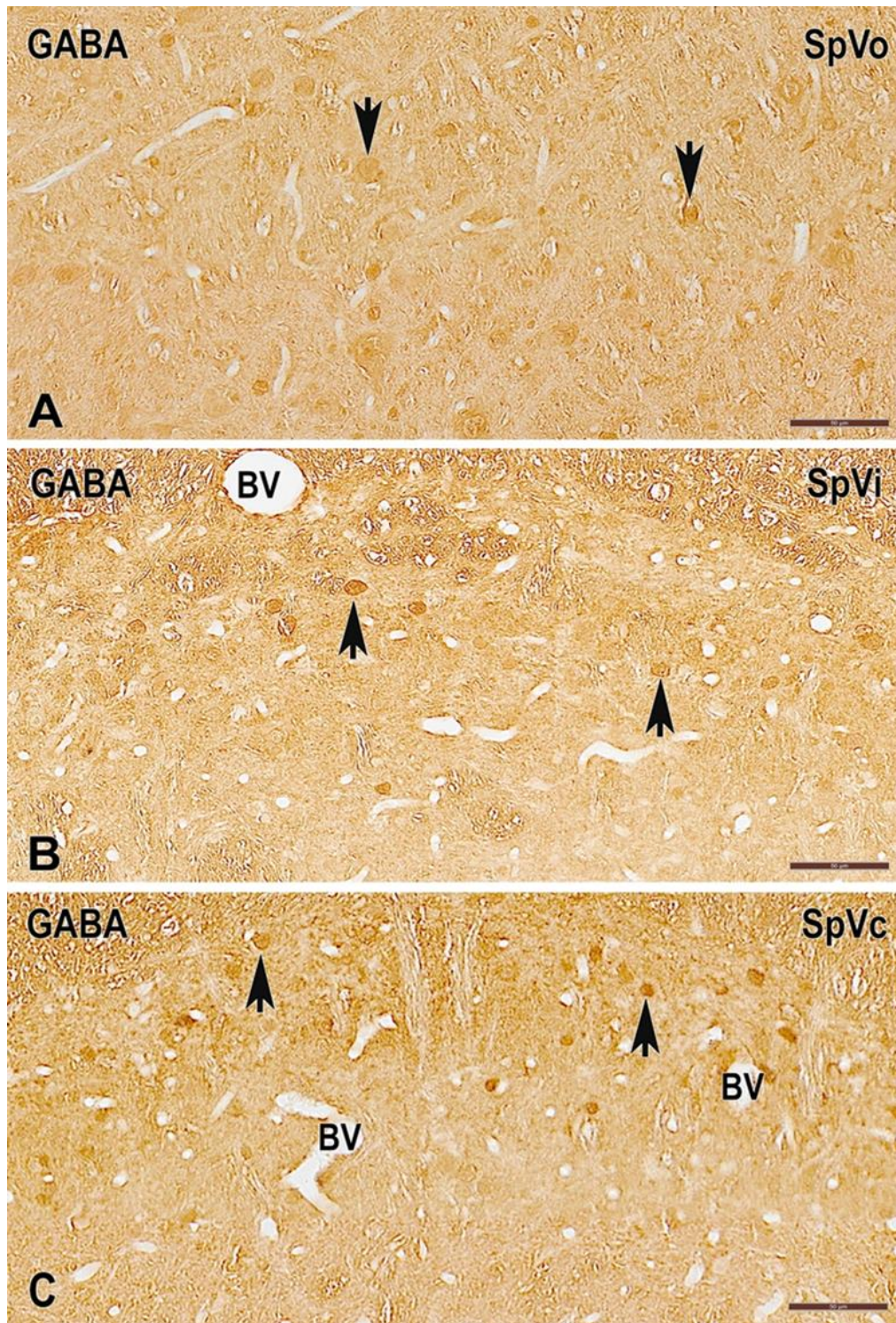
Фигура 5.9. Процентно разпределение на различните по размер неврони в SpVo.

5.2 Неврохимична характеристика на спиналното тригеминално ядро

5.2.1 Невротрансмитери и неврпептиди в спиналното тригеминално ядро

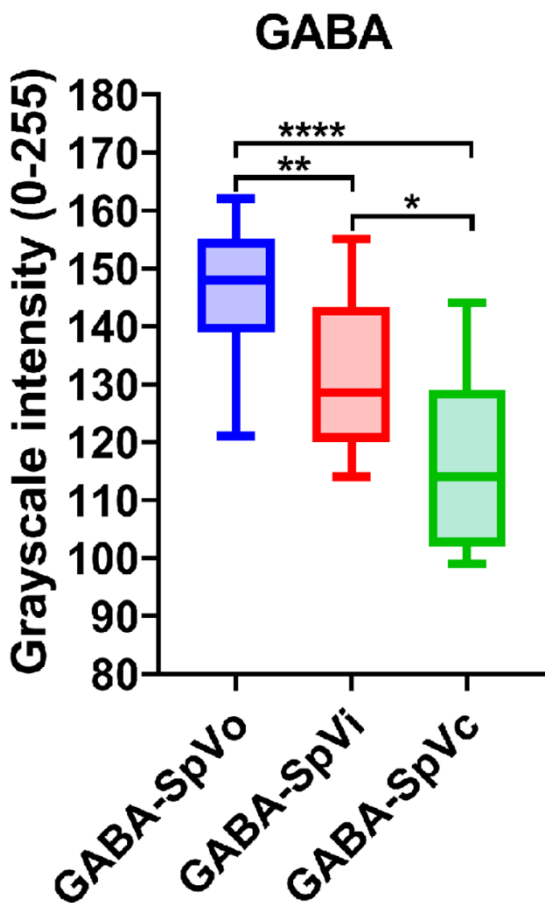
5.2.1.1 Гама-аминомаслена киселина

Чрез използване на имунохистохимични методи на светлинномикроскопско ниво, ние успяхме да установим експресията на гама-аминомаслена киселина (GABA) в трите подразделения на SpV. GABA-имунобелязани спинални тригеминални неврони бяха наблюдавани в оралното, интерполарното и каудалното подядро, без видими различия в интензитета на тяхното имунооцветяване и в топографското им разпределение (фиг. 5.10). По-голямата част от имунопозитивните неврони са малки по размер, което би могло да означава, че точно дефинирана клетъчна субпопулация в SpV участва в инхибиторната GABAергична невротрансмисия. Отчетлива GABA имунореактивност показаха само перикарионите на невроните в спиналното тригеминално ядро, докато техните израстъци оставаха небелязани. Подобен модел на имунореакцията се установи и в трите подядра. В SpVc се наблюдаваше много на брой малки по размер неврони, разположени в маргиналната част на подядрото, по-конкретно в *subnucleus zonalis*. От друга страна, бяха наблюдавани единични тънки, варикозно разширени GABA-имунопозитивни нервни влакна, преминаващи през спиналното тригеминално ядро.



Фигура 5.10. Имунохистохимична реакция за гама-аминомаслената киселина (GABA) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Малки по размер имунореактивни неврони са показани със стрелки. BV, кръвоносни съдове. Мащабна скала = 50 μ m.

След констатиране наличието на разпръснати GABA-имунореактивни неврони в каудалния, интерполарния и оралния анатомичен отдел на SpV, ние приложихме непараметричния тест на *Kruskal-Wallis* за да сравним обективно



Фигура 5.11. Бокс плот диаграми, представящи интензитета на имунооцветяване за GABA в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

Между интерполарното и каудалното подядро се наблюдават също статистически значими различия (* $p < 0.024$).

интензитета на оцветяване за GABA в трите части на SpV. Данните от теста показват значими различия в експресията на GABA $H(2) = 32.10$, **** $p < 0.0001$ и стойностите на медианите (Mdn) в изследваните три подядра на SpV, а именно: орално подядро (GABA-SpVo) (Mdn = 148), интерполарно подядро (GABA-SpVi) (Mdn = 128.5) и каудално подядро (GABA-SpVc) (Mdn = 114). Освен теста на *Kruskal-Wallis* проведохме и post-hoc анализ на тези данни като за целта сме приложили *Dunn's* тест. Теста на *Dunn* показва статистически значими различия в експресията на GABA между SpVo и SpVi подядро на SpV (** $p < 0.0096$) и между GABA-SpVo и (GABA-SpVc) подядро на спиналното ядро (**** $p < 0.0001$). Най-силна е експресията на GABA в каудалното подядро, по-слаба е тя в интерполарното подядро и най-слаба е в

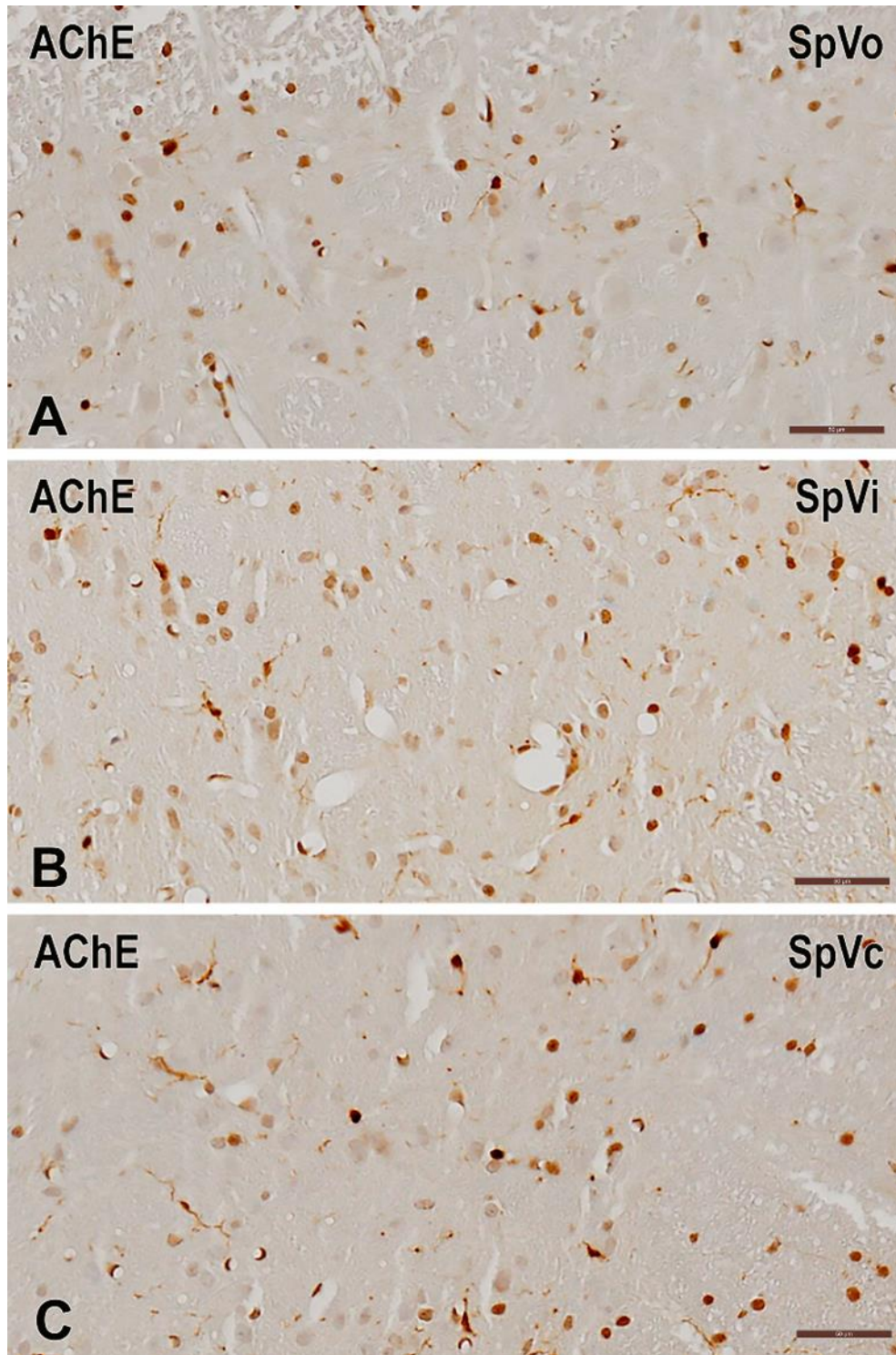
5.2.1.2 Ацетилхолин

Съществена информация за експресията и разпределението на този невротрансмитер беше получена чрез демонстриране на хидролитичния ензим ацетилхолинестераза (AChE) в структурните подразделения на SpV на плъхове.

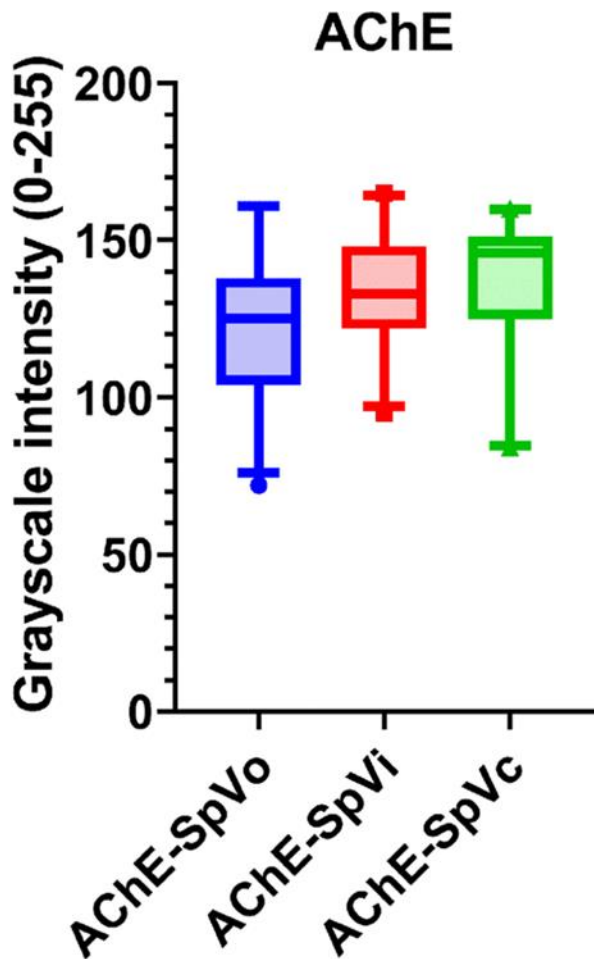
Светлинномикроскопското наблюдение на имунооцветените срезове показва, че многобройни нервни влакна в спиналното тригеминално ядро на плъх съдържат AChE. AChE-имунореактивните влакна бяха групирани в гъсти снопчета, които преминават по цялата дължина на ядрото (фиг. 5.12). Интересна находка бе установяването на част от тези имунобелязани нервни снопчета в непосредствена близост с кръвоносни съдове в ядрото, което подсказва възможна функционална свързаност между AChE-положителните нервни влакна и съдовите компоненти в SpV.

Друга забележителна констатация се отнасяше до обширната експресия на AChE в почти всички невронални клетъчни тела в спиналното тригеминално ядро. Този широко разпространен модел на експресия предполага, че ацетилхолин-деградацията ензим е широко ангажиран в контрола на нервната активност в различни популации от неврони на SpV.

Топографското разпределение на AChE-имунопозитивните неврони в каудалните, интерполарните и оралните подразделения на спиналното тригеминално ядро беше също основна задача на нашето изследване (фиг. 5.12). Неизменното идентифициране на AChE-имунореактивни невронални клетъчни тела във всяко подядро подчертава широкото присъствие на ацетилхолин в SpV, което от своя страна би означавало реално участие на този невротрансмитер в регулирането и обработката на сетивната информация на нивото на спиналното тригеминално ядро в различни функционални области на мозъка.



Фигура 5.12. Експресия на ацетилхолинестераза (AChE) в невроналните клетъчни тела в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на SpV. Наблюдават се имунопозитивни клетъчни тела на неврони и техните израстъци в ядрото. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 5.13. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за AChE в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

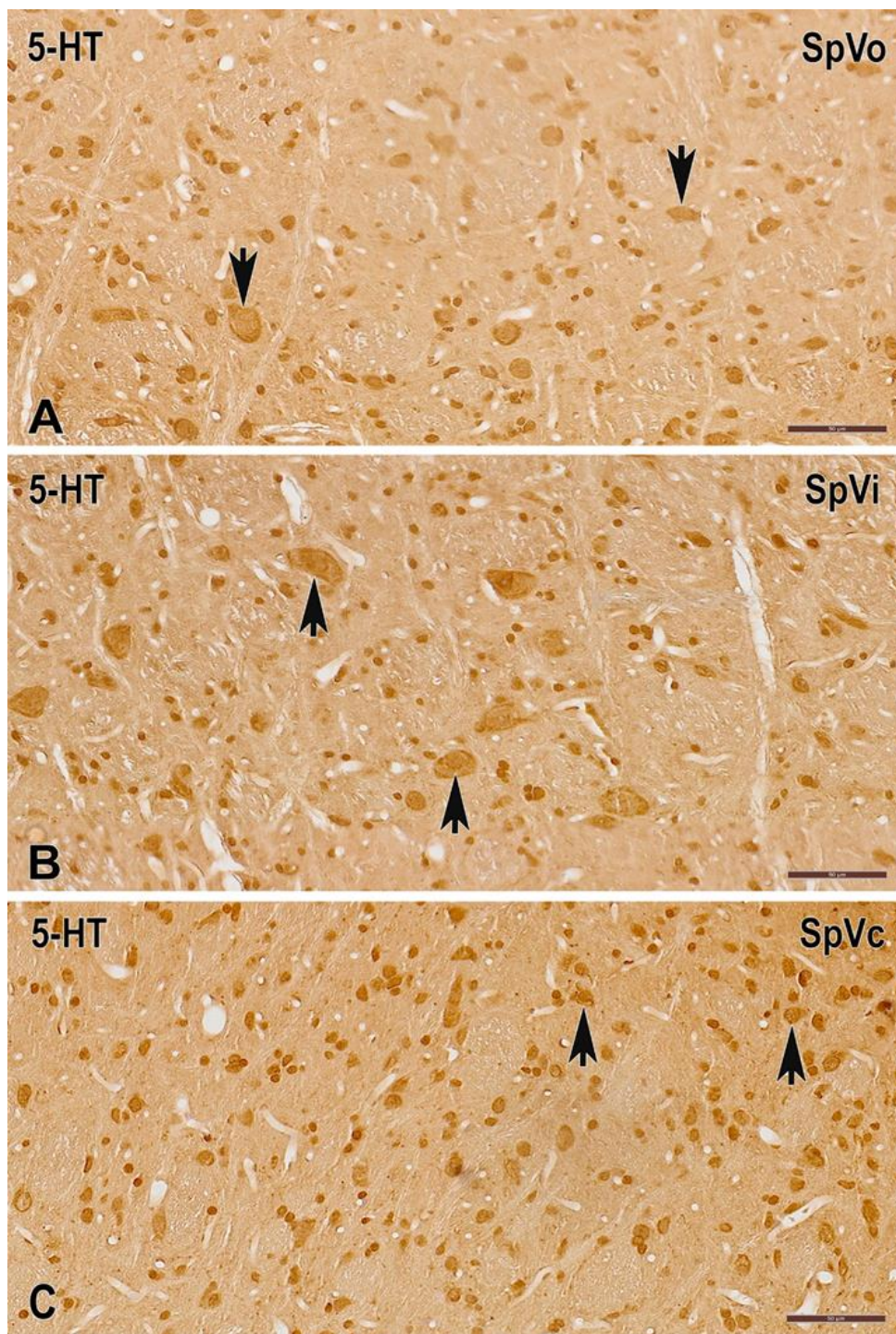
2331, съответно за двете сравнения). Освен това, не бяха наблюдавани статистически значими различия в интензитета на оцветяване между каудалните и интерполарните подядра ($p > 0.9999$).

За да сравним интензивността на оцветяването за AChE в трите части на спиналното тригеминално ядро, използвахме непараметричния тест на *Kruskal-Wallis*. В трите изследвани подядра на спиналното тригеминално ядро – орално (AChE-SpVo) (Mdn = 125), интерполарно (AChE-SpVi) (Mdn = 133) и каудално (AChE-SpVc) (Mdn = 146), тестът не показва значителни разлики в експресията на AChE, $H(2) = 3.191$, $p = 0.2028$ (фиг. 5.13). Непосредствено след теста на *Kruskal-Wallis*, ние приложихме теста за множество сравнение на *Dunn* за post hoc анализ. Сравнението на експресията на AChE в оралното (AChE-SpVo) и каудалното (AChE-SpVc) подядра на спиналното тригеминално ядро с тази в интерполарното тригеминално подядро, използвайки теста на *Dunn*, не показва статистически значими промени ($p = 0.7821$ и $p = 0.2331$, съответно за двете сравнения).

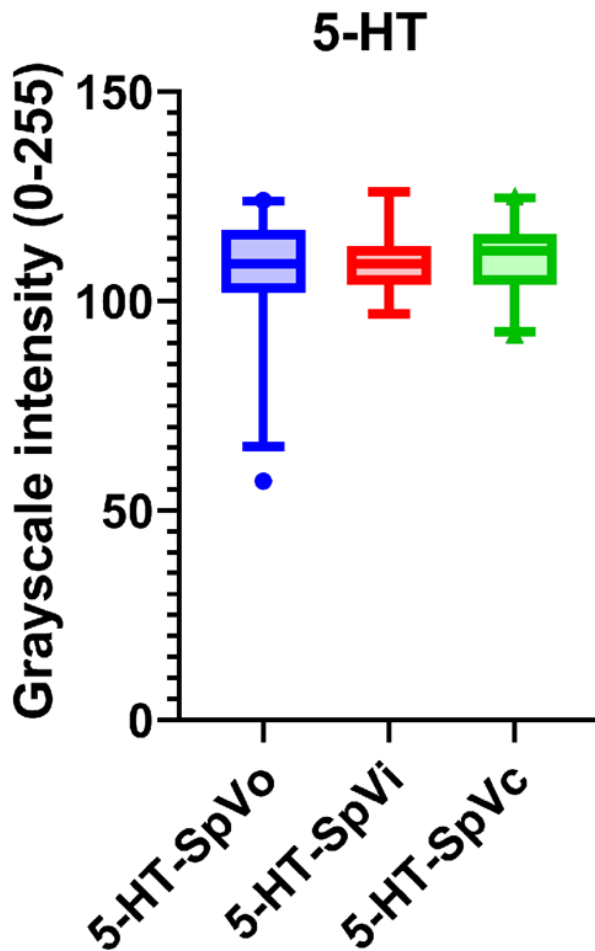
5.2.1.3 Серотонин (5-хидрокситриптамин)

С помощта на светлинномикроскопски имунохистохимични методи ние успяхме да демонстрираме експресия на серотонин (5-НТ) във всички подядра на спиналното тригеминално ядро. Детайлното разглеждане на имунооцветените срезове на нивото на SpV разкри подчертана и дифузна експресия на серотонин в много перикариони на неврони в SpV. Практически всеки имунобелязан неврон в ядрото, независимо от размера на своя перикарион, показва сходен модел и интензитет на имунооцветяване (фиг. 5.14).

Характеризирахме също така локализацията и пространствената организация на серотонин-съдържащите клетки в каудалния, интерполарния и оралния подраздел на спиналното тригеминално ядро. По-конкретно, серотонин-имунореактивни клетки бяха наблюдавани във всяко подядро по цялата росто-каудална ос на SpV, което подсказва роля на този моноаминен трансмитер в обслужването на различни функционални модалности в устно-лицевата област, което се подчертава от повсеместното им откриване в това ядро. Нещо повече, бяха наблюдавани имунопозитивни клетъчни тела и в трите подядра, като размерите на 5-НТ-имунобелязаните неврони варират. Виждат се на фигурата, както малки неврони, така и големи, чиято цитоплазма е положителна за наличието на 5-НТ. Реакцията за серотонин остава недобре изразена в нервните влакна в трите подядра.



Фигура 5.14. Експресия на серотонин (5-HT) в (А) оралното (SpVo), (В) интерполарното (SpVi) и (С) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Имунореактивни неврони с различни размери и варираща форма са показани със стрелки. Мащабна скала = 50 µm.



Фигура 5.15. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за 5-НТ в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

интерполарните подядра ($p > 0.9999$), както и между оралните (5-НТ-SpVo) и каудалните подядра (5-НТ-SpVc) ($p > 0.9999$). Освен това не бяха наблюдавани значителни разлики между интерполарните и каудалните подядра ($p > 0.9999$). Взети заедно, тези резултати показват последователен модел на експресия на 5-НТ в оралните, интерполарните и каудалните подядра на гръбначния мозък, което предполага потенциални функционални сходства или регулаторни механизми, управляващи серотонинергичната сигнализация в тези анатомични подразделения.

Тестът на *Kruskal-Wallis* беше приложен за сравняване на интензивността на имунооцветяване за 5-НТ в трите различни подядра на спиналното тригеминално ядро (фиг. 5.15). По-конкретно, оценихме нивата на експресия на 5-НТ в оралното подядро (5-НТ-SpVo), интерполарното подядро (5-НТ-SpVi) и каудалното подядро (5-НТ-SpVc). Резултатите от този тест не разкриха статистически значими разлики в разпределението и експресията на 5-НТ сред тези подядра $H(2) = 0.5416, p = 0.7628$.

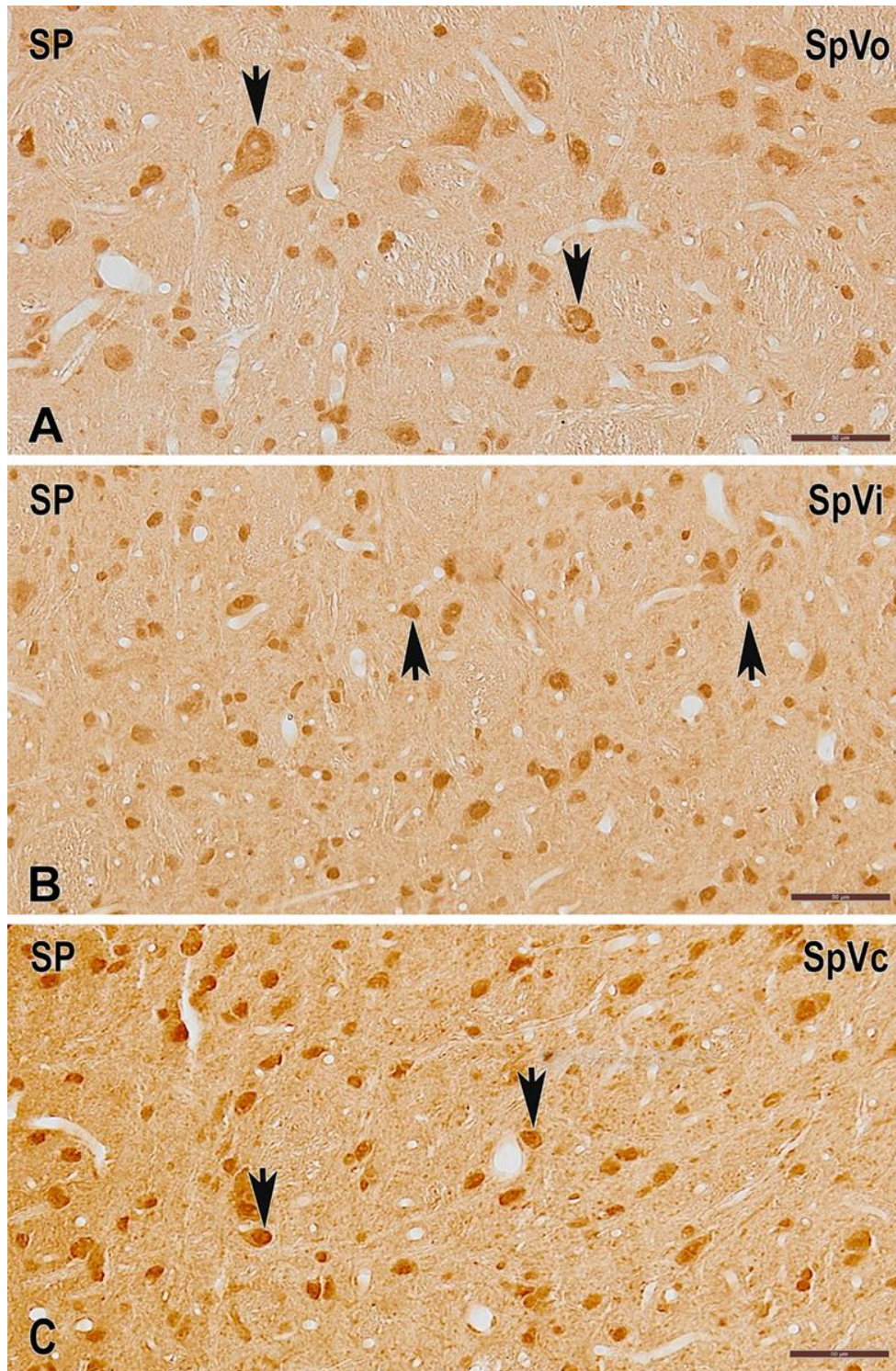
Това наложи впоследствие да се изследват допълнително потенциалните вариации в експресията на 5-НТ между подяддрата, като за целта беше проведен *post hoc* анализ с помощта на теста на *Dunn*. Този тест потвърди липсата на статистически значими разлики в експресията на 5-НТ между оралните и

5.2.1.4 Субстанция Р

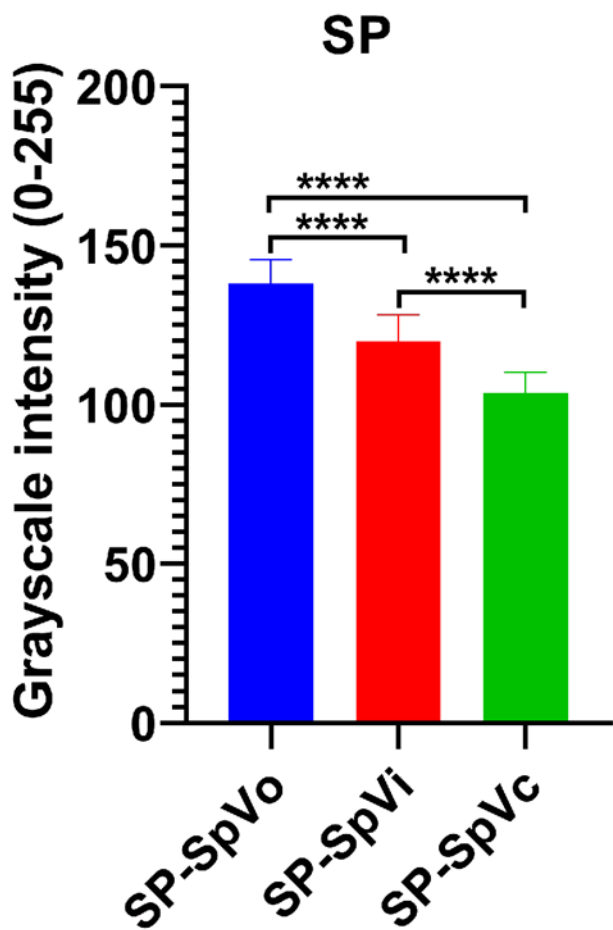
За да изследваме наличието и разпределението на субстанция Р-имунореактивност в отделните анатомичните дялове на спиналното тригеминално ядро (SpV), в настоящото проучване сме използвали индиректни имунохистохимични техники с анти тяло срещу този ундекапептид.

Резултатите показаха, че субстанция Р беше силно експресирана по цялото протежение на спиналното тригеминално ядро, включително в трите му различни подядра (каудално, интерполарно и орално) (фиг. 5.16).

Светлинномикроскопската имунохистохимия разкри наличие на субстанция Р-имунопозитивни неврони в спиналното тригеминално ядро, с вариращи размери на техните перикариони. Наблюдават се имунореактивни клетъчни тела на неврони по цялото протежение и на трите подядра. Прави впечатление, че реакцията е по-интензивна в каудалното подядро спрямо останалите (фиг. 5.16С). Също така, изглежда, че малките по размер спинални тригеминални неврони показват по-силна имунореакция спрямо онези с по-големи размери.



Фигура 5.16. Експресия на субстанция P (SP) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Имунореактивни неврони с различни размери и вариращи по форма перикариони са показани със стрелки. Мащабна скала = 50 µm.



Фигура 5.17. Стълбчеста диаграма, представяща интензитета на оцветяване за SP в трите подядра на спиналното тригеминално ядро.

една от средните стойности в различните части на ядрото се различава значително от останалите. В този случай сме използвали допълнителни post hoc тестове, за да определим кои конкретни части на ядрото се различават една от друга. HSD post hoc тестът на Tukey показва, че експресията на SP в оралната част на ядрото (SP-SpVo) е статистически значимо по-ниска в сравнение с интерполарната част (SP-SpVi) ($p < 0.0001$, 95% C.I. = [12.75 до 23.43]) и каудалната SP-SpVc ($p < 0.0001$, 95% C.I. = [29.07 до 39.63]). Интензитетът на сивата скала за SP в интерполарната и каудалната част на ядрото се различава статистически значимо, като интерполарната област е с по-слаба експресия на невропептида SP в сравнение с каудалната област ($p < 0.0001$,

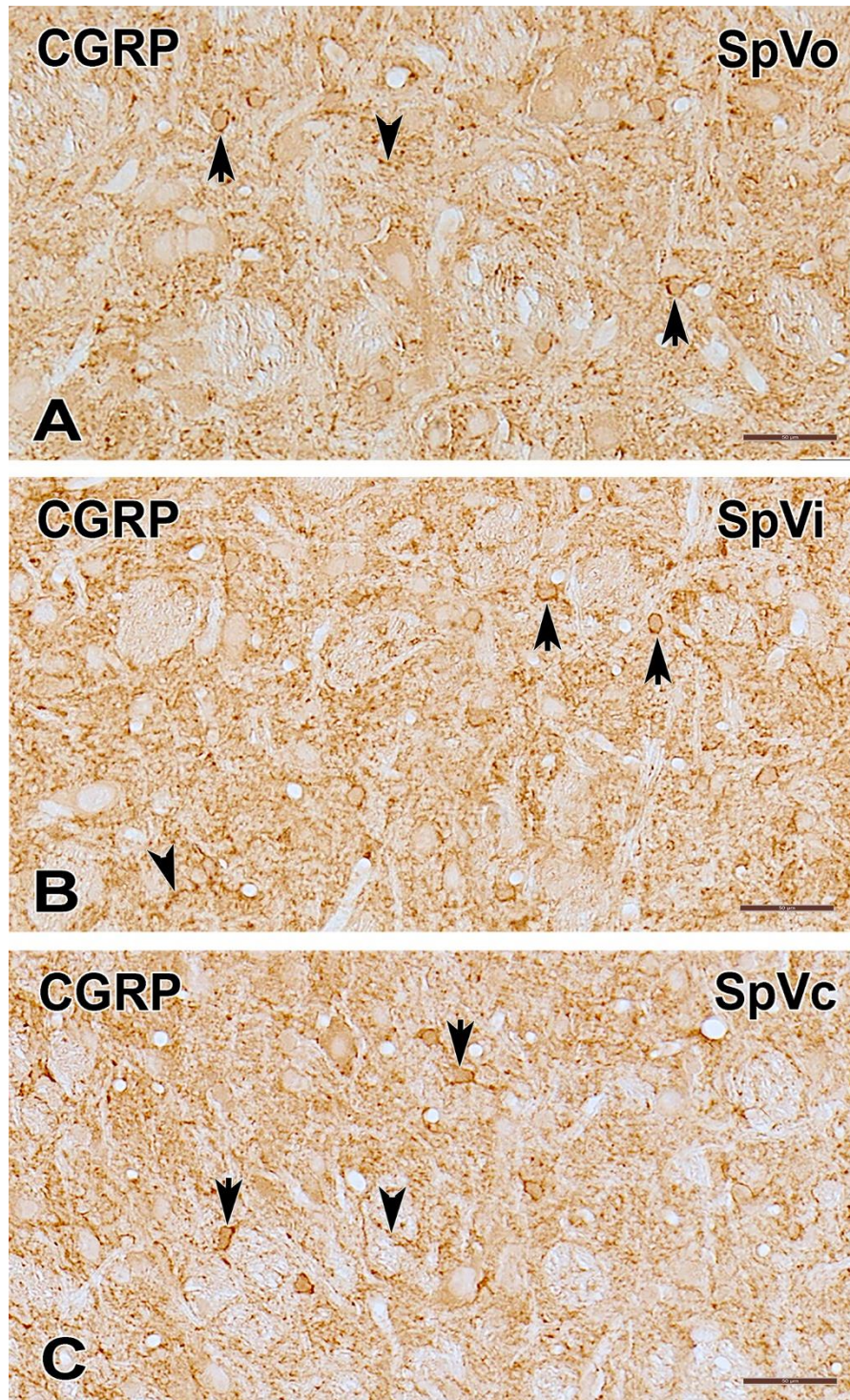
С цел да сравним експресията на субстанция P (SP) в трите части на спиналното тригеминално ядро в експерименталните животни, тъй като получените данни бяха нормално разпределени, решихме да извършим еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Тестът ANOVA изчислява F-статистиката, която е съотношение между вариацията в отделните части на ядрото и вариацията в рамките на самата част от ядрото. ANOVA тестът показва, че има статистически значима разлика в средната стойност между групите [$F(2, 65) = 121.9, p < 0.0001$]. Тъй като F-статистиката е достатъчно голяма и свързаната с нея p-стойност е по предварително определено ниво на значимост ($p < 0.05$), това означава, че има сериозни доказателства, че поне

95% C.I. = [10.62 до 21.60]). Тестът на *Tukey* определя дали извадката ни се състои от области, които се различават една от друга. Всяка средна стойност се сравнява със средната стойност на всички останали групи, като се използва "честната значима разлика", която показва колко далеч са областите една от друга. 95% C.I. е доверителния интервал. Средните стойности и стандартното отклонение (SD) в отделните части на ядрото бяха както следва: SP-SpVo (средна стойност = 138, SD = 7.498), SP-SpVi (средна стойност = 120, SD = 8.369) и SpVc (средна стойност = 103.7, SD = 6.442) (фиг. 5.17).

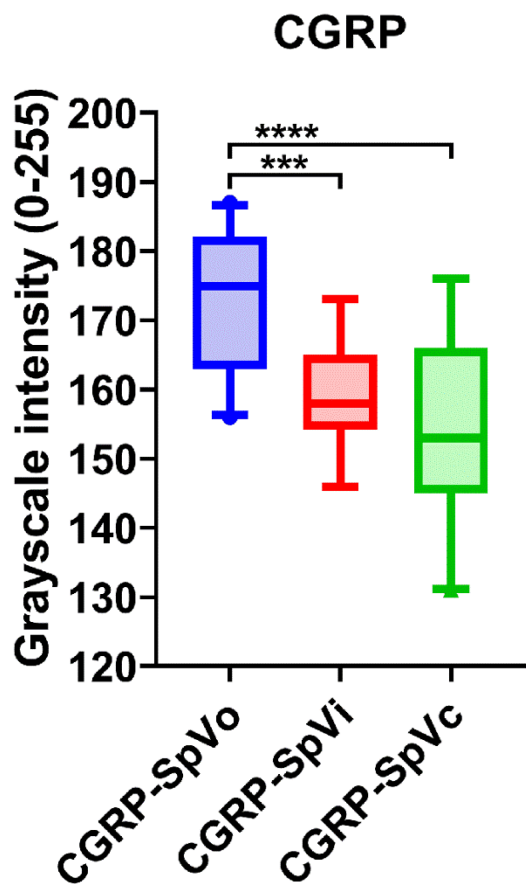
5.2.1.5 Калцитонин ген-свързан пептид

Проучването на моделите на експресия на CGRP предостави важна нова информация за неврохимичния състав на спиналното тригеминално ядро (SpV). Нашият анализ на клетъчно ниво показва, че калцитонин генно-свързаният пептид се експресира последователно в телата на определени неврони, разположени по протежението на спиналното тригеминално ядро (фиг. 5.18).

Освен разпознаваема експресия в невроналните тела, нашето проучване разкри наличие и на имунопозитивни нервни влакна. Много нервни влакна в подядрата се оказват имунопозитивни. Наблюдавахме също някои неврони да са имунопозитивни за CGRP. Тези неврони са овални по форма и спадат към клетки с по-големи размери. Малките неврони с размери от 5 до 15 μm остават имунонегативни. Познанията ни за установено присъствие на CGRP-имунореактивни влакна в ядрото дават допълнителен принос към разбиране ролята на медиатор върху обработката и предаването на болковата информация в спиналното тригеминално ядро. Разпределението на имунореактивните неврони и техните нервни влакна е подобно, без видими отклонения в трите подядра на SpV.



Фигура 5.18. Имунохистохимично оцветяване на перикариони (стрелки) и нервни влакна (глави на стрелки) за калцитонин ген-свързан пептид (CGRP) в оралното (A), интерполарното (B) и каудалното (C) подядро на спиналното тригеминално ядро. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 5.19. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за CGRP в в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

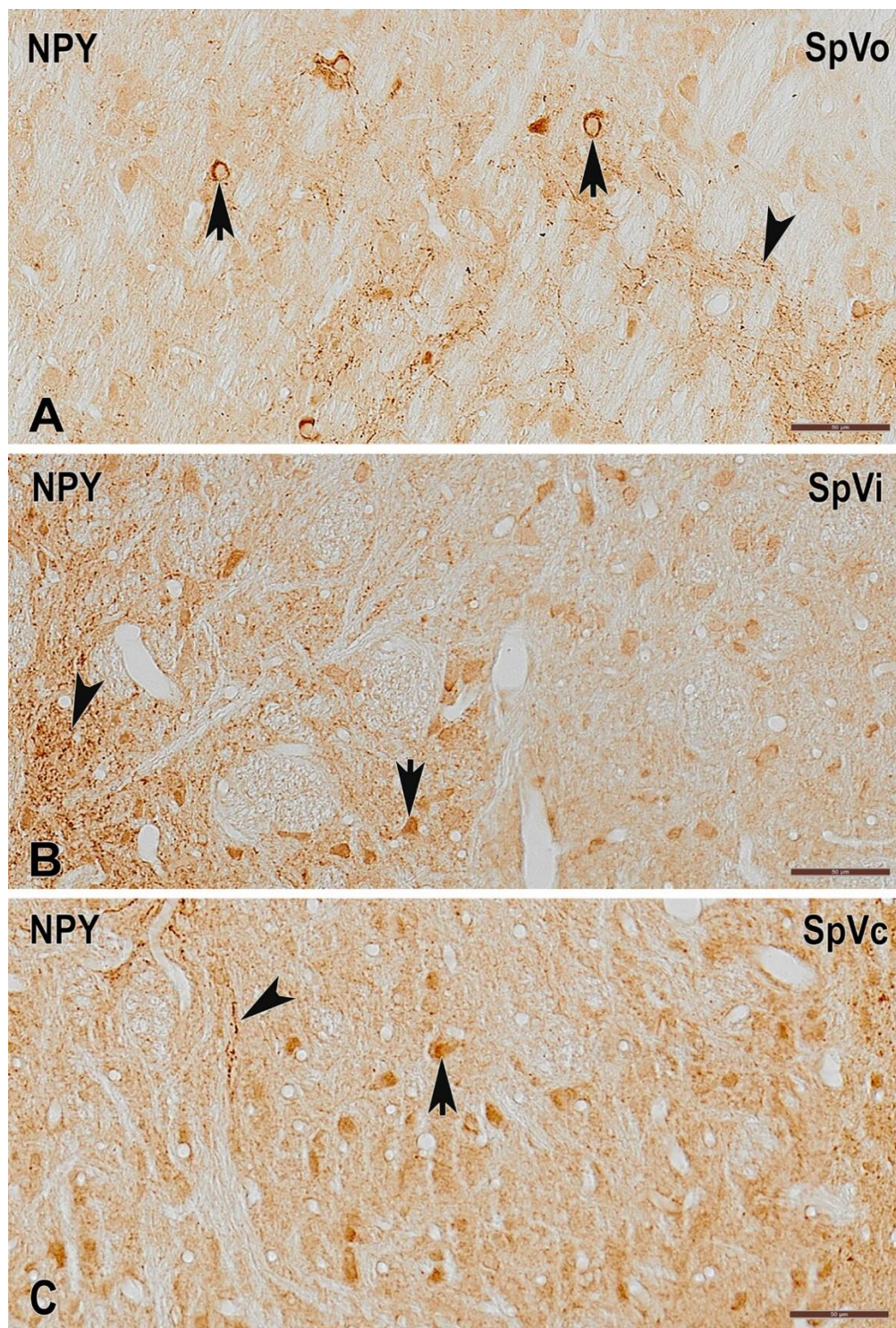
Тестът на *Kruskal-Wallis* сме приложили като надежден непараметричен тест при сравняване на интензитета на оцветяване за CGRP в трите части на спиналното тригеминално ядро. Тестът показва значими различия в експресията на CGRP и стойностите на медианите (Mdn) в изследваните три подядра на това ядро, а именно: орално подядро (CGRP-SpVo) (Mdn = 175), интерполарно подядро (CGRP-SpVi) (Mdn = 158) и каудално подядро (CGRP-SpVc) (Mdn = 153), $H(2) = 26.41$, $****p < 0.0001$. След теста на *Kruskal-Wallis*, ние прибягнахме към post hoc анализ, като за целта сме използвали теста за множествоно сравнение – тест на *Dunn*. Тестът на *Dunn* показва статистически значими различия в експресията на CGRP между оралното и интерполарното подядро на спиналното тригеминално ядро ($***p < 0.0004$) и между оралното (CGRP-SpVo) и каудалното подядро (CGRP-SpVc) на спиналното тригеминално ядро ($****p < 0.0001$). Най-силна е експресията на CGRP в каудалното подядро, по-слаба е в интерполарното подядро и най-слаба е тя в оралното подядро (фиг. 5.19). Интензитетът на оцветяване в интерполарното и каудалното подядро не показва статистически значими различия ($p = 0.9373$).

5.2.1.6 Невропептид Y

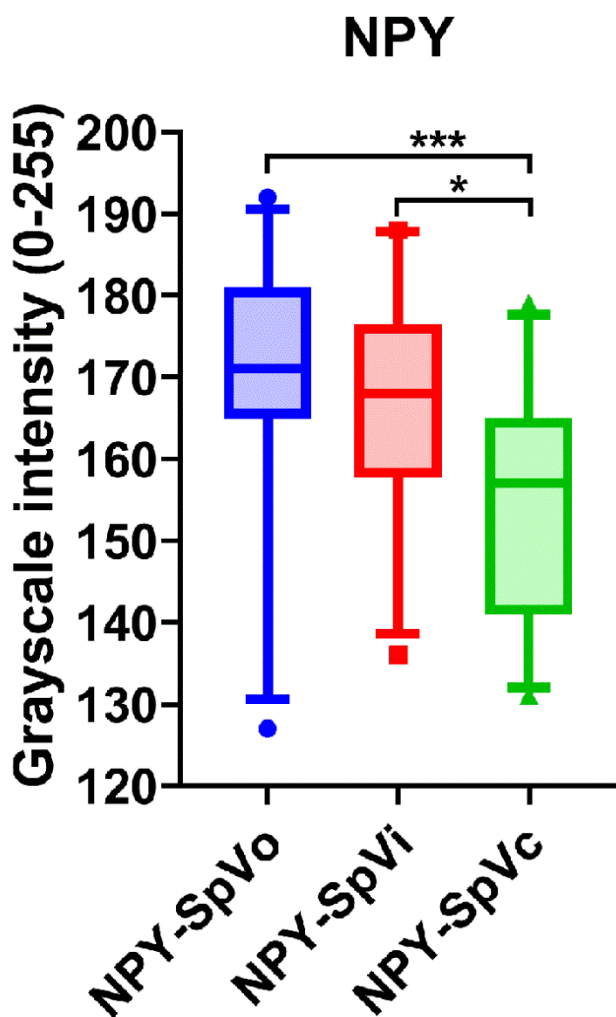
Светлинномикроскопското изследване на имунооцветените срезове предостави ценна информация, и за наличието и разпределението на невропептид Y (NPY) в структурните компоненти на SpV на плъхове. Нашите резултати потвърждават, че невроните в подядрата на SpV на плъх съдържат NPY (фиг. 5.20).

Имунопозитивността за този пептид присъства в относително малък процент от спиналните тригеминални неврони, като реакционен продукт се открива в някои перикариони на неврони във всички подядра на SpV, макар и с различен модел на разпределение на имунореактивните структури. Реакционният продукт беше отложен в периферните зони на невронални перикариони в трите спинални тригеминални подядра. Освен това, беше установено наличие на голям брой варикозни нервни влакна и техните окончания в ядрото. Този комплексен модел на имунореактивност добавя още едно ниво на сложност към неврохимичния профил на SpV, като показва селективно ангажиране на NPY в определени популации от неврони.

Топографското разпределение на експресията на NPY по ростро-каудалната ос на SpV разкри сходна картина на имунореактивност в трите подядра – SpVo, SpVi, SpVc, в които последователно бяха установени приличащи си модели на разпределение на имунопозитивните клетъчни тела и нервни влакна. Широкото разпространение на NPY предполага по-важна роля на този пептид в регулирането на сензорната обработка в няколко функционални зони в рамките на спиналното тригеминално ядро.



Фигура 5.20. Имунохистохимично оцветяване за невропептид Y (NPY) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на SpV. Наблюдават се множество имунопозитивни за NPY перикариони (стрелка) и нервни влакна (връх на стрелка). Мащабна скала = 50 µm.



Фигура 5.21. Бокс-плот диаграми графично представящи интензитета на оцветяване за NPY в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

разлика в имунопозитивността на NPY между каудалните (NPY-SpVc) и оралните (NPY-SpVo) подядра на SpV (**p = 0.0004). Освен това беше установено, че разликите в интензитета на имунооцветяване между каудалните и интерполарните подядра са статистически значими (*p = 0.0115) (фиг. 5.21).

За да сравним интензивността на оцветяването за NPY в трите части на спиналното тригеминално ядро, използвахме непараметричния тест на *Kruskal-Wallis*. В трите тествани подядра на SpV – оралното подядро (NPY-SpVo) (Mdn = 171), интерполарното подядро (NPY-SpVi) (Mdn = 168) и каудалното подядро (NPY-SpVc) (Mdn = 157), този тест разкри значителни разлики в експресията на NPY и стойностите на медианите (Mdn). $H(2) = 15.78$, ***p = 0.0004. Използвахме теста на *Dunn*, за да проведем post hoc анализ след теста на *Kruskal-Wallis*. Между оралните и интерполарните подядра на SpV тестът на *Dunn* не показва статистически значими разлики в експресията на NPY (p > 0.9999). Резултатите от този тест, обаче, показаха статистически значима

5.2.2. Газови невромодулатори

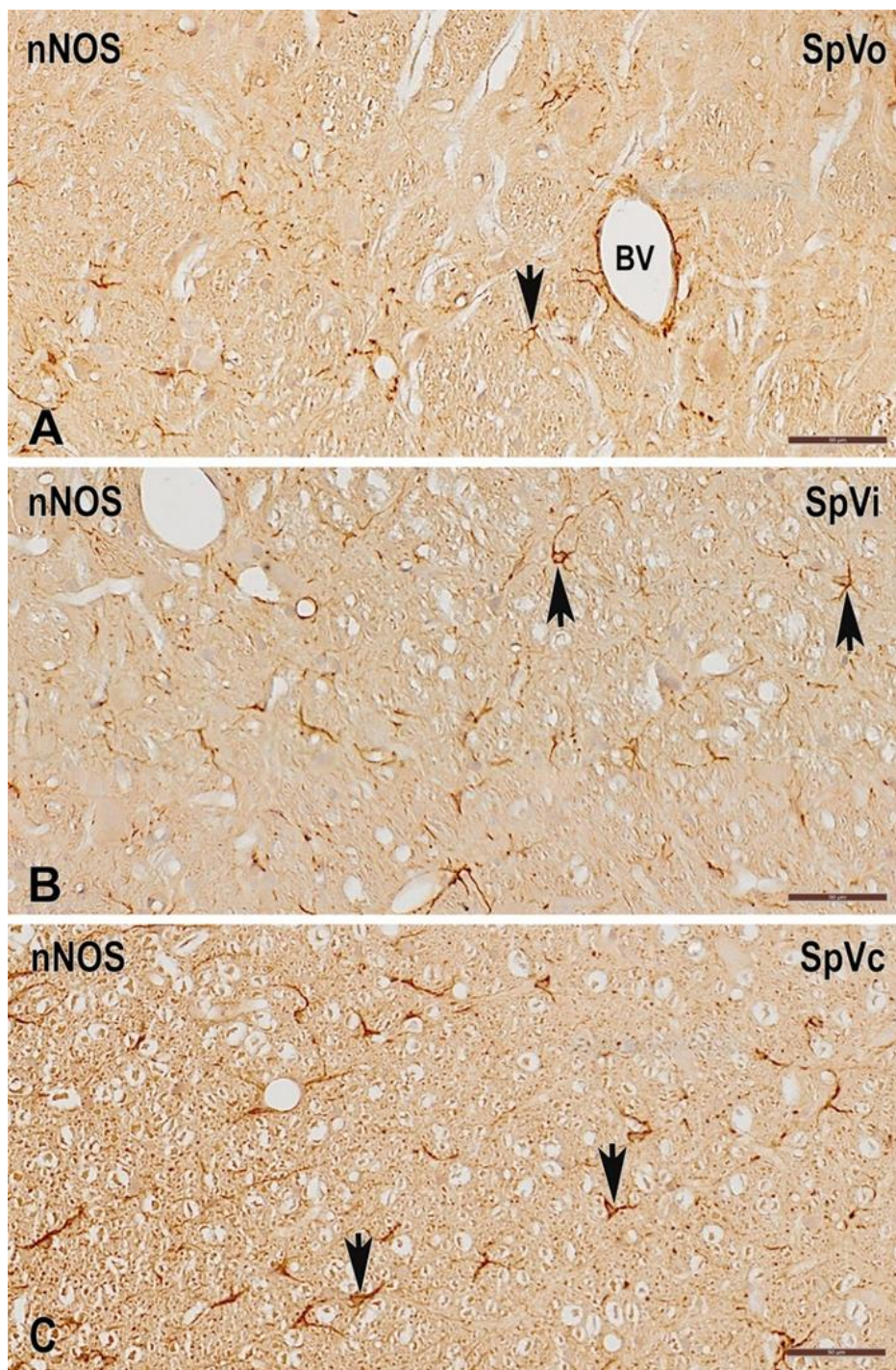
5.2.2.1 Азотен оксид

За да разкрием наличието на тази газообразна молекула в спиналното тригеминално ядро на плъх, ние демонстрирахме чрез имунохистохимични методи експресията в ядрото на невроналната изоформа на синтезиращия ензим, азотен оксид синтаза (nNOS).

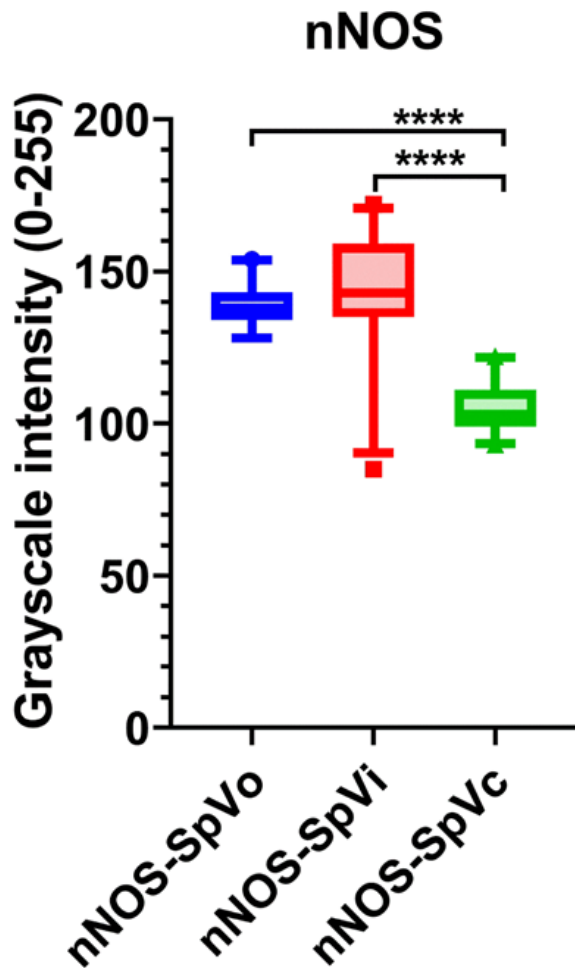
Нашият имунохистохимичен анализ показва, че nNOS е силно експресиран в спиналното тригеминално ядро, като имунооцветяването се открива най-вече в перикарионите и нервните израстъци на някои неврони в него. Наред с това, ние установихме, че глиалните клетки, които обграждат кръвоносните съдове в ядрото, имат силно имунохистохимично оцветяване за nNOS (фиг. 5.22).

Наблюдаваните от нас nNOS-имунореактивни нервни влакна бяха видени да пресичат спиналното тригеминално ядро. Гореспоменатото находка подчертава съществуването на ензима в невронните вериги, отговорни за предаването на сензорни данни през SpV, като по този начин свързва nNOS с регулирането на ноцицептивните сигнали по време на преминаването им през този важен мозъчен център. Имунопозитивните неврони са обикновено с малки размери и с различна форма на техните перикариони. Техните израстъци показват силна по интензитет реакция. Голяма част от кръвоносните съдове са обгърнати от имунопозитивни клетки и техните израстъци за nNOS.

Също така картографирахме разпределение на nNOS-положителните клетки в каудалните, интерполарните и оралните подразделения на спиналното тригеминално ядро. Този широк обхват на експресия подчертава колко разпространен е nNOS по цялата надлъжна ос на SpV. Разпределението на реакцията за това активно вещество е много сходно в трите подядра – имунопозитивни остават нервните израстъци близо до клетъчните тела на невроните, перикарионите на малките клетки и глиалните клетки, обгръщащи кръвоносните съдове.



Фигура 5.22. Експресия на невроналната форма на азотен оксид синтаза (nNOS) в нервните клетки около кръвоносни съдове (BV) и тела на неврони (стрелки) в оралното (SpVo) (A), интерполарното (SpVi) (B) и каудалното (SpVc) (C) подядро на спиналното тригеминално ядро. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 5.23. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за nNOS в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

На следващ етап на проучването, ние приложихме теста на *Kruskal-Wallis*, за да оценим интензивността на оцветяването на nNOS в трите различни подядра на SpV. Тези подядра включват оралното (nNOS-SpVo), интерполарното (nNOS-SpVi) и каудалното (nNOS-SpVc). Тестът на *Kruskal-Wallis* разкри значителни разлики в експресията на nNOS сред трите спинални тригеминални подядра $H(2) = 39.60$, $****p < 0.0001$. Стойностите на медианите (Mdn) варират в отделните части, като най-високата стойност се наблюдава в интерполарното подядро (Mdn = 143), следвано от оралното подядро (Mdn = 138), а най-ниската медиана е тя в каудалното подядро (Mdn = 103). Колкото е по-висока стойността на медианата, това означава, че се наблюдава по-слаба експресия и обратно, колкото е по-ниска стойността, то установената експресия е по-висока.

След теста на *Kruskal-Wallis* проведохме post hoc анализ, използвайки теста за множествено сравнение на *Dunn*, за да изясним допълнително специфичните разлики в експресията на nNOS между подядрата. Тестът на *Dunn* показва, че няма статистически значими разлики в експресията на nNOS между оралните и интерполарните подядра ($p > 0.9999$). Въпреки това се наблюдава статистически значима разлика между оралните (nNOS-SpVo) и каудалните (nNOS-SpVc) подядра на спинално тригеминално ядро ($****p < 0.0001$),

което показва различие в нивата на експресия на nNOS между тези региони (фиг. 5.23). Забележително е, че експресията на nNOS е най-силна в каудалното подядро. Нещо повече, статистически значими разлики бяха открити и между интерполарното и каудалното подядро (**** $p < 0.0001$), което подчертава различните профили на експресия на nNOS в тези анатомични подразделения на спиналното тригеминално ядро.

5.2.3. Невротрофни фактори и техните рецептори

Невроналният растежен фактор (NGF), мозъчният невротрофен фактор (BDNF), невротрофин-3 (NT-3) и невротрофин-4 (NT-4) са членове на семейството на невротрофните фактори. Като инициират сигнализация чрез нискоафинитетния (пан) невротрофен рецептор p75NTR, както и чрез високоафинитетните трансмембранны рецептори, които са рецепторни тирозин кинази (Trk) и принадлежат към семейството на протоонкогените, тези вещества насърчават развитието, оцеляването и пластичността на невроните. Това рецепторно семейство включва TrkA, TrkB и TrkC, които показват специфичност на свързване. NGF реагира с рецептора TrkA, BDNF и NT-4 - с рецептора TrkB, а NT-3 - с рецептора TrkC.

5.2.3.1 Невронален растежен фактор

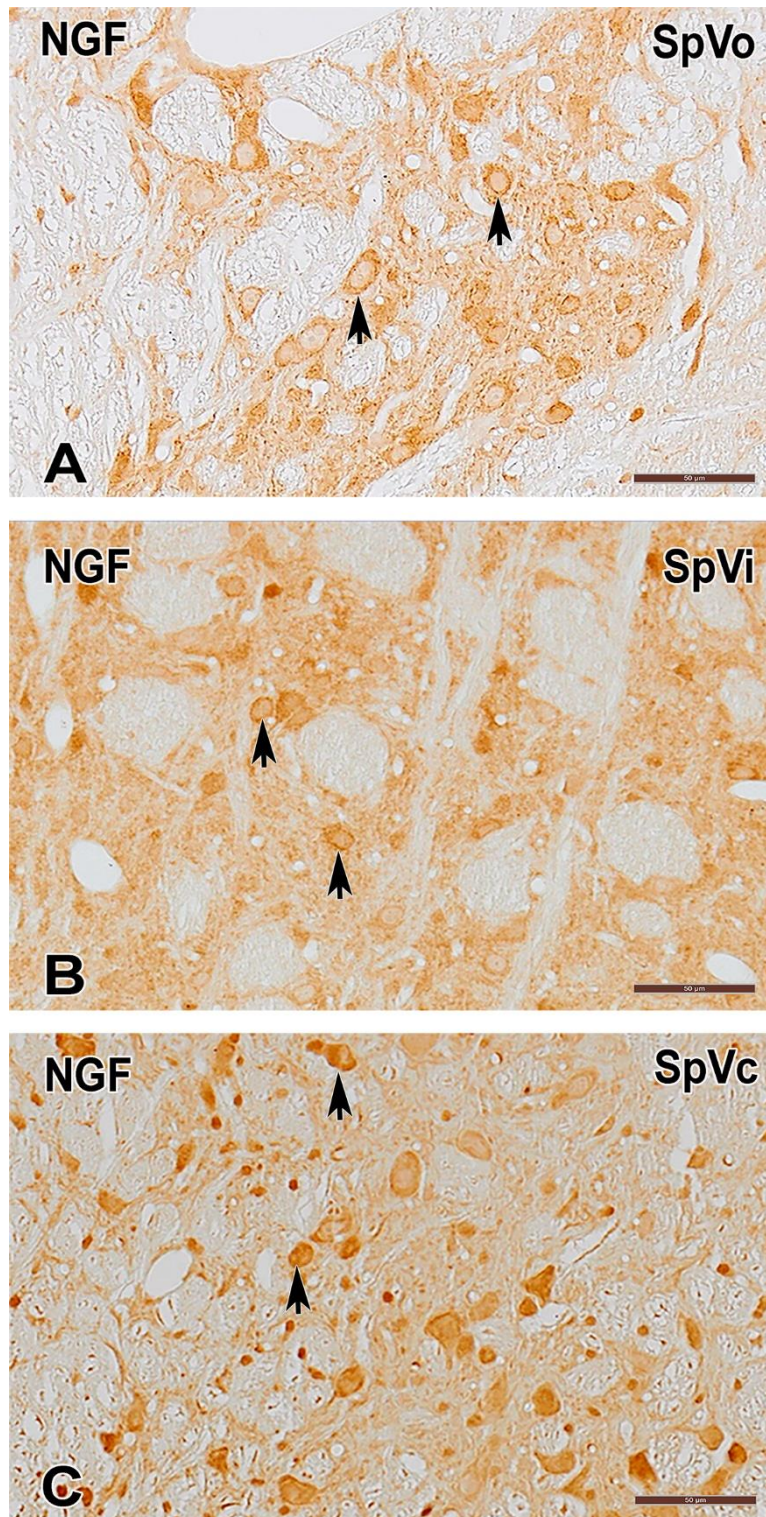
Невроналният растежен фактор (NGF), ключов невротрофен фактор, участващ в оцеляването, диференциацията и синаптичната пластичност на невроните, показва различни модели на имунореактивност в трите подядра на спиналното тригеминално ядро (SpV). Нашите имунохистохимични експерименти и последващият статистически анализ на получените резултати дават подробна и надеждна представа за пространственото разпределение на експресия на NGF в тези анатомични подразделения (фиг. 5.24).

В каудалното подядро имунореактивността на NGF се проявява като специфично оцветяване, локализирано предимно в невронните клетъчни тела.

Имунопозитивност с висока плътност се наблюдава в перикарионите на спиналните тригеминални неврони, което показва значителна експресия на NGF в този регион.

Експресията на NGF в интерполарното подядро показва модел на разпределение, сходен с този, наблюдаван в SpVc, по отношение на интензивността на оцветяването и локализацията на реакционния продукт. Имунореактивността за NGF се наблюдава в перикарионите на невроните, което показва силен синтез и секреция на NGF в SpVi.

В рамките на оралното спинално тригеминално подядро имунореактивността на NGF очертава подобен профил на протеинна експресия както в другите две подядра, характеризиращ се с умерен интензитет на оцветяване, локализиран предимно в невронните перикариони. Наличието на NGF-положителни нервни влакна допълнително подчертава участието на NGF сигнализацията в модулирането на синаптичната свързаност и пластичността в този подядрен дял на спиналното тригеминално ядро.



Фигура 5.24. Експресија на NGF в клетъчните невронални тела (стрелка) в оралното (*SpVo*) (A), интерполарното (*SpVi*) (B) и каудалното (*SpVc*) (C) подядро на *SpV*. Мащабна скала = 50 μm .

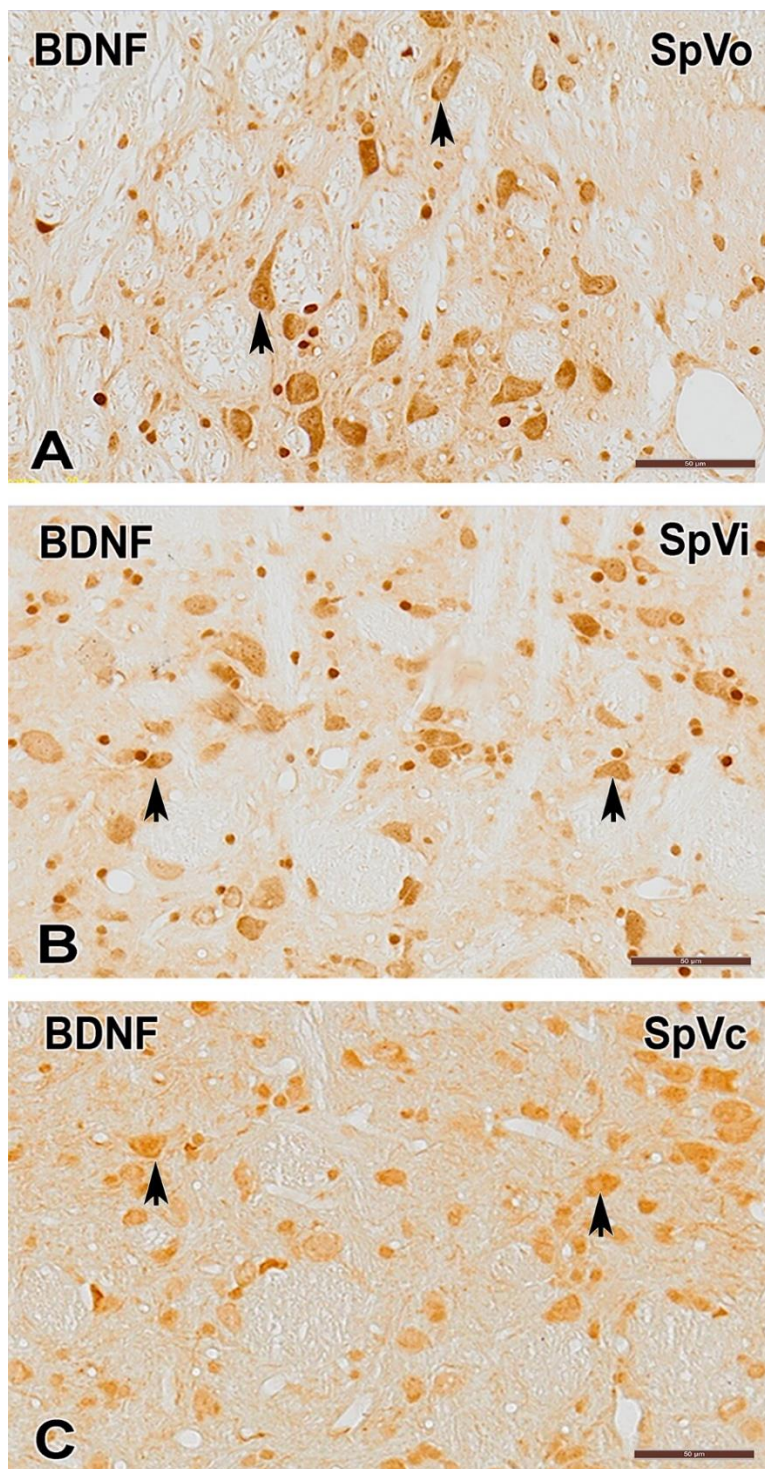
5.2.3.2 Мозъчен невротрофен фактор (BDNF)

В рамките на трите подядра на SpV, BDNF показва характерни модели на имунореактивност. Пространственото разпределение и нивата на експресия на BDNF в тези анатомични подразделения на ядрото са ясно демонстрирани в нашите имунохистохимични изследвания (фиг. 5.25).

В конкретен план, ние установихме, че в каудалното спинално тригеминално подядро се наблюдава силно имунооцветяване, предимно видимо в проксималните дендритни влакна и перикарионите на невроните, което е свидетелство за налична имунореактивност към BDNF. Силната имунопозитивност в тези области говори за значително производство и освобождаване на BDNF, което подчертава критичната функция на протеина в контрола на синаптичната пластичност и оцеляването на невроните в SpVc.

Въпреки, че бяха наблюдавани разлики в интензивността на оцветяването и локализацията на реакционния продукт, моделът на разпределение на експресията на BDNF във вътрешността на интерполарното подядро е сравним с този, наблюдаван в SpVc. Силна имунореактивност се наблюдава в началните сегменти на нервните израстъци и в тялото на невроните, което предполага значително производство и освобождаване на BDNF от невроните в SpVi. Освен това, предполагаемото участие на BDNF в контролиране на синаптичното предаване и пластичността в интерполарното подядро се подчертава от наличието на BDNF-положителни нервни влакна в тази анатомична област.

Профилът на експресия на BDNF в оралното подядро се характеризира с висок интензитет на оцветяване, което е разпознаваемо предимно в проксималните нервни израстъци и невронните перикариони. SpVo показва забележимо по-високи нива на експресия на BDNF в сравнение със SpVc и SpVi, което подчертава ролята на протеина в регулирането на синаптичната връзка и пластичността в тази субнуклеарна област.



Фигура 5.25. Имунохистохимична експресия на BDNF в проксималните дендритни израстъци и перикарионите на невроните (стрелки) в оралното (SpVo) (A), интерполарното (SpVi) (B) и каудалното (SpVc) (C) подядро на SpV. Със стрелки са обозначени имунореактивните неврони в трите подядра. Мащабна скала = 50 μ m.

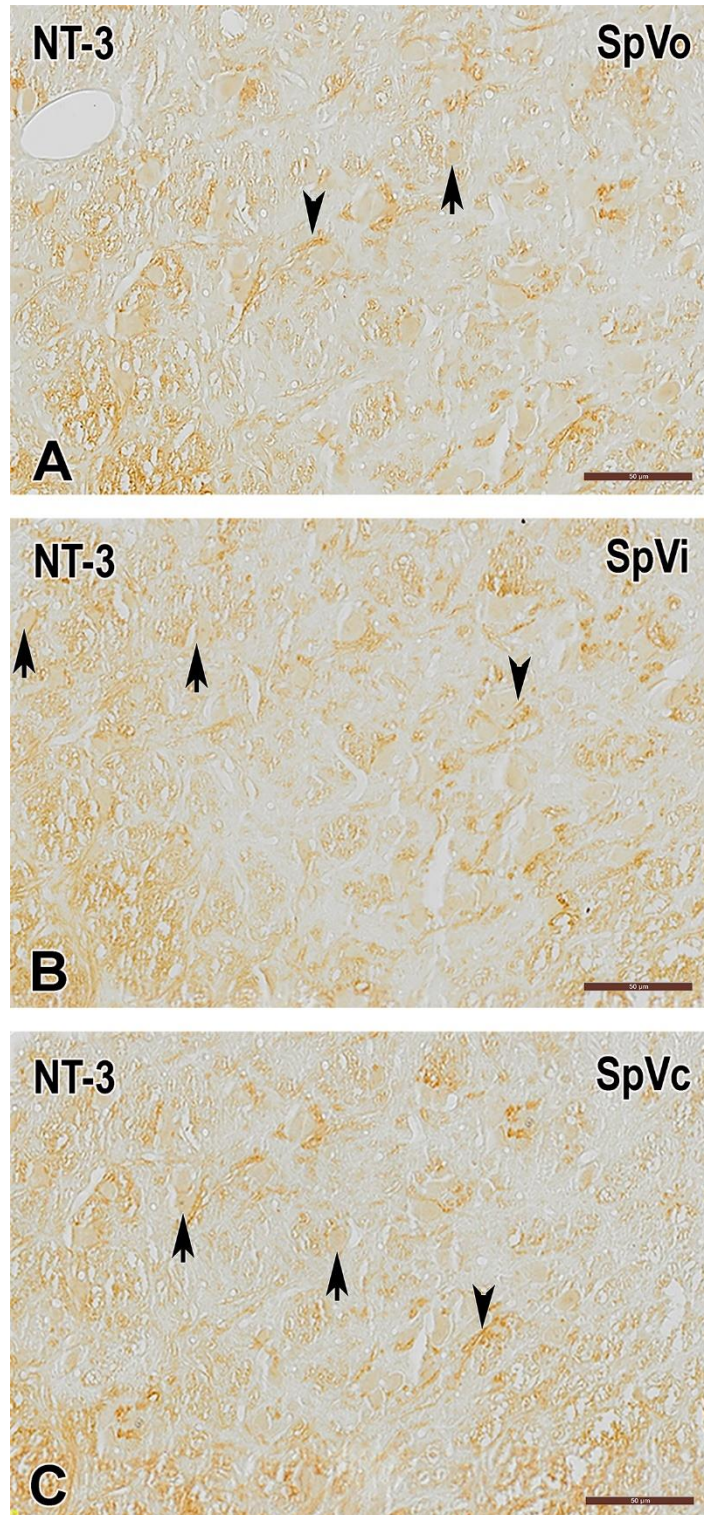
5.2.3.3 Невротрофин-3

Друг член на семейството на невротрофините, NT-3, е от съществено значение за синаптичната пластичност, оцеляването и диференциацията на невроните. Трите подядра на SpV показват разнообразни модели на експресия на NT-3, което с оглед на имунохистохимичните находки може да се дължи на различните му регулаторни функции в тези анатомични подразделения (фиг. 5.26).

Имунореактивността на NT-3 се наблюдава ясно в невронните перикариони и особено силно в нервните влакна, което предполага, че NT-3 се намира в по-големи количества в тази област. Клетъчните тела с положителна реакция са преобладаващо със средни и големи размери. Забелязва се много добре по-високият интензитет на имунореакцията в нервните влакна в сравнение с този в перикарионите. Нещо повече, идентифицирането на NT-3-имуноположителни нервни влакна, които прекосяват SpVc, подсказва функцията му в регулирането на невропластичността и синаптичната връзка в този подядрен дял.

Подобно на SpVc, експресията на NT-3 в интерполарното подядро показва модел на разпределение без особено разлики в интензивността на оцветяването и локализацията. Неврните влакна проявяват силна имунореактивност. Допълнително доказателство за функцията на интерполарното подядро в контрола на синаптичната трансмисия и пластичността в тази анатомична област идва от наличието на NT-3-положителни нервни влакна в тази област.

Експресионният профил на имунореактивността на NT-3 вътре в оралното подядро се характеризира с умерен интензитет на оцветяване, което до голяма степен се визуализира в нервните влакна, пресичащи подядрото. Наличието на NT-3-имунореактивни нервни влакна подчертава ролята, която NT-3 играе в регулирането на синаптичната връзка и пластичността в тази област на SpV.



Фигура 5.26. Имунохистохимична локализация на NT-3 в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на SpV. С връх на стрелка са обозначени NT-3 имунопозитивни влакна, а със стрелка са посочени перикариони със слаба имунореакция. Мащабна скала = 50 µm.

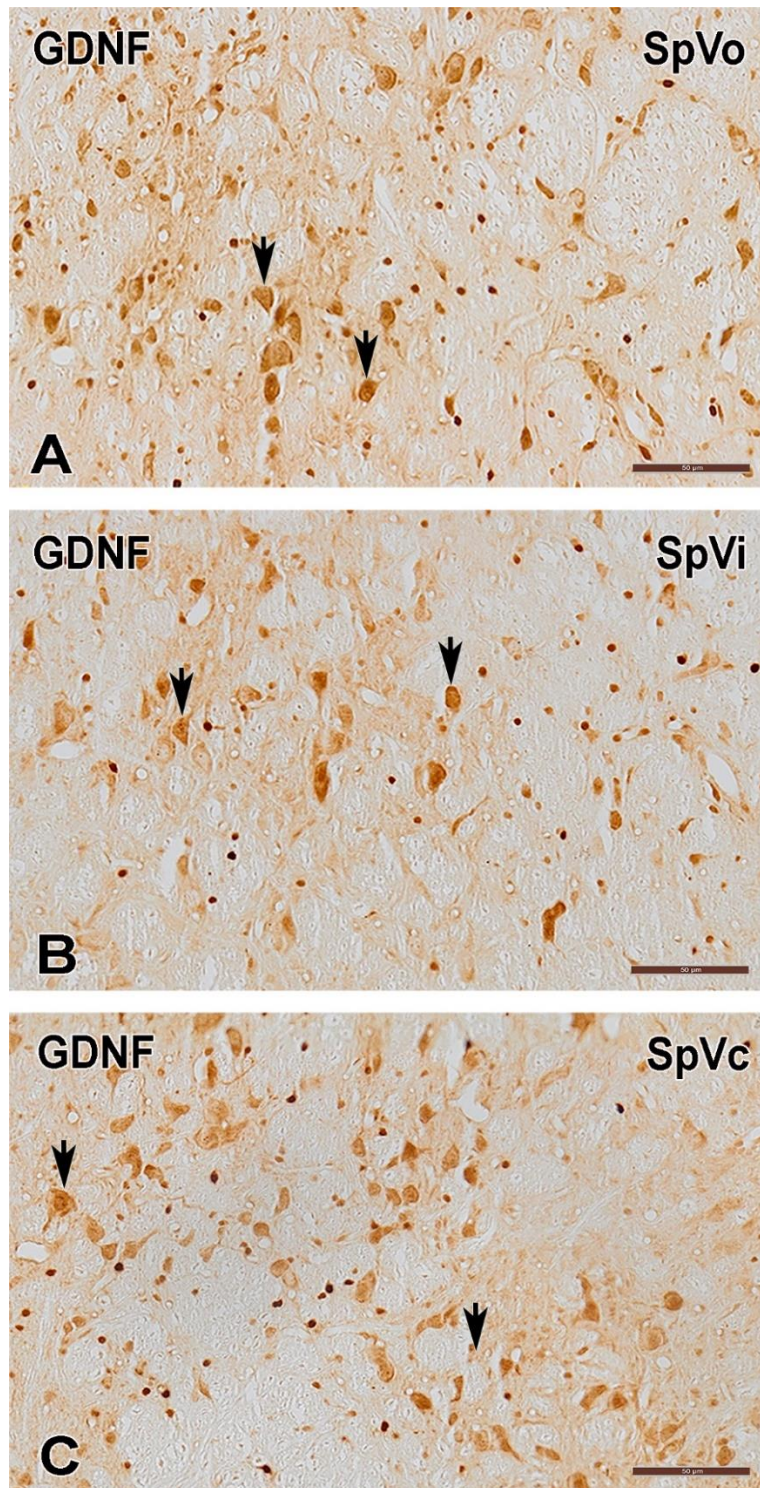
5.2.3.4 Глиален невротрофен фактор

Сред членовете на суперсемејството на трансформиращия растежен фактор- β , глиалният невротрофен фактор (GDNF) е от съществено значение за оцеляването и поддържането на невроните в централната и периферната нервна система. Имунохистохимичното изследване показва различни модели на експресия на GDNF във всяко от три подядра на спиналното тригеминално ядро (SpV), подчертавайки възможната функция на този невротрофен фактор в контрола на сензорната обработка и невронната пластичност в лицевата област.

Имунопозитивността за GDNF е ясно видима в невронните перикариони и проксималните израстъци в каудалното подядро. Силният интензитет на оцветяване сочи значителна продукция и секреция на GDNF в SpVc, което подсказва ролята му в контрола на синаптичната пластичност и оцеляването на невроните в този анатомичен дял (фиг. 5.27).

В хода на експериментите, ние не успяхме да установим значителна количествена разлика в интензивността на оцветяването и локализацията, затова експресията на GDNF в интерполарното подядро показва модел на разпределение, подобен на този, наблюдаван в SpVc. Умерената имунореактивност се наблюдава в клетъчните тела на различни по размер неврони, което предполага, че SpVi значително синтезира и секретира GDNF.

Профилът на експресия на GDNF в оралното подядро се характеризира с висок интензитет на имунооцветяване, което до голяма степен е ограничено във вътрешността на невронните перикариони и техните проксимални израстъци. SpVo показва по-високи нива на експресия на GDNF в сравнение със SpVc и SpVi; GDNF-имуноположителните нервни влакна на субнуклеарния домейн демонстрират ролята на този невротрофин в регулирането на синаптичната връзка и пластичността.



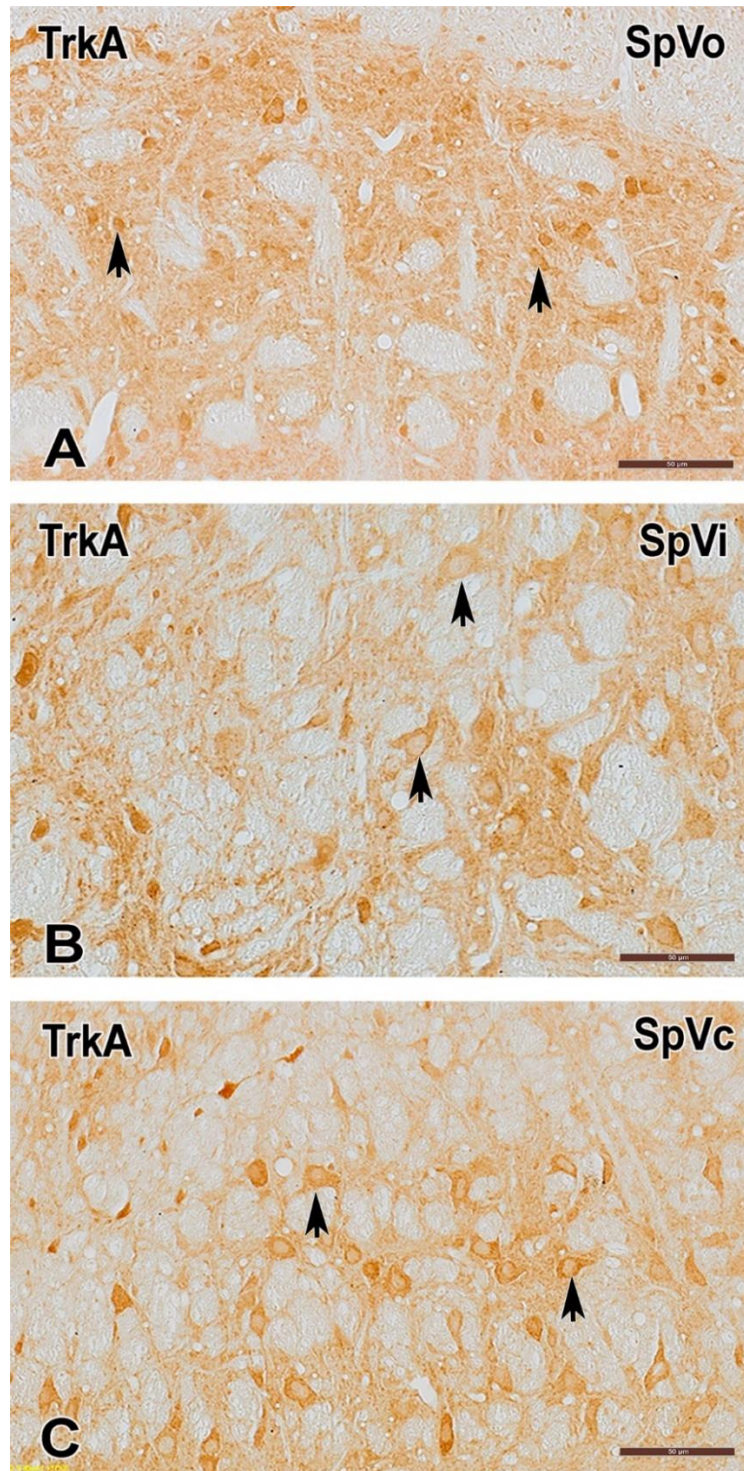
Фигура 5.27. Имунохистохимична локализация на GDNF в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на SpV. Със стрелки са показани имунобелязани нервни профили с различен размер и форма. Наблюдава се по-интензивна реакция в перикарионите на малките по размер неврони. Мащабна скала 50 μm .

5.2.3.5 Тропомииозин рецепторна киназа-А

Високоафинитетният рецептор за NGF тропомииозин рецепторната киназа А (TrkA), е от съществено значение за модулиране на невронната преживяемост, диференциация и синаптична пластичност в ЦНС и ПНС. Спиналното тригеминално ядро (SpV) показва подобни модели на TrkA имунореактивност в трите си подядра, което подчертава възможната функция на този селективен рецептор в регулирането на сензорната обработка и невропластичността в краниофациалната област. Имунореактивността за TrkA е широко представена в каудалното подядро, като показва подчертано оцветяване в невронните перикариони (фиг. 5.28).

Експресията на TrkA в интерполарното подядро показва модел на разпределение като този на SpVc, но с по-силен интензитет на имунооцветяването. Силна имунореактивност се наблюдава в телата на невроните, което предполага основен механизъм на сигнализация, медиран от TrkA в SpVi.

TrkA позитивността в оралното подядро определя профил на експресия с висок интензитет на оцветяване, който е концентриран предимно в невронните перикариони. Имунопозитивните неврони са със средни и големи размери. Видимо нивата на експресия на TrkA в SpVo са по-високи, отколкото в SpVc и SpVi. И в трите подядра се забелязва, че голяма част от нервните влакна, които прекосяват SpV, остават имунонегативни за TrkA.



Фигура 5.28. Имунохистохимична локализация на TrkA в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на SpV. Със стрелки са отбелязани телата на невроните с положителна имунохистохимична реакция. Перикарионите попадат в групата на неврони със среден и голям размер. Мащабна скала = 50 μ m.

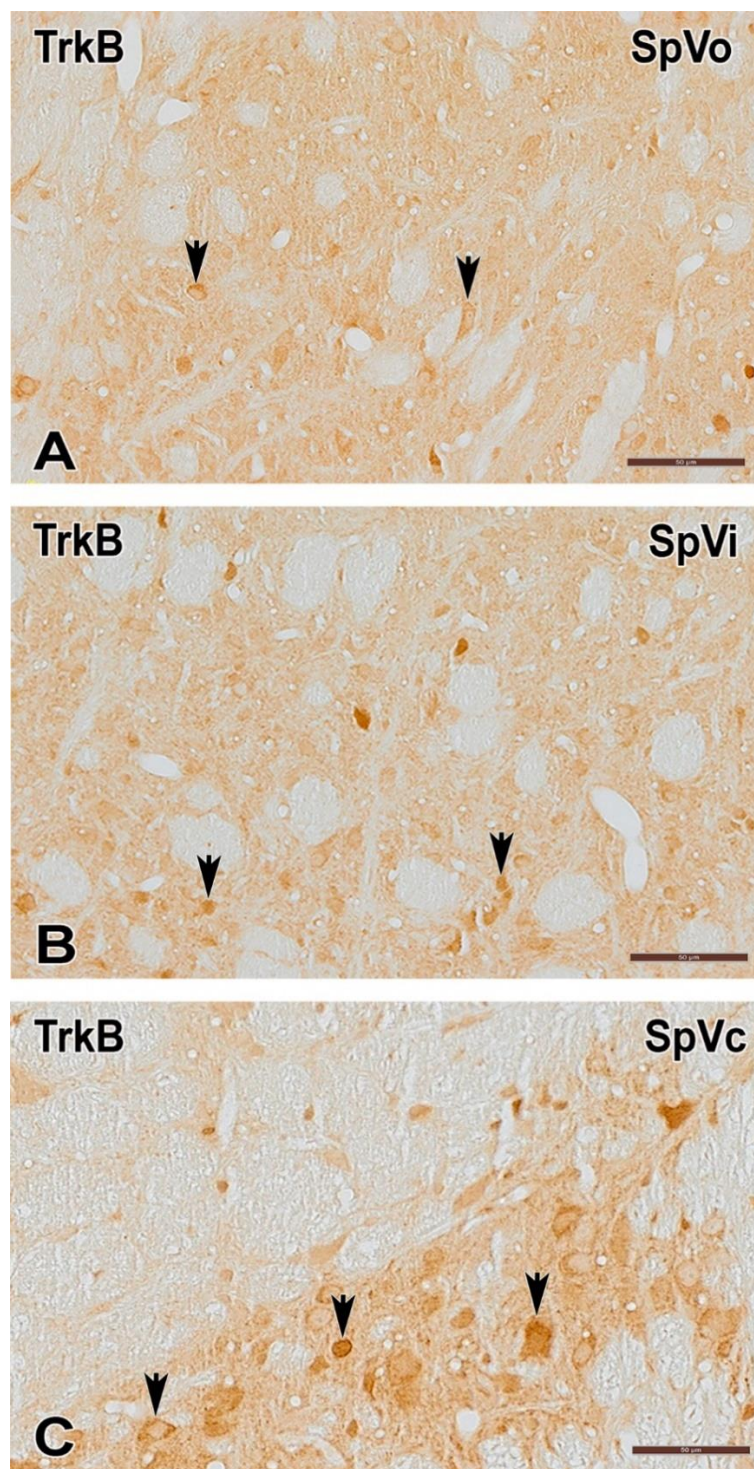
5.2.3.6 Тропомиозин рецепторна киназа-В

С помощта на светлинномикроскопска имунохистохимия е установена експресията на TrkB в подразделенията на спиналното тригеминално ядро (SpV). Резултатите показват, че трите подядра на SpV показват различни модели на разпределение на TrkB имунореактивност (фиг. 5.29).

Имунореактивността към TrkB е широко разпространена в каудалното подядро, където тя е силно интензивна в клетъчните тела на невроните. Интересно е обаче, че имунопозитивните клетъчни тела са спорадични в това подядро и те са с различни размери. Силната експресия на TrkB подсказва, че този рецептор играе роля в медирането на сигналните пътища на BDNF, което, от своя страна, повишава пластичността, синаптичното предаване и оцеляването на невроните в SpVc.

Експресията на TrkB в интерполарното подядро следва модел на разпределение, подобен на този, наблюдаван в SpVc, но с разлики в интензивността и местоположението на оцветяването. По-слабата имунореактивност се наблюдава в перикарионите на малките по размер неврони.

Имунореактивността на TrkB в оралното подядро разкрива характерен профил на експресия с умерен интензитет на оцветяване, който е концентриран предимно в невронните перикариони на малки по размер клетки. Прави впечатление, че нивата на експресия на TrkB в SpVo не са толкова високи, колкото в SpVc и SpVi.



Фигура 5.29. Имунохистохимична локализация на *TrkB* в *SpVo* (A), *SpVi* (B) и *SpVc* (C) на *SpV*. Имунопозитивните клетки за *TrkB* са означени със стрелки. Прави впечатление различния интензитет на реакцията и разнообразната външна морфология на имунореактивните неврони. Мащабна скала = 50 μm .

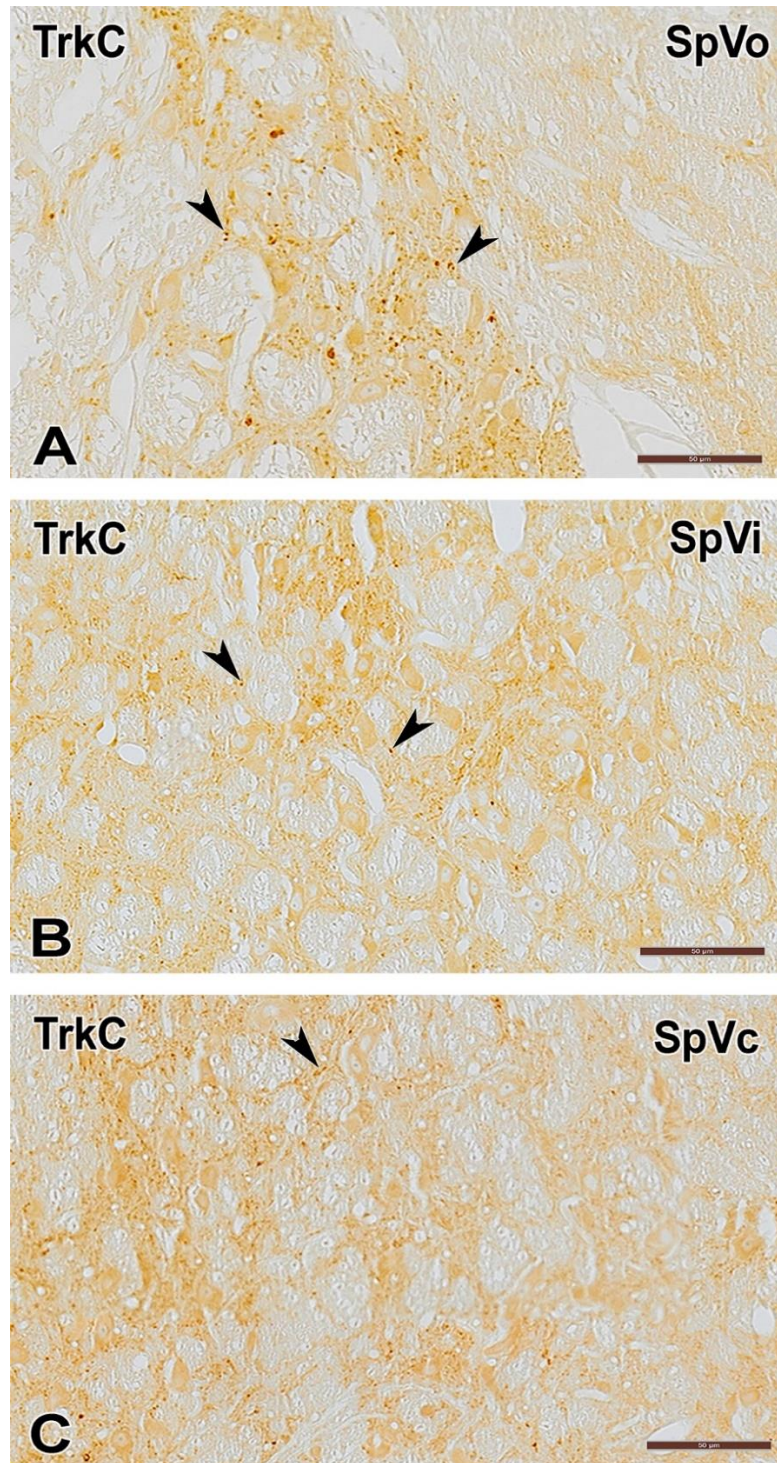
5.2.3.7 Тропомиозин рецепторна киназа-С

Имунореактивността на TrkC не е широко експресирана в каудалното подядро и, при това, тази експресия е сравнително слаба по интензитет. Най-ярко имунооцветени са нервните влакна (фиг. 5.30).

Експресията на TrkC в интерполарното подядро показва модел на разпределение, подобен на този в SpVc, без видими разлики в интензивността на оцветяването и локализацията. Имунореактивност се наблюдава основно в израстъците на невроните. TrkC-имуноположителните нервни влакна, преминаващи през интерполарното подядро, показват как тази анатомична област регулира синаптичното предаване и пластичността.

Имунореактивността на TrkC в оралното подядро разкрива профил на експресия със умерено до слаб интензитет на оцветяване, който е концентриран предимно в нервните израстъци. Нивата на експресия на TrkC в SpVo качествено не показват различия, каквито са установени в SpVc и SpVi.

Приликите между експресията на TrkC в трите подядра са, че се наблюдават само нервни влакна, които да са положителни за реакцията, докато телата на спиналните тригеминални неврони остават негативни.



Фигура 5.30. Имунохистохимична локализация на TrkC в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на SpV. Главите на стрелките показват положителните за реакцията нервни влакна. Прави впечатление липсата на имунобелязани перикариони в ядрото. Мащабна скала 50 μm.

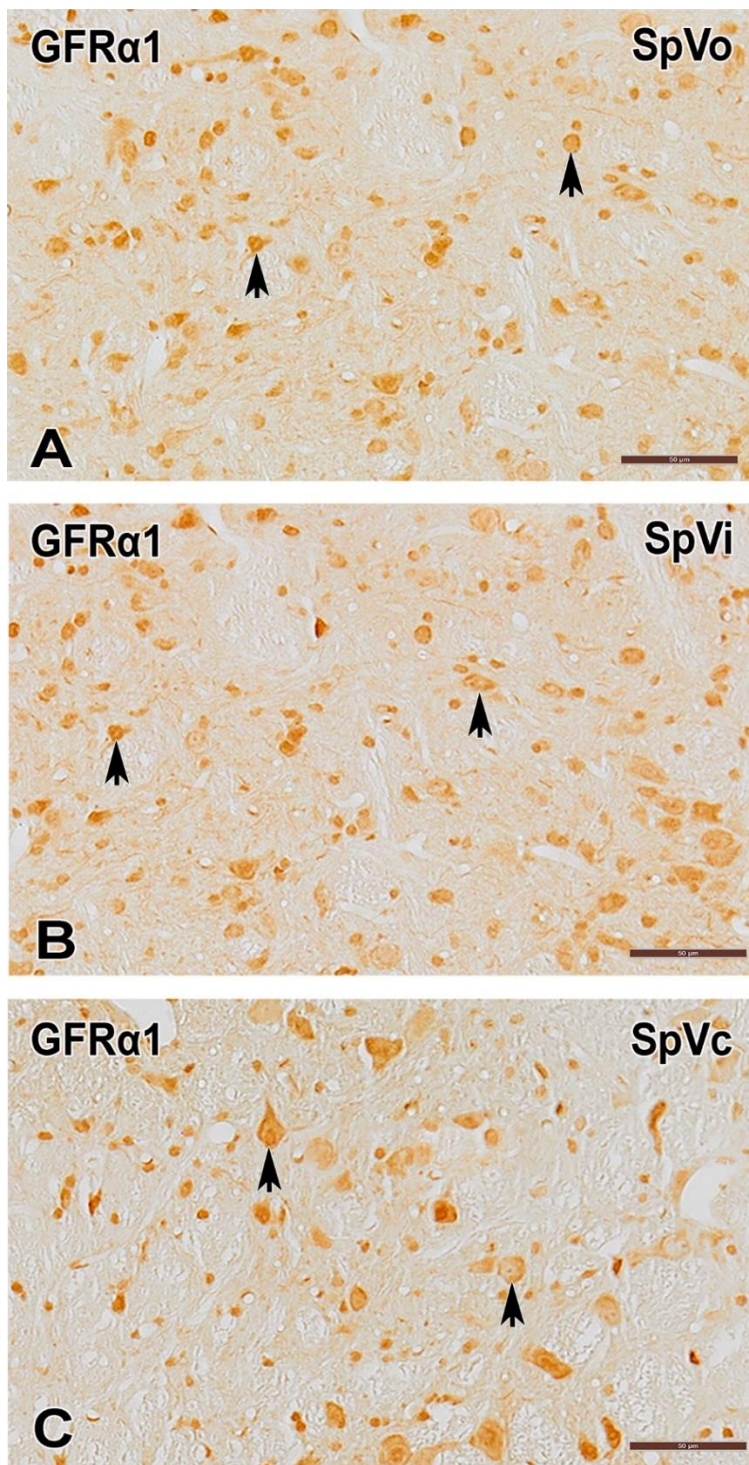
5.2.3.8 Глиален рецептор $\alpha 1$

Експресията на глиалния рецептор $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) в SpV може да се разкрие с помощта на светлинномикроскопска имунохистохимия, която позволява демонстриране на неговото разпределение и възможни функционални ефекти във всяко от трите подядра на SpV. Прави впечатление, че имунореактивните спинални тригеминални неврони са с различни размери и форма (фиг. 5.31).

Имунореактивността на GFR $\alpha 1$ показва разпознаваем модел на експресия в каудалното сетивно тригеминално подядро, който се характеризира със силно оцветяване в перикарионите и проксималните участъци на излизащите от тялото нервни израстъци. Силната експресия на GFR $\alpha 1$ подсказва неговата критична функция в модулирането на сигналните пътища на GDNF в SpVc. Освен това съществуването на нервни влакна, които са положителни за GFR $\alpha 1$, допълнително подчертава потенциалната му роля в тази субнуклеарна област.

Експресията на GFR $\alpha 1$ в интерполарното подядро има модел на разпределение, подобен на този, наблюдаван в SpVc, без значителни разлики в интензивността и локализацията на оцветяването. Забележимо силна имунореактивност се наблюдава в телата на спиналните тригеминални неврони, което предполага значителна GFR $\alpha 1$ -медирана сигнализация в SpVi.

Имунореактивността на GFR $\alpha 1$ в оралното подядро разкрива характерен профил на експресия с умерен интензитет на оцветяване, който е концентриран предимно в невронните перикариони. SpVo не показва качествено различни нива на експресия на GFR $\alpha 1$ в сравнение с интензитета на имунооцветяване в SpVc и SpVi.



Фигура 5.31. Имунохистохимична локализация на $GFR\alpha 1$ в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на SpV. Със стрелки са обозначени няколко неврони с позитивни перикариони и проксималните участъци на излизащите от тялото нервни израстъци. Мащабна скала 50 μm .

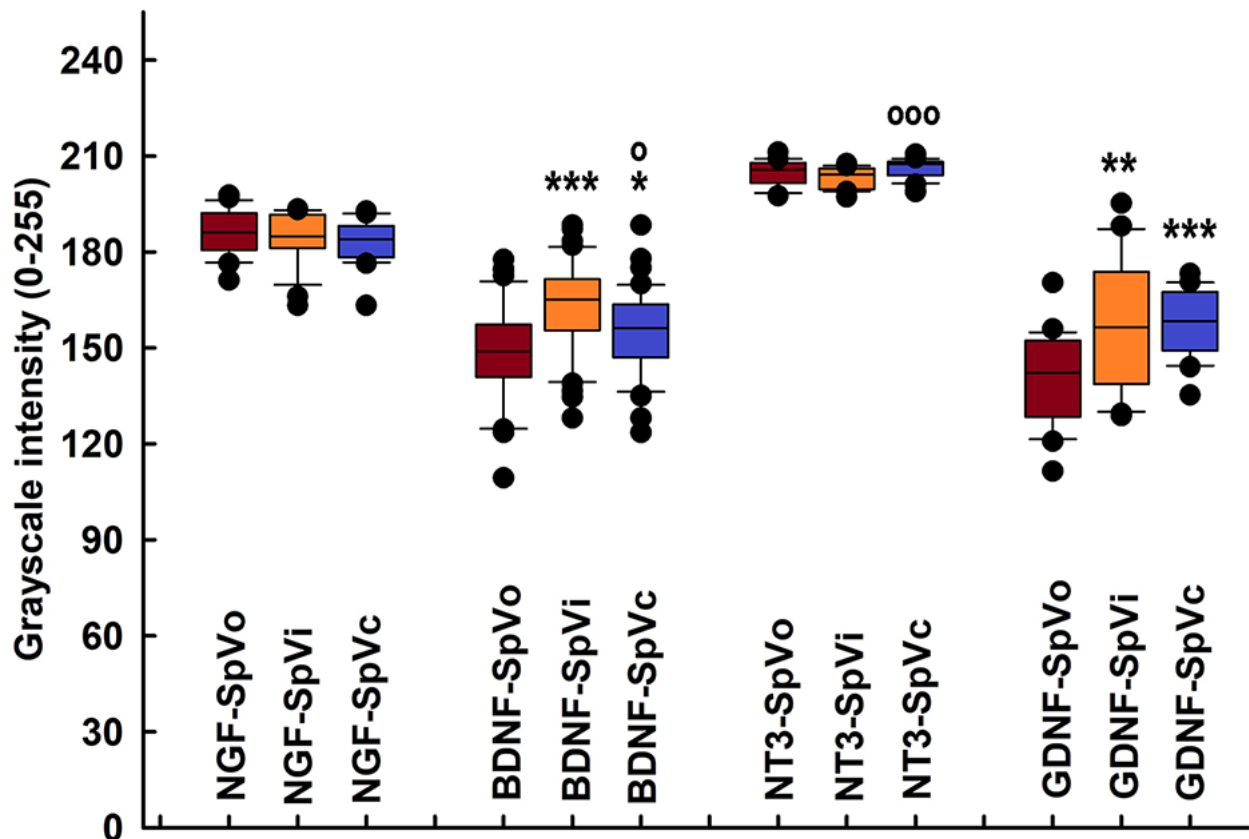
Като резултат от проведените експериментални имунооцветявания ние установихме, че по-голямата част от невроните и поддържащата глия в спиналното тригеминално ядро на половозрели плъхове са NGF-имунопозитивни. Имунореактивните клетки са разпръснати по протежение на ядрото. При нито една от имунопозитивните клетки не се наблюдава специфично оцветяване в клетъчното ядро. По същия начин BDNF имунооцветяване се наблюдава в някои неврони в спиналното тригеминално ядро, а NT-3 имунореактивност е видима в невроните и глията.

Използвайки описателен статистически анализ, ние успяхме да демонстрираме и сравним нивата на експресия на невротрофните фактори и техните рецептори в трите подядра на SpV. Данните показват, че NGF е равномерно експресиран от невроните в ядрото, без статистически значима разлика в интензитета на имунооцветяване в тях (фиг. 5.32). Повишена имунореактивност за TrkA се наблюдава в SpVo в сравнение със SpVi (медиана, 173.290 срещу 187,110, * $p=0.038$) и SpVc (медиана, 173.290 срещу 189.690, *** $p\leq 0,001$) (фиг. 5.33). В допълнение U тестът на *Mann-Whitney* разкрива малко по-силна експресия на TrkA в спиналните тригеминални неврони на SpVi спрямо SpVc (медиана, 187.110 срещу 189.690, ° $p=0.025$) (фиг. 5.33).

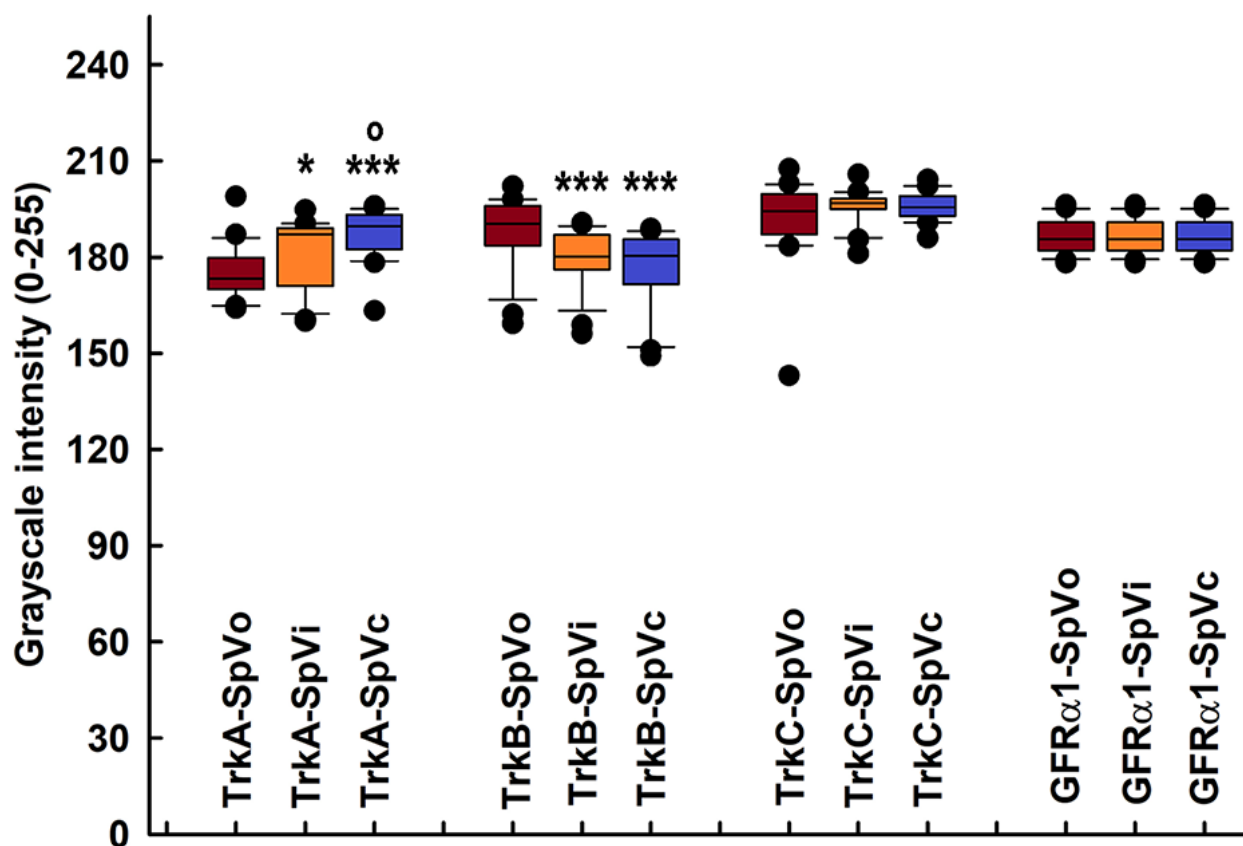
За нивата на експресия на BDNF сравнението между трите подядра на SpV разкри, че те имат различни нива на експресия за този невротрофен фактор (фиг. 5.32). Оказва се, че BDNF има най-висока експресия в спиналните тригеминални неврони на SpVo подядро, следван от тази в невроните на SpVc (медиана, 148.87 срещу 156.24, * $p=0.041$ в сравнение със SpVo; медиана 156.24 срещу 165.068, $p\leq 0.001$ в сравнение със SpVo) и невроналната експресия в SpVi (медиана, 148.87 срещу 165.07, *** $p<0.001$) е на последно място (фиг. 5.32). TrkB като рецептор за BDNF също показва различни нива на експресия в трите подядра; това в каудалното подядро е най-високо, докато експресията в оралното подядро е най-ниска (фиг. 5.33). Наблюдавана е статистическа значима разлика между оралните и интерполярните подядра (медиана, 190.430 спрямо 180.246, *** $p\leq 0.001$) и между оралните и каудалните подядра (медиана, 190.430 срещу 180.420, *** $p\leq 0.001$) (фиг. 5.33).

Експресията на NT-3 (фиг. 5.32) е най-ниската от тази за останалия набор от невротрофни фактори, изследвани в нашето проучване, заедно с нивата на експресия на неговия TrkC рецептор (фиг. 5.33). При това не е установена никаква статистическа разлика в експресионните нива на невроните в трите подядра.

За разлика от NT-3, експресията на GDNF е интензивна в невроните на трите подядра на спиналното тригеминално ядро (фиг. 5.32). Най-високата и статистически значима експресия се наблюдава в невроните от оралното подядро в сравнение с тези в интерполярното (медиана, 142.250 срещу 156.490, $**p=0.003$) и каудалното (медиана, 142.250 срещу 158.418, $***p<0.001$). Интензитетът на имунооцветяване на GFR α 1 рецептора не се различава и в трите изследвани подядра на спиналното тригеминално ядро (фиг. 5.33).



Фигура 5.32. Статистически анализ на експресията на невротрофни фактори в трите части на спиналното тригеминално ядро.
















































Фигура 5.33. Статистически анализ на експресията на рецепторите за невротрофни фактори в трите части на спиналното тригеминално ядро.



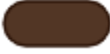
5.2.4 Обобщение върху неврохимичната анатомия на спиналното ядро

Получените от нас имунохистохимични резултати от изследваните в това проучване невротрансмитери и/или невромодулатори, както и тестваните невротрофни фактори в тригеминалното спинално ядро на плъх сме систематизирали в таблица 3. Таблицата дава обзорна представа за вариантите и относителния интензитет на имунореактивността на установените от нас невроактивни вещества в трите части на спиналното тригеминално ядро. Отделно е представена сравнителната локализация на невроактивните вещества в телата на невроните. Представените данни не отразяват количествените различия в степента на имунооцветяване между двата типа клетки. Наблюдаваните различни степени на качествено оцветяване са

определени по субективен фотометричен критерий и са кодирани от слабо до силно интензивно оцветяване, както следва:

Таблица 3. Невроактивни вещества в спиналното тригеминално ядро.

Биоактивни субстанции	SpVc	SpVi	SpVo
GABA			
5-HT			
SP			
NPY			
CGRP			
nNOS			
AChE			
NGF			
BDNF			
NT-3			
GDNF			
TrkA			
TrkB			
TrkC			
GFR α 1			

-  = **СЛАБО ИЗРАЗЕНА ИМУНОРЕАКТИВНОСТ**
-  = **УМЕРЕНА ИМУНОРЕАКТИВНОСТ**
-  = **СИЛНО ИЗРАЗЕНА ИМУНОРЕАКТИВНОСТ**

VI. ОБСЪЖДАНЕ

6.1 Структурна организация на спиналното тригеминално ядро

6.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро

В първата част на проведеното изследване, ние представяме морфологични данни за невроанатомията на спиналното тригеминално ядро (SpV), които, от своя страна, биха служили за полагането на фундамента в по-обширното разбиране на неговата неврохимия.

Това ядро е най-голямото тригеминално ядро и се намира в страничната част на *tegmentum* на мозъчния ствол и каудалната част на моста, разположено в съседство със спиналния тригеминален тракт. Каудално ядрото прераства в *substantia gelatinosa* на гръбначния мозък, докато трактът продължава със снопчето на *Lissauer* (Paxinos and Watson, 2014). Спиналните тригеминални неврони имат ясно изразено клетъчно тяло със спорадични телца на *Nissl*, заобиколено от мрежа от миелинизирани аксони.

Топографо-анатомичното разделяне на спиналното тригеминално ядро предлага на изследователите за обсъждане две взаимно допълващи се перспективи: конвенционална класификация, основана на чисто анатомични характеристики, и съвременна схема за сегментиране, основана на молекулярни методи. Докато класическата представа, която разделя SpV на три отделни – орално, интерполарно и каудално подядра, е крайъгълен камък в невроанатомичните изследвания, молекулярният подход към сегментацията представлява по-ново начинание, което се занимава със сложните молекулярни характеристики на невроните в това ядро.

По време на ранните етапи от развитието на нервната тръба при гръбначните животни се появява морфологичната и функционалната сложност на мозъка, тъй като различните региони и подрегиони започват да се определят и диференцират. Един от механизмите, допринасящи за тази сложност, е процесът на сегментация, който включва разделяне на проневромерите на напречни области, известни като невромери, по протежение на рострокаудалната ос (García-Guillén et al., 2021). Тези

невромери показват различна молекулярна и клетъчна идентичност и се развиват в специфични мозъчни области, съдържащи уникални невронни популации чрез пролиферация и невrogenеза (Puelles et al., 1987; Lumsden, 1990; Kiecker and Lumsden, 2005). Въпреки, че миграционните процеси по време на развитието могат да нарушат някои сегментни граници, експериментите за картографиране показват придържане към различни сегментни области (Birgbauer and Fraser, 1994; Marín and Puelles, 1995; Watson et al., 2017). Сегашният сегментен модел за мозъка на гръбначните животни, известен като прозомерен модел, определя седем прозомери в предния мозък и 11 ромбомери в задния мозък (Watson et al., 2010; Nieuwenhuys and Puelles, 2015; Ten Donkelaar, 2020). Този процес на сегментиране допринася за формирането на отделни мозъчни области със специфични невронни популации.

Тригеминалната колона, разположена в задния мозък, е пример за такава мозъчна структура, състояща се от главното тригеминално сетивно ядро в роstralната част на задния мозък и спиналното тригеминално ядро, простиращо се каудално. От друга страна, както беше описано, SpV се разделя допълнително на орално, интерполарно и каудално подядро (SpVo, SpVi, SpVc), всяко от които се характеризира с уникални молекулярни маркери и модели на свързаност (Olszewski, 1950). Тригеминалната колона се състои от сензорни неврони от втори ред, които получават информация от тригеминалните нервни влакна. Прозомерният модел предполага, че тази колона е разделена на сегментни единици, получени от съответните ромбомери (Marín and Puelles, 1995; Aroca et al., 2006). Експерименталните изследвания са локализирали главното сензорно тригеминално ядро в ромбомерите на средния мозък (r2-r3) при мишки (Oury et al., 2006). Спиналното тригеминално ядро обхваща множество ромбомери (r4 до r11 при мишки) в понтинните, ретропонтинните и медуларните области на задния мозък (Marín and Puelles, 1995; Cambroneo and Puelles, 2000). Разбирането за организацията на тези субединици хвърля светлина върху по-фината организация на тригеминалната колона, която потенциално се влияе от лежащите в основата ѝ ромбомерни структури.

Въпреки появата на молекулярната сегментация като обещаващ начин за разбиране на невронната организация, настоящото ни изследване остава вкоренено в традиционната рамка на класическото разделение на SpV. Като се придържаме към тази утвърдена анатомична категоризация, ние целим да предоставим цялостно изследване на морфологичните и функционалните характеристики на спиналните тригеминални подядра, хвърляйки светлина върху техните отличителни роли в невронните вериги.

Като се вземат предвид резултатите от настоящото изследване при изясняване на морфологията и разпределение на невроните в спиналното тригеминално ядро у плъх, може да се направи съпоставка с най-ранните описания на цитоархитектониката му при примати. Преди работата на *Olszewski*, за спиналното тригеминално ядро се е смятало, че е непрекъсната структура, която е директно продължение на задните рога на гръбначния мозък, достигайки до главното сетивно ядро на петия черепномозъчен нерв в моста. Този начин на представяне с униформеност в структурата е давал тласък да се мисли, че цялото ядро притежава също така униформеност във функцията си. Благодарение на работата на *Olszewski* върху материал от човек и *Macaca mulatta* вече е ясно, че ядрото може да се раздели на три части. Той ги нарича „*spinalis, medullaris, and pontina*”, които съответстват на каудалното, интерполарно и орално субядро на спиналното тригеминално ядро (Olszewski, 1950).

Спиналното тригеминално ядро е критичен компонент на тригеминалната сетивна система, който отговаря за обработката на сетивната информация от лицето и главата. Разбирането на структурните характеристики, особено на размера и морфологията на невроните в тези подядра, е от съществено значение за разкриване на функционалната организация на тригеминалната сетивна система.

Това описание, въпреки, че е базирано на наблюдения върху материал, различен от настоящото изследване, показва сходства с наблюдаваната организация на каудалната част на спиналното тригеминално ядро у плъх. Подплатявайки описанията вече със статистически анализ нашите резултати показват, че тази част

на ядрото в действителност съдържа уникални неврони, които могат да се разделят на три групи според големината на техните тела.

Няколко проучвания са изследвали невронната архитектура на спиналното тригеминално ядро, като са предоставили ценна информация за морфологичната хетерогенност в неговите подядра. По-специално, изследванията, при които са използвани различни хистологични техники и имунохистохимия (Gobel, 1975, 1978, 1979; Li et al., 1999; Schoenen, 1982), постоянно съобщават за разлики в размерите на невроните сред SpVo, SpVi и SpVc.

В заключение, структурната хетерогенност на невроните в рамките на трите подядра на спиналното тригеминално ядро е добре описана в литературата, като има разнопосочни съобщения относно големината на невроните в тях. Нещо повече, наблюдаваните в различните проучвания несъответствия във външната морфология на спиналните тригеминални неврони подчертават сложността на тази мозъчна структура.

6.1.2 Видове неврони в спиналното тригеминално ядро

Невронните елементи в спиналното тригеминално ядро са изследвани при различни животински видове, включително плъхове (Li et al., 1999), котки (Gobel, 1975, 1978, 1979; Matthews et al., 1989), маймуни (Olszewski, 1950), камили (El-Dwairi et al., 2023) и хора (Rusu, 2004; Schoenen, 1982), като са използвани различни техники за изследване, като импрегниране по *Golgi*, хрянова пероксидаза (horseradish peroxidase, HRP), оцветяване по *Nissl* и имуноцитохимия (Gobel, 1975, 1978, 1979; ; Schoenen, 1982; M. Falls, 1983; Falls et al., 1985; Matthews et al., 1989; Li et al., 1999; Rusu, 2004; El-Dwairi et al., 2023). Изследването на невронното разнообразие в рамките на трите подразделения на спиналното тригеминално ядро разкрива множество клетъчни типове. В котешкото ядро например бяха идентифицирани шест различни типа неврони, включващи пирамидни неврони с шипове, пирамидни неврони без шипове, мултиполарни неврони, характеризиращи се с гъсто дендритно

дърво, мултиполарни неврони с оскъдно разклоняващи се дендрити, клетки, характеризиращи се с малки овални или кръгли клетъчни тела и дискретни струпвания на шипове по дисталните дендрити, и стъблести клетки, показващи множество фини стъблести разклонения и шипове по дендритите си (Gobel, 1975, 1978, 1979).

При плъхове е проведено детайлно изследване което показва наличие на добре оцветени стъблести клетки, характеризиращи се с обширни дендритни и аксонални арборизации, които се отличават със значителен брой тънки странични разклонения, излизащи от техните дендрити (Li et al., 1999). Проучванията върху човешкото орално подядро очертават две основни категории неврони (Schoenen, 1982; Rusu, 2004). Първата категория се състои от малки закръглени или фузиформени клетки (8-10 μm в диаметър), обединени в малки клъстери или разпръснати равномерно. Втората категория обхваща големи неврони (22 μm в диаметър), които имат крушовидна, фузиформена, мултиполярна или биполярна морфология.

Две от подядрата на спиналното тригеминално ядро са подложени на задълбочени изследвания при различни видове. При котешкото интерполарно подядро например едно проучване е разкрило наличието на пет различни типа нервни клетки (Matthews et al., 1989). Тези типове проявяват различна морфология, визуализирана като гладки пирамидни, гладки мултиполарни, характеризиращи се със сферични дендритни арборизации, биполярни фузиформени или овални неврони с малки ядра, стъбловидни неврони, характеризиращи се с 2-4 екстензивно разклонени шипчести дендрита, и клетки с много малки овални тела и плътно разположение дендрити. Диаметрите на тези неврони широко варират от 6-12 μm до 15-25 μm .

От друга страна, установено е, че в оралното подядро на плъх се намират три основни типа нервни клетки (Falls, 1983; Falls et al., 1985;), като тези форми включват овални, фузиформени или пирамидни клетки. Размерите на невроналните тела варират от 5-15 μm до 25-50 μm в диаметър. Предишни изследвания на невроните на спиналното тригеминално ядро ги категоризират предимно въз основа на формата и

размера на клетъчните им тела, като на дендритните дървета се обръща ограничено внимание. Забележителни изключения включват подробни описания на стъблести неврони при малки експериментални животни като плъхове и котки (Gobel, 1975; Matthews et al., 1989; Li et al., 1999;), където невроните са характеризирани като средни неврони с много на брой шипчести стъбла. В две предишни проучвания са очертани накратко дендритните разклонения на невроните в човешкото орално подядро на спиналното тригеминално ядро (Schoenen, 1982; Rusu, 2004). Това, обаче, е само началото на разбирането на сложната арборизация на невроните и следва да се отбележи, че възприемането на болка като цяло се свързва със специализирани сензорни неврони, които се отличават със сложни дендритни израстъци за откриване на увреждащи стимули (Moore et al., 2002; Kim et al., 2006).

Предишни проучвания, особено тези, фокусирани върху неврони тип I, обикновено наричани стъблести неврони, предоставиха подробни описания, характеризиращи ги като сложни клетки със шипести дендрити и многобройни дендритни стъбла (Gobel, 1975, 1978; Matthews et al., 1989). Заслужава да се отбележи, че при описанието им се набляга на динамиката на шипчетата, повлияни от активността на невроните и възрастта на развитие (Runge et al., 2020). За разлика от тях, други типове неврони, включително островръхи, фузиформени, пирамидни и мултиполярни клетки, са само споменати в по-ранните изследвания с ограничени подробности. В изследване върху котки например са идентифицирани както шипести, така и пирамидни неврони без соматични протрузии, а островните клетки са описани като малки, кръгли или овални с единични шипчета по техните дендрити (Gobel, 1979). Въпреки това подробни морфологични данни, като например плътността на дендритното дърво и видовете и разпределението на различните придагъци, не са докладвани.

Друго скорошно и подобно проучване се фокусира върху морфологичните характеристики на невроните в спиналното тригеминално ядро при камили, които са изследвани с метода на импрегниране на *Golgi* (El-Dwairi et al., 2023). За по-подробно характеризиране формата на невронните перикариони, изследването

класифицира клетките въз основа на размера и формата на клетъчното тяло, плътността на дендритното дърво, както и морфологията и разпределението на техните израстъци. Проучването идентифицира най-малко 12 морфологични типа неврони, включително стъблести, островръхи, октоподоподобни, сегментирани, лодкоподобни, пирамидални, мултиполарни, кръгли, овални и удължени неврони (El-Dwairi et al., 2023). Описаните неврони демонстрират разнообразни форми на израстъците, произхождащи както от дендритите, така и от клетъчните им тела, като някои от тях се отличават с големи дилатации в точките на дендритното разклонение. Заедно с нашето изследване това са двете изследвания, за които знаем, че успешно демонстрират специфичната морфология на клетъчните тела на спиналните тригеминални неврони съответно при камили и плъхове, някои от които като например ладиевидните и лобулираните неврони са уникални сред невроналната популация в мозъка.

Настоящото проучване представлява първото цялостно изследване на морфологията на невроните в спиналното тригеминално ядро у плъх. Нашите данни допълнително потвърждават сложния строеж на т.нар. стъблести неврони и предоставят задълбочено описание и на други типове типични спинални тригеминални неврони, включително фузиформени, пирамидални и мултиполарни клетки, които бяха само накратко описани в предишни доклади. Проучването ни въвежда нови данни, предоставяйки ценна информация за наличие на неврони, проявяващи характерни морфологични черти, които ги определят като октоподоподобни, ладиевидни и лобулирани клетки. По-конкретно, нашето изследване идентифицира и категоризира най-малко седем различни типа нервни клетки в рамките на спиналното тригеминално ядро у плъх, като се подчертава сходството на разпределянето им в трите структурни компонента на спиналното тригеминално ядро.

Предишни изследвания на морфологията на невроните в спиналното тригеминално ядро, проведени чрез различни оцветителни техники върху плъхове, котки и хора, категоризират нервните клетки в спиналното тригеминално ядро въз

основа предимно на размера и формата на телата. В тези проучвания, обаче, често липсват подробни описания на дендритните дървета и соматичните/дендритни шипове и придатъци, като стъблестите клетки са забележително изключение сред спиналните тригеминални неврони, и са широко документирани в предишни изследвания (Gobel, 1975; Matthews et al., 1989; Li et al., 1999;). Този подход предполага явни предизвикателства при сравняването морфологията на невроните на спиналното тригеминално ядро на плъх, класифицирани съобразно множество соматични и дендритни характеристики, с аналози от други видове, класифицирани предимно според размера и/или формата на сомата.

Освен това изследването разкри наличие на пирамидни неврони в спиналното тригеминално ядро, наподобяващи морфологични аналози в други животински видове, което е нова находка. Освен това бяха идентифицирани малки кръгли или овални неврони, които вероятно съответстват на малките неврони, описани при други видове (Gobel, 1975; Matthews et al., 1989; Li et al., 1999). Проучването също така потвърди сходството в морфологията на мултиполарните неврони в спиналното тригеминално ядро на плъх с тези, съобщени в предишни изследвания (Gobel, 1979; Matthews et al., 1989). Наред с тези общи прилики, ние описахме и някои отличителни видове неврони в спиналното терминално ядро, характеризиращи се с уникални характеристики, като например дендритни и соматични дилатации.

В някои предишни доклади изрично се подчертаваше присъствието на малките и стъблестите неврони, като се пренебрегват други типове неврони в спиналното тригеминално ядро (Gobel, 1975; Bennett et al., 1980). Настоящото проучване, обаче, макар да признава тези два вида неврони за най-често наблюдавани, идентифицира и други невронни типове в значителен брой в ядрото. По-специално, ние съобщаваме за големи неврони с диаметър на тялото в някои случаи над 40 μm , характеристика, която не е документирана в спиналното тригеминално ядро на плъх досега. Освен това неврони с характерни форми, като октоподоподобни, ладиевидни и лобулирани клетки, са докладвани за пръв път в

спиналното тригеминално ядро на плъх в това проучване, без прецедент за наличие на подобни неврони в това ядро у плъх в предишни морфологични проучвания.

6.2 Химичен профил на спиналното тригеминално ядро

6.2.1 Невротрансмитери и неuropeптиди в спиналното тригеминално ядро

6.2.1.1 Гама-аминомаслена киселина

Последните експериментални данни предоставят интригуващ поглед върху разпределението на гама-аминомаслената киселина (GABA) в рамките на спиналното тригеминално ядро. Имунохистохимичните реакции, извършени от нас с анти тяло срещу GABA, разкриват, че значителен брой клетки в спиналното тригеминално ядро на плъх са имуноположителни за GABA. Това предполага, че GABA като инхибиторен неврoтoнcмитер, може да играе значителна роля във функционирането на това ядро.

Интересно е, че разпределението на GABA имунореактивността не е равномерно в цялото ядро. В хода на проучването ние установихме статистически значима разлика в интензивността на имунохистохимичната реакция за тази аминокиселина в каудалната част на ядрото в сравнение с тази в оралното и интерполарното подядро. Най-интензивна реакция бе наблюдавана от нас в каудалната му част, което ясно показва потенциален градиент в разпределението на GABA-съдържащите клетки. С придвижването в рoстрaлна посока тази разлика намалява и в крайна сметка тя става статистически незначителна.

Тази пространствена вариация в разпределението на GABA имуноoцветяване може да има значение за функционалната организация на спиналното тригеминално ядро. Тя може да подскаже, че различните части на ядрото имат различни роли в обработката на сетивната информация, потенциално свързани с инхибиторните ефекти на GABA. Въпреки това са необходими допълнителни изследвания, за да се разбере напълно функционалното значение на тези находки.

Нашите резултат потвърждават данни от други експерименти за наличието на ГАВА в спиналното тригеминално ядро (Ginestal and Matute, 1993). Нещо повече, нашите данни са в унисон с разпределението на ГАВА експресията, която според *Ginestal* и *Matute* (1993) също е най-висока в каудалната част на ядрото (Ginestal and Matute, 1993). Относно нашият конкретен принос към тези констатации, то той е свързан с количествено доказване чрез статистически анализ на по-висока експресия на ГАВА в ядрото. Освен това, нашите експерименти дават допълнителна информация за съществуването на ГАВА-съдържащи неврони по цялото протежение на спиналното тригеминално ядро, и във трите му подядра, докато досегашните проучвания даваха ограничена информация с фокус основно върху каудалното му подядро. Също така, статистическият анализ на имунохистохимичната експресия на ГАВА хвърля повече светлина върху това доколко е статистически значима разликата в разпределението на този аминокиселинен невротрансмитер по протежение на ядрото у плъх.

Наличието на ГАВА в спиналното тригеминално ядро може да бъде свързано с модулаторната роля на невротрансмитера (Almond et al., 1996). Тестове на *Viggiano* и съавтори (2004) показват два резултата; първо, експресията на ГАВА се повишава в каудалното субядро на спиналното тригеминално ядро при болкови тестове и второ, това увеличаване на ГАВА води до поведенчески промени у плъхове, които показват намаляване за усещането на болка (*Viggiano et al.*, 2004). Хипотезата е, че ноцицептивните стимули достигат до каудалната част на ядрото, където активират ГАВАергични неврони. Последните, от своя страна, въздействат върху нервни влакна, експресиращи ГАВАА рецептори, които влакна достигат до вентро-постериорните таламични ядра (*Burton and Craig*, 1979). Посочените данни неминуемо показват, че ГАВА представлява важен невротрансмитер в спиналното тригеминално ядро, свързан основно с модулацията на болковата сетивна информация чрез инхибирането ѝ.

В заключение, нашите резултати предоставят допълнителни ценни сведения за неврохимичната организация на спиналното тригеминално ядро. Те подчертават

значението на GABA в тази мозъчна структура и предполагат нови насоки за по-нататъшно изследване. Бъдещите проучвания следва да разкрият функционалните последици от тези констатации и по-конкретно да изяснят специфичните роли на GABAergic клетките в различните части на спиналното тригеминално ядро.

6.2.1.2 Ацетилхолин

Холинергичната система в спиналното тригеминално ядро играе решаваща роля в модулирането и обработката на информация за болката. Нейното детайлно изясняване, което значително би допринесло за разбирането на тази сложна невронална мрежа в мозъка, предполага разбиране на разпределението на ключовия ензим в метаболизма на ацетилхолин, ацетилхолинестераза. Ето защо, в това проучване ние изследвахме експресията на AChE по протежение на спиналното тригеминално ядро, за да изясним потенциалните вариации в ензимното му разпределение и тяхното значение за модулацията на болката.

Нашите проучвания показват, че имунохистохимичната експресия на AChE е равномерно разпределена по протежение на спиналното тригеминално ядро, като не се наблюдават статистически значими разлики между трите му подядра. Това равномерно базово ниво на експресия предполага последователна ензимна регулация на ацетилхолина в рамките на ядрото. Забележително е, че тази еднородност се запазва въпреки различната топография и функционални роли на каудалното, интерполарното и оралното подядро.

Нашите резултати показват експресия на AChE в невроните и нервните влакна в спиналното тригеминално ядро у плъх, които са в съответствие с проведеното от Reid и сътр. (2013) изследване на холинергичната система в ЦНС на мишки (Reid et al., 2013). Тази експресия подсказва, че холинергичната система в ядрото може да бъде локално регулирана от ацетилхолинестеразата. В тази връзка е известно, че мезопонтинните холинергични неврони в сетивните системи оказват модулаторно

действие до таламуса, като засилват преноса на сетивна информация (Timofeeva et al., 2005).

Наблюдаваната равномерна експресия на AChE в цялото спинално тригеминално ядро дава ценни сведения за холинергичната модулация на болковата обработка в този регион. Равномерното разпределение на AChE може да показва съгласувани усилия за равномерно регулиране на нивата на ацетилхолин, независимо от субнуклеарното разположение. Този факт повдига въпроси за функционалните последици от тази еднородност и ролята ѝ в координирането на обработката на информация за болката.

Фактът, че и трите подядра дават проекции към таламуса, подчертава потенциалното функционално значение на наблюдаваната равномерна експресия на AChE. Таламусът е ключова релейна станция за обработката на сетивната информация в ЦНС и равномерната модулация на ацетилхолина в спиналното тригеминално ядро може да повлияе на начина, по който информацията за болката се предава и обработва на това по-високо ниво.

Макар че равномерното разпределение на AChE може да предполага базална регулация на информационния процесинг, медиран от ацетилхолина, необходими са допълнителни изследвания за изясняване на специфичните роли на този трансмитер и деградацията му ензим AChE в модулацията на болката във всяко подядро. Изследването на взаимодействията между холинергичната система и други невротрансмитерни системи в рамките на спиналното тригеминално ядро може да осигури по-цялостно разбиране на сложните механизми, управляващи обработката на информацията за болката.

Друго основание за фокусирането върху изследване на нивата на експресия на този ензим е свързана с изследванията на *Timofeeva* и колеги (2005) върху плъхове (Timofeeva et al., 2005). От направените изследвания става ясно, че ацетилхолинът деполаризира големите неврони в интерполарна част на спиналното тригеминално ядро (Timofeeva et al., 2005). В тях е демонстрирано, че локалното приложение на холинергичен агонист води до увеличаване на рецепторното поле, покриващо се от

спиналното тригеминално ядро, а въвеждането на скополамин като антагонист на ацетилхолина води до обратния ефект (Timofeeva et al., 2005). Наличието на равномерно разпределение на АСhЕ би означавало, че тя ще има и константен ефект върху активността на холинергичен агонист или антагонист независимо дали става въпрос за рецепторни полета, свързани с интерполарното субядро или която и да е било друга част от спиналното тригеминално ядро. От по-нататъшните данни на авторите се разбира, че холинергичните неврони могат да се разделят и по размери на големи и малки, които пък, от своя страна, дават проекции към таламуса или други дялове на тригеминалния сетивен ядрен комплекс, съответно (Timofeeva et al., 2005). Тези насоки на мислене показват, че холинергичните неврони в ядрото оказват ефективен контрол върху рецепторните полета още на първата станция от получаването на сетивна информация в ЦНС и, в частност, че още на нивото на спиналното тригеминално ядро под действието на холинергичната система се осъществява модулация на сетивната информация. Тези проучвания заедно с нашите данни за наличието на ацетилхолинестераза в спиналното тригеминално ядро могат да обогатят разбирането за обработката на сетивната болкова информация.

Може да се спекулира, че АСhЕ, като ензим, разграждащ ацетилхолина, индиректно влияе върху сетивната трансдукция на две нива (първа станция на първична сетивната трансдукция и по-горни нива от спиналното тригеминално ядро), като намалява преноса на сетивна информация.

Това откритие предполага координирана регулация на ацетилхолина, която потенциално влияе върху последващата обработка на информацията за болката. Бъдещите изследвания трябва да се съсредоточат върху разкриването на специфичните роли на ацетилхолина и АСhЕ в модулацията на болката във всяко подядро, хвърляйки светлина върху сложното взаимодействие на невротрансмитерните системи в този важен регион на ЦНС.

6.2.1.3 Серотонин

Централната нервна система е третото място, където серотонинът е най-разпространен след локализацията му в ентохромафинните клетки в гастроинтестиналния тракт и тромбоцитите (Berger et al., 2009). Поради това проучването му в спиналното тригеминално ядро е от значение за по-доброто разбиране на моделите на разпространение на невротрансмитера.

Последните експериментални данни дават обширна представа за експресията на серотонин в спиналното тригеминално ядро. Нашето изследване за първи път разкрива, че невроните в спиналното тригеминално ядро експресират серотонин равномерно в трите части на ядрото от каудална към рострална посока. Тази равномерност в експресията на серотонин, която не показва статистически значими разлики в интензитета, е изключително важно наблюдение, тъй като предполага постоянно ниво на това биоактивно вещество в трите подядра. С други думи, този модел на разпределение предполага, че основното ниво на серотонин е еднакво навсякъде в трите спинални тригеминални подядра.

Основна причина фокусът в изследването ни да бъде насочен върху наличието на серотонин в спиналното тригеминално ядро е хипотетичното приемане, че той действа на локално ниво чрез 5HT_{1B/1D} рецептора си. В контекста на болковата сетивна трансдукция, опосредствана от това ядро, серотонинът спира острият мигренозен атак (Kimball et al., 1960). Работата на Goadsby и Hoskin (1998) ни показва, че инфузията със серотонин инхибира възбудните импулси от клетките на спиналното тригеминално ядро при наличие на болка в интракраниална съдова структура, а този ефект на невротрансмитера може да се блокира при прилагането на антагонист на 5HT_{1B/1D} рецептора (Goadsby and Hoskin, 1998). Този факт подсказва, че ефектът на серотонина е инхибиторен върху предаването на сетивна информация за болка, но също доказва и механизма на неговото действие, опосредстван чрез 5HT_{1B/1D} рецептора. Комбинирайки нашите данни за разпределение на серотониновата експресия по хода на спиналното тригеминално

ядро с инхибиторната роля на серотонина за предаването на ноцицептивна информация, може да се достигне до изграждане на модели, които да проследяват как промяната на нивата на това биоактивното вещество влияе на физиологията на ядрото.

Тази констатация служи като важна отправна точка за бъдещи изследвания, особено при изследване на промените в наличността на серотонин в експериментални модели на различни заболявания. Тези резултати допринасят и за разбирането ни за ролята на серотонина в рамките на спиналното тригеминално ядро и потенциалните му последици при болестни състояния. Необходими са по-нататъшни изследвания, за да се проучи как тези резултати могат да бъдат приложени в контекста на модели на заболявания и какво въздействие могат да имат върху разбирането ни за ролята на серотонина при тези състояния. В този смисъл това изследване поставя началото на подобни бъдещи проучвания и открива нови пътища за проучване на ролята на серотонина в нервната система.

Полученото познание има директно клинично приложение за създаването на медикаменти като суматриптан, които са агонисти на 5HT₁ рецепторите (Feniuk et al., 1989). Суматриптан е ефективен в купирането на остри мигренозни атаки. Последяването на серотониновата експресия би могла да се интерпретира като функция от употребата на агонисти на серотонина и да се сравнява с базалните нива на експресията му в спиналното тригеминално ядро от нашите експерименти. Заключение, което може да си направим от представените данни е, че серотонинът може да упражнява инхибиторен ефект върху тригеминоваскуларните невронални ноцицептивни пътища по цялото протежение на спиналното тригеминално ядро.

6.2.1.4 Субстанция P

Един от най-ранно идентифицираните невропептиди, за които е установено, че могат действат като невротрансмитери в ПНС и ЦНС, е субстанция P (SP). Според

структурния анализ той е ундекапептид, изграден от 11 аминокиселинни остатъка (Chang et al., 1971).

Експерименталните резултати от това проучване дават значителна представа за разпределението и експресията на SP в спиналното тригеминално ядро на плъх. Имунохистохимичните ни данни разкриха мрежа от SP-имунопозитивни нервни влакна в ядрото. Това наблюдение, макар и направено на светлинномикроскопско ниво, предполага, че SP вероятно играе определена роля във функционирането на тези неврони.

При по-внимателно обследване ние установихме, че телата на нервните клетки в спиналното тригеминално ядро на плъхове също са имунопозитивни за SP. Това показва, че SP присъства не само в нервните влакна, но и в самите нервни клетки, което би разширило нашето разбиране на ролята на SP в невронната комуникация и функция в това ядро.

Интересно е, че експресията на SP варира в трите подразделения на ядрото. В каудалната част на ядрото експресията на пептида е най-силна. С преминаването през интерполарната и след това към оралната част на ядрото експресията на SP намалява. Тези разлики в експресията са статистически значими, което предполага, че те не се дължат на случайни вариации, а представляват истински биологичен феномен. От друга страна, този модел на експресия може да отразява различните роли, които каудалната, интерполарната и оралната част на ядрото играят в предаване на сетивната болкова информация в него.

Нашите проучвания потвърждават предишни данни за наличие на субстанция P в спиналното тригеминално ядро, докладвани от екипа на Hökfelt (1977) (Hökfelt et al., 1977). Допълнението към тези данни, датиращи от преди повече от 40 години е, че тук ние надлежно представихме топографското разпределение на субстанция P в трите части на ядрото. Фактът, че субстанция P се доказва имунохистохимично в спиналното тригеминално ядро, трябва да се вземе под внимание, когато се обсъжда нейната роля в сетивната трансдукция на това ниво в ЦНС. Известно е, че субстанция P има стимулиращо действие върху централната трансмисия на болката. (Hökfelt et

al., 1977). Също така се смята, че този пептид увеличава отделянето на ендогенни опиати, като по този начин участва в пътища, които водят до аналгезия в резултат от стимулация (Basbaum et al., 1976). Тъй като субстанция Р притежава възбуждащо действие, тя може да активира енкефалин-отделящи неврони, което, от своя страна, да доведе до намаляване на ноцицепцията от дорзалния рог на гръбначния мозък (Hökfelt et al., 1977). Въпреки, че подобна теза не се отнася конкретно до тригеминалното спинално ядро, на базата на тези данни би било адекватно да се направи подобна дедукция и за него, като се осъществят експерименти, които да я докажат или оборят.

В заключение, тези експериментални резултати дават ценна представа за разпределението и експресията на SP в спиналното тригеминално ядро на плъх. Те подчертават потенциалното значение на пептида за невронната функция и проправят пътя за по-нататъшни изследвания на ролята му в нервната система. Необходими са, обаче, още изследвания, за да се разбере напълно значението на тези находки и потенциалните им приложения в неврологията и медицината.

6.2.1.5 Калцитонин генно-свързан пептид

Спиналното тригеминално ядро играе ключова роля като релейна станция за информация за болката, идваща от главата. От друга страна, калцитонин генно-свързаният пептид е биоактивно вещество, за което е известно, че участва в ноцицептивната обработка. В това проучване имаме за цел да изясним разпределението на CGRP в трите различни части на спиналното тригеминално ядро. Изследването ни включваше статистически анализи за установяване на налични разлики в интензитета на експресията на CGRP между каудалното, интерполарното и оралното подядро.

Статистическият анализ показва, че интензивността на експресията на CGRP в каудалното подядро не се различава съществено от тази в интерполарната област. Въпреки това, при сравняването на експресията на CGRP между интерполарните и

оралните подядра се появи забележителна находка, изразяваща се във факта, че интензивността на имунохистохимичната реакция за CGRP е значително по-висока в интерполарното подядро. По подобен начин се наблюдава статистически значима разлика между находките в каудалните и оралните подядра, като експресията на CGRP забележимо намалява по хода на ядрото от каудална към орална посока.

Наблюдаваната липса на статистически различия в експресията на CGRP между каудалните и интерполарните подядра предполага известна степен на равномерност в разпределението на CGRP в тези области. Това повдига въпроси за потенциални функционални сходства в процесите на модулация на болката между тези две подядра. Интригуващо е, че докато каудалното подядро показва сравнима експресия на CGRP с тази в интерполарната област, в последната се наблюдава значително повишен експресионен интензитет в сравнение с оралната област.

Постепенното намаляване на експресията на CGRP в посока от каудалната към оралната част на спиналното тригеминално ядро е забележителна находка. Този пространствен модел може да предполага регулаторен механизъм, при който CGRP може да играе по-значима роля в каудалното подядро, но с видимо отслабен ефект в оралната част. Разбирането на този градиент в експресията на CGRP може да даде представа за нюансираната модулация на сигналите за болка в рамките на спиналното тригеминално ядро.

Клиничното приложение на тези данни се простира до потенциални интервенции с терапевтичен ефект. Наблюдаваните разлики в експресията на CGRP предполагат, че инхибиторите, насочени към CGRP, могат да оказват различно въздействие в различните подядра. Следователно нашите резултати подчертават важността на отчитането на регионалното разпределение на CGRP в спиналното тригеминално ядро при разработването и прилагането на селективни инхибитори за облекчаване на болката.

В този ред на мисли CGRP се произвежда както от невроните в ПНС, така и от тези в ЦНС, и като мощен пептиден вазодилататор може да функционира при

предаването на ноцицепция (Brain et al., 1985). Това негово вазоконстриктивно действие се явява като крайъгълен камък в терапията на мигрената.

Нов клас лекарства за лечение на пациенти с чести, епизодични и/или хронични мигренозни главоболия действа чрез антагонизъм на CGRP клетъчния път. Това е първата категория фармацевтични продукти, разработени като насочена терапия срещу мигрена. Изследванията върху животни и проучванията при хора показват, че CGRP се освобождава по време на мигрена и екзогенното му приложение може да провокира мигренозни симптоми (Edvinsson, 2017). С двете си изоформи, α - и β -CGRP причинява разширяване на мозъчните артерии и дегранулация на мастоцитите, предимно в тригеминалната съдова мрежа, и вероятно това е причината, която води до ноцицепция (Ashina et al., 2018).

Фаза 3 клинични изпитвания, като PROMISE-1 (ептинезумаб), REGAIN, EVOLVE-1, EVOLVE-2 (галканезумаб) и ARISE и STRIVE (еренумаб), документират ефикасността на този клас лекарства в няколко варианта на мигрена (Raffaelli & Reuter, 2018). В този клас моноклоналните антитела упражняват своя ефект чрез антагонизъм на молекулата CGRP (ептинезумаб, галканезумаб и фреманезумаб) или рецептора на CGRP (еренумаб). Еренумаб е одобрен за антимигренозно лечение. Еренумаб е първото човешко моноклонално антитяло, което произвежда високо афинитетно, конкурентно и обратимо инхибиране на рецепторно ниво (Raffaelli and Reuter, 2018).

Тези данни показват, че изследването на химични субстанции и експресията им в различни структури в нервната система има директно значение за практиката и здравето на хората, особено когато при широко застъпени заболявания като мигрена, която се среща при около 12% от населението на Северна Америка (Urits et al., 2019). Затова по-доброто разбиране за разпределението на CGRP в ЦНС е от изключително значение за интерпретация на ролята на този пептид при обработката на болковата информация.

В тази връзка, нашите резултати за разпределението на CGRP в ядрото могат да дадат повече яснота за базалното ниво на неговата експресия и така да се установи

как това ниво на експресия в ЦНС се променя при употреба на инхибитори. Въпреки наличното познание за действието на инхибиторите на CGRP в ПНС, ние все още имаме лимитирани данни за влиянието им върху централните структури, участващи в сетивната трансдукция. Това е така, защото поради големия си молекулен размер, инхибиторите на CGRP не преминават кръвно-мозъчната бариера. Това дава нова възможност да се установи дали CGRP може да има участие също и върху механизмите за обработка на сетивна информация за болка в спиналното тригеминално ядро. Може да обсъдим примамливата хипотеза, че поради най-голямото наличие на CGRP в каудалното подядро и достигането на болкова информация от латералните части на главата в тази част на спиналното тригеминално ядро, използването на инхибитори на CGRP, които да могат да достигнат до ЦНС, биха имали най-голям ефект точно в онези места, където болковата информация при мигренозните атаки се обработва. Такова хипотетично мислене би означавало, че инхибиторите на CGRP биха имали таргетно влияние върху трансдукцията на болката.

Не е изключено също така инхибиторните ефекти на серотонина в сетивната трансдукция в спиналното тригеминално ядро да бъдат резултат от увеличаване на нивата на CGRP, което също би обяснило купиращото действие на серотонина върху острите мигренозни атаки (Goadsby et al., 1990).

Сумарно, въпреки че нашето проучване представлява значителна стъпка към разкриване на тънкостите в експресията на CGRP в спиналното тригеминално ядро, то подчертава необходимостта от по-нататъшни задълбочени изследвания. Едно по-задълбочено проучване на функционалните роли, регулаторните механизми и клиничните последици от CGRP в различните подядра несъмнено ще допринесе за напредъка на знанията в тази област и може да проправи път за иновативни терапевтични подходи.

6.2.1.6 Невропептид Y

Невропептид Y (NPY) е член на голямото семейство на панкреатичните полипептиди, включващо редица структурно сходни пептиди. Той представлява полипептид, изграден от 36 аминокиселинни остатъци и се отличава с наличието на тирозин в двата края на молекулата, като тирозина на С-терминала е аминиран (Tatemoto et al., 1982).

Имунохистохимичното изследване на експресията на NPY на светлинно микроскопско ниво дава ценна представа за разпределението и интензивността на този невропептид в спиналното тригеминално ядро. Той е ключов участник в невронната сигнализация, и е замесен в различни физиологични и патологични процеси. В това проучване имаме за цел да изясним регионалните вариации в експресията на NPY в подядрата на спиналното тригеминално ядро на плъх. Нашите резултати разкриват силна експресия на този невропептид в нервните влакна, което подчертава неговата важна роля в нервното предаване. Освен това откриването на NPY-имунореактивност в цитоплазмата на избрани спинални тригеминални неврони добавя допълнителен слой сложност към разбирането на клетъчната му локализация.

Статистически значими разлики в интензитета на NPY имунореактивността бяха наблюдавани между отделните подядра на спиналното тригеминално ядро. Особено внимание заслужава повишената експресия на NPY в каудалното подядро в сравнение с оралното и интерполарното подядро. Това несъответствие в интензитета на имунохистохимичната реакция предполага пространствено различна регулация на невропептид Y в рамките на спиналното тригеминално ядро.

С оглед на селективната експресия на NPY в спиналното тригеминално ядро, трябва да се даде обосновано предположение за функцията му в него. Днес се знае, че NPY участва в модулацията на много ефекти в ЦНС и ПНС. Например известно е, че директното инжектиране на NPY в амигдалата намалява безпокойството при проведени поведенчески тестове у плъхове (Sajdyk et al., 1999). Също така интратекалното приложение на NPY води до намаляване на ноцицепцията, като този

механизъм е независим от опиоидните и алфа-2 адренергичните механизми в гръбначния мозък (Xu et al., 1994). Освен това се знае, че при увреда или възпаление на периферен нерв се увеличава експресията на пептида в задния рог на гръбначния мозък (Ji et al., 1994). Тези резултати индиректно показват, че може да се спекулира, че NPY също участва в модулацията на болковата информация, която се обработва в спиналното тригеминално ядро, като най-вероятно би имал антиноцицептивен ефект.

Наблюдаваната регионална вариабилност в експресията на NPY в подядрата на спиналното тригеминално ядро подтиква към проучване на потенциалните функционални последици. Каудалното подядро, в което се наблюдава най-висока експресия на NPY, може да показва специализирана роля на този невропептид в модулирането на сензорната обработка или предаването на специфични видове болкови сигнали в SpVc.

Липсата на статистическа разлика в наличието на NPY между интерполарната и каудалната част предполага определено ниво на хомогенност в разпределението на NPY в тези подядра. Това наблюдение повдига въпроси относно функционалното значение на NPY в тези специфични региони и дали той играе роля в общи невронни вериги или сигнални пътища.

Освен това нашето потвърждение за наличието на NPY в мозъка на плъх, по-конкретно в рамките на спиналното тригеминално ядро, съответства на данните в наличната литература относно разнообразните роли на NPY в регулацията на ЦНС (Allen et al., 1983). Сложната взаимовръзка между експресията на NPY, субнуклеарната локализация и потенциалните функционални последици подчертава сложността на участието на невропептид Y в нервните процеси.

Като обобщение, нашите имунохистохимични изследвания хвърлиха светлина върху диференцираната експресия на невропептид Y в рамките на различните подядра на спиналното тригеминално ядро. Нашите находки допринасят за разбирането ни за нюансираното разпределение на NPY в ЦНС на плъхове и осигуряват основа за бъдещи проучвания, изследващи функционалните последици от тази регионална вариабилност в експресията на невропептид Y.

6.2.2 Газови невромодулатори

6.2.2.1 Азотен оксид

Азотният оксид се генерира ендогенно от NOS и неговият синтез зависи от наличието на кислород в клетката, а биологичната му активност пряко корелира със свързването му за хем лиганди. Ендогенният азотен оксид може да бъде синтезиран от три изоформи на NOS (ендотелна NOS, невронална NOS и индуцирана NOS), като фокусът в нашето изследване бе върху nNOS изоформата поради широкото ѝ разпространение в структурите на ЦНС.

В това проучване проведохме имунохистохимични реакции, за да изследваме разпределението в експресията на nNOS в отделните подядра на спиналното тригеминално ядро на плъх. Нашите имунохистохимични изследвания недвусмислено доказват наличието на nNOS както в нервните влакна, така и в невроните в рамките на цялото спинално тригеминално ядро. Наблюдавани бяха статистически значими разлики в експресията на nNOS между подядрата, като най-висок експресионен интензитет се установява в каудалното подядро, следвано от интерполарното подядро, а най-ниска бе експресията в оралното подядро. Интересно е, че не бе открита значителна разлика в експресията на nNOS между интерполарната и оралната част на спиналното тригеминално ядро.

Наблюдаваните регионални разлики в експресията на nNOS между подядрата на спиналното тригеминално ядро предполагат нюансиран регулаторен механизъм. Значително по-високата експресия в каудалното подядро може да показва специализирана роля на nNOS в този регион, която потенциално да допринася за модулирането на ноцицептивните сигнали или сензорната обработка, специфично идващи от страничните части на главата.

Липсата на значителна разлика в експресията на nNOS между интерполарните и оралните подядра подтиква към размисли относно потенциални функционални сходства в тези региони. Интригуващо е, че въпреки различното си топографско

местоположение в ядрото, тези подядра показват сравними нива на експресия на nNOS.

В клиничен аспект, връзката между азотния оксид и патофизиологията на мигрената се подчертава от известния ефект на инхибирането на NO за намаляване на спонтанната активност на спиналното тригеминално ядро. Наблюдението, че експресията на nNOS е най-висока в каудалното подядро, известно с участието си в сетивната обработка, идваща от страничните части на главата, допълнително подкрепя идеята, че NO може да оказва засилващ ефект върху мигрената. Тази констатация е в съответствие с информацията в достъпната литература, в която се посочва участието на NO в генерирането или модулирането на мигренозното главоболие.

При инфузия с донори на азотен оксид се установява спонтанно увеличение на невроналната активност на спиналните тригеминални неврони в експериментален модел на плъхове (Koulchitsky et al., 2004). Този факт може да ни насочи към основателното предположение, че азотният оксид като вазодилататор води до засилване в предаването на болкова информация от главата.

Относно сетивната информация, достигаща до и преминаваща през спиналното тригеминално ядро, сега се знае, че инхибирането на ендогенния синтез на NO намалява спонтанната активност на спиналното тригеминално ядро, което би трябвало да означава, че NO има тоничен ефект върху мигрената (Koulchitsky et al., 2004). Тази хипотеза вече е потвърдена с клинични изследвания. Те показват увеличаване на метаболити на NO в кръвта във вътрешната яремна вена по време на спонтанни мигренозни атаки при хора, страдащи от мигрена (Sarchielli et al., 2000). Така, азотния оксид играе важна роля в патогенезата на мигренозните атаки, което, от своя страна, означава, че активирането на nNOS би довело до увеличаване на сигналната трансдукция на невроните в спиналното тригеминално ядро. Като се има предвид, че според нашите резултати нивата на nNOS са най-високи в SpVc и SpVi, може да се предположи, че там ензимът участва активно в увеличаване на болковата трансдукция. Като в обсъждането се прибави концепцията, че отделни части на

главата имат луково разпределение в трите части на спиналното тригеминално ядро, като сетивната информация от крайните части на главата на темпоралните области достигат до каудалното субядро, се оказва, че по-голямата базална експресия на nNOS там в сравнение с останалите части на ядрото може да бъде важен фундамент в проследяването на въздействието на nNOS върху патогенезата на мигренозните атаки. Установеното наличие на експресия на nNOS в ядрото може да се използва за по-нататъшно таргетиране на ензима и неговото инхибиране с цел купиране на болковите сигнали, идващи от главата.

Нашето изследване разкри наличието на имунопозитивни клетки и нервни влакна, експресиращи nNOS, около съдовете в трите подядра на спиналното тригеминално ядро. Имунохистохимичният анализ показва локализация на nNOS-имунореактивни клетки и нервни влакна в непосредствена близост до съдовите структури, пресичащи подядрата. Идентифицирането на nNOS-положителни елементи около съдовете предполага потенциална роля на сигналите на азотния оксид (NO) в регулирането на съдовия тонус и кръвния поток в рамките на спиналното тригеминално ядро. Азотният оксид, произвеждан от nNOS, е ключова сигнална молекула, участваща в модулацията на съдовата функция, включително вазодилатацията и регулирането на кръвния поток. Наличието на nNOS-съдържащи клетки и нервни влакна около съдовете предполага участието на NO-медиирани механизми в нервно-съдовата регулация на спиналното тригеминално ядро.

Без съмнение NO и nNOS са от решаващо значение за обработката на ноцицептивната информация, особено за сенсibiliзирането на спиналните ноцицептори от втори ред (Saito et al., 1994; Lin et al., 1999). Тъй като nNOS се намира в тригеминалната система, NO вероятно участва и в обработката на болката в мозъка (Dohrn et al., 1994). Инхибиторите на NOS могат да противодействат на неврогенната стимулация на тригеминалната система (Akerman et al., 2002) и да намалят активирането на c-fos от ноцицептивни стимули в дорзалния рог на плъх (H. Wang et al., 1999; J. Wu et al., 2000). Изследванията показват, че те могат също така да намалят

дискомфорта, свързан с хроничното главоболие от тензионен тип (M. Ashina, 2002) и мигренозните епизоди (Lassen et al., 1997).

От друга страна, някои проучвания показват, че системната администрация на нитроглицерин стимулира експресията на nNOS (Pardutz et al., 2000) в спиналното тригеминално ядро на плъх. В това изследване се представя тезата, че процесът на генериране на NO стои в основата на централната сенсибилизация чрез повишената експресия на nNOS в тригеминалните ноцицептори. Поради своята селективност NO може да има директен ефект върху невроните на SpVc. Наличието на nNOS в SpV и съответно инхибирането на този ензим може да има клинично значение за възможности да се намали болката при главоболие или мигренозна атака. Така ацетилсалициловата киселина е пример за нестероидно противовъзпалително лекарство, което действа добре при лечение на остро мигренозно главоболие (Lange et al., 2000) и главоболие от тензионен тип (Fumal and Schoenen, 2008). Тяхното влияние върху простагландините и циклооксигеназа 2 в спиналния тригеминален комплекс (Yaksh et al., 2001) може да е причина за този ефект, но те могат също така да предотвратят активирането на NOS чрез намаляване на индукцията на транскрипционния фактор NF kappa β (Pardutz et al., 2004).

Освен това разпределението на nNOS-позитивните елементи около съдовете в трите подядра подчертава значението на NO сигнализацията за съдовата хомеостаза в спиналното тригеминално ядро. Близката връзка между nNOS-положителните структури и съдовете предполага потенциални взаимодействия между невронните и съдовите компоненти, което предполага участието на NO-медиирани пътища в модулацията на невронната активност и функция в ядрото.

Обобщавайки нашите имунохистохимични изследвания, те ни предоставиха ценна информация за диференцираната експресия на nNOS в подядрата на спиналното тригеминално ядро на плъх. Наблюдаваните регионални вариации повдигат интригуващи въпроси относно специфичните роли на nNOS в модулацията на болката и сензорната обработка в това ядро. Освен това корелацията между експресията на nNOS и патофизиологията на мигрената предполага потенциална

възможност за по-нататъшни изследвания на терапевтичното насочване на NO при лечението на мигрената. Като цяло тези находки допринасят за нарастващия обем от знания за неврохимичната основа на болката и предлагат потенциални възможности за разработване на целенасочено лечение на мигренозните разстройства. По-нататъшното проучване на специфичните роли на nNOS в тези региони може да разкрие общи неврохимични пътища или регулаторни механизми.

6.2.3. Невротрофни фактори и техните рецептори

Както неведнъж беше изтъкнато, спиналното тригеминално ядро участва в предаването на болката от главата. Съществуват убедителни доказателства, че някои невротрофни фактори са необходими за невронната пластичност, а изследванията на тези фактори в определени нервни клетки могат да допринесат за по-добро разбиране на основните механизми, водещи до ноцицептивни разстройства. Съчетавайки последното с последващото разделяне на ядрото на три подядра и причисляването към тях на различни сетивни зони от главата, може да се проучи внимателно как експресията на тези невротрофни фактори се манифестира в спиналното тригеминално ядро. В този смисъл, настоящото изследване предоставя имунохистохимични доказателства, че различните части на спиналното тригеминалното ядро освобождават трофични фактори, което от своя страна помага да се обяснят някои механизми, лежащи в основата на развитието на хронични състояния, свързани с ноцицепцията. Нашите резултати показват, че трите подядра експресират с висок интензитет невротрофни фактори от групата на NGF, BDNF, NT-3 и GDNF и съответните им рецептори. Тук демонстрираме наличието на NGF, BDNF, NT-3 и GDNF протеини в по-голямата част от спиналните тригеминални неврони, които също така са снабдени с техните съответни рецептори TrkA, TrkB, TrkC и GFR α 1.

Освен това нашият имунохистохимичен и полуколичествен анализ на изображенията сравняват нивата на експресия за невротрофните фактори и техните

рецептори в трите подядра. Използвайки дескриптивен статистически анализ, успяхме да докажем и сравним нивата на експресия на невротрофните фактори и техните рецептори в трите подядра на спиналното тригеминално ядро. Данните показват, че NGF се експресира равномерно от невроните в ядрото без статистически значима разлика при $p < 0,05$. Същото се отнася и за неговия TrkA рецептор. Обратното важи за нивата на експресия на BDNF, където сравнението разкрива, че трите подядра имат свои собствени експресионни нива за невротрофния фактор. Оказва се, че BDNF има най-силна експресия в невроните на оралното подядро, следван от тези в каудалното, а интензитетът на експресия в невроните на интерполарното е на последно място. Също така разликата в експресията на трите места по дължината на спиналното тригеминално ядро е статистически значима. TrkB като рецептор за BDNF показва различен експресионен интензитет и в трите подядра; в каудалното подядро нивото на експресия е най-висока, а експресията в оралното е най-ниска. Статистически значимата разлика е установена между нивата на експресия в оралното и интерполарното подядро, както и между оралното и каудалното подядро. Експресията на NT-3 е най-ниска в сравнение с другите невротрофни фактори, изследвани в нашата работа, което кореспондира с нивата на експресия на неговия TrkC рецептор, без установена статистическа разлика в трите подядра, както е видно от таблица 3.

От друга страна, имунохистохимичните резултати за GDNF показва високи нива на експресия и при $p < 0,05$ се оказва, че трите подядра са съставени от неврони с относително еднакви нива на експресия без статистическа разлика между тях. Интензивността на имунооцветяването на рецептора GFR α 1 се различава съвсем малко само на нивото на експресията му в невроните на интерполарното спрямо каудалното спинално тригеминално подядро, но все пак достатъчно, за да се открие статистическа разлика. Представянето на *Box-and-Whisker plot* е видно от таблица 1.

Значението на тези констатации се подсилва от факта, че за първи път нивата на експресия на невротрофните фактори и техните рецептори са сравнени в трите части на спиналното тригеминално ядро на плъх, което до този момент не е правено.

Сега знаем, че BDNF и GDNF заедно с техните рецептори заемат голяма част от невротрофните фактори, установените в това проучване; и, обратното, NT-3 и неговият рецептор TrkC не изглеждат толкова добре експресирани от невроните в спиналното тригеминално ядро. Има силни доказателства, че някои невротрофни фактори, като BDNF и GDNF, работещи заедно са важни регулатори за развитието на сензорните холинергични неврони в ЦНС, като последните провеждат сетивни импулси до по-висшите й центрове (Dreyfus, 1989). Предишни проучвания показват, че много растежни и трофични фактори са открити в клетъчните популации на бозайниците от спиналното тригеминално ядро (Ibáñez, 1995). Нашите резултати предоставят конкретни имунохистохимични доказателства, че невроните в спиналното тригеминално ядро на зрели плъхове експресират определени невротрофни фактори, които са NGF и GDNF, както и съответните им рецептори. Тези насоки за експресия корелират със заключението, че невроните могат да оказват трофични и/или регулаторни ефекти върху съседните клетки в спиналното тригеминално ядро на зрели плъхове чрез невротрофни фактори, които, от своя страна, играят автокринна и/или паракринна роля за насърчаване на оцеляването, растежа и диференциацията на тези клетки.

В допълнение към установената им роля за поддържане на структурните и функционалните организация на спиналното тригеминално ядро, съществуват доказателства, които допускат невротрофните фактори да подпомагат пролиферацията на невроните и диференциацията на някои клетки, произхождащи от нервния гребен (Lewin and Barde, 1996). Нашите проучвания потвърждават предишните открития и показват, че NGF и съответният му TrkA рецептор, който се свързва с висок афинитет към нервния растежен фактор, се експресират предимно от неврони в спиналното тригеминално ядро (Klein et al., 1991). Съществуват доказателства, че невроните не зависят от NGF и BDNF за оцеляването си и по този начин изискванията за растеж са различни за тези клетки. Въпреки това увеличаването на шанса за оцеляване зависи от активирането на протеина киназа B, независимо дали тя е активирана от точно тези невротрофини (Rajagopal et al., 2004).

Нашите резултати са в съответствие с хипотезата, че повишената експресия на тези невротрофини в спиналното тригеминално ядро, които регулират неговия постнатален растеж, може да повлияе на начина, по който се възприема болката на централно ниво.

За разлика от другите невротрофни фактори от семейството на NGF, NT-3 и NT-4 са изследвани много по-слабо в спиналното тригеминално ядро на зрели плъхове. В нашето проучване ние доказахме наличието на NT-3 и специфичния му TrkC рецептор, но не и този за NT-4 в невроните на ядрото. Въпреки това успяхме да покажем, че TrkB, който е общ рецептор за BDNF и NT-4, е експресиран в почти всички неврони. Добре известно е също, че NT-3, макар и с по-нисък афинитет, се свързва с TrkA, наред с TrkB (Klein et al., 1991). Всички тези данни могат да обяснят не съвсем очакваните резултати от експресията на TrkB в трите подядра, които не корелират с нивата на експресия на невротрофния фактор. Нашите данни по-скоро разкриват по този начин разликата в експресията на рецептора и невротрофните фактори и тяхното сложно взаимодействие помежду си. Следователно оцеляването на невроните изглежда зависи и от сигнализирането на TrkB.

От представените досега резултати може да се заключи, че повечето от невроните в спиналното тригеминално ядро на зрели плъхове съдържат високи нива на NGF, BDNF и GDNF и съответните им рецептори. Взети заедно, нашите резултати подтикват към дискусия, че клетките в спиналното тригеминално ядро зависят от локалното производство на определени трофични фактори.

В обобщение на всичко гореизложено, нашето проучване предполага, че експресията на невротрофни фактори в трите подядра на спиналното тригеминално ядро варира. По-специално, по-голямата част от невроните съдържат NGF, BDNF, NT-3, GDNF и съответните рецептори, а експресията им се различава значително в различните части на ядрото. Също така е вероятно клетъчните популации в ядрото да могат да упражняват чрез целия коктейл от невротрофини в тях трофичен и/или регулаторен контрол върху съседните клетки в спиналното тригеминално ядро, което предполага възможна автокринна и паракринна роля. И накрая, но не на

последно място, изводите от експресията на невротрофните фактори могат да бъдат приложени за по-доброто разбиране на тяхната роля в генезата и/или времевата еволюция на състояния, засягащи сетивната нервни пътища за болка от различни области на главата.

Тригеминалните ноцицептивни пътища са ключови при множество клинично значими хронични болкови състояния, включително мигрена, тригеминална невралгия и темпоромандибуларни нарушения. Въпреки това клетъчните механизми, които са в основата на обработката на тригеминалната болка, остават неразрешен въпрос. Една от изтъкнатите концепции относно механизмите на персистиращата тригеминална болка е централната сенсибилизация, характеризираща се с предизвикани от стимул активно-зависими пластични промени в тригеминалните неврони от втори ред, които водят до повишена възбудимост (Dubner and Bennett, 1983; Ren and Dubner, 1999; Pietrobon and Striessnig, 2003b). В този контекст, признаването на факта, че отговорът на соматосензорната система е динамичен, включващ повишена възбудимост на централните неврони, е пробив в разбирането на механизмите на хроничната болка (Woolf, 1983).

Наличието на невротрофни фактори в спиналното тригеминално ядро не бива да се анализира изолирано, тъй като те влияят върху невроните чрез комплексни системи, в които участват също биогенни амини и холинергетици. Паралелната експресия на невротрофни фактори и ацетилхолинестераза в клетъчната популация на спиналното тригеминално ядро дава възможност да се обсъди тяхната взаимовръзка. Например това, което се знае днес, е че приложението на невротрофини възможно повишава холинергичната функция, което прави невроните по-малко раними от невродегенеративни процеси (Hefti, 1986). От своя страна, връзката между GDNF и невроните, синтезиращи биогенни амини, е такава, че въвеждането на този невротрофин в мозъка на гризачи и примати води до невропротективен и невровъзстановителен ефект (Yasuda and Mochizuki, 2010). Следователно, напълно правдоподобно е да се предположи, че BDNF и GDNF силно

повишават преживяемостта и оказват трофичен ефект върху невроните на спиналното тригеминално ядро. В тази връзка, ние успяхме да наблюдаваме експресия на рецептора на GDNF, GFR α 1 в невроните на ядрото у полово зрели плъхове, което подсказва вероятността този невротрофин да действа локално чрез специфичния си рецептор.

Получените от нас резултати са в съответствие с данните от по-ранни изследвания (Saria et al., 1985; Hua et al., 1986), които съобщават за множествената застъпеност на някои тахикинини и CGRP в гръбначния мозък. Настоящите ни констатации предполагат, че наличието на CGRP и SP в спиналното тригеминално ядро може да потенцира ролята им на ко-трансмитери в ранните централни синапси на тригеминалния път, като по този начин засили ноцицепцията. Това твърдение е в съответствие с предишни изследвания, които подчертават ко-трансмитерната роля на CGRP и SP в ноцицепцията (Wiesenfeld-Hallin et al., 1984; Oku et al., 1987). Още повече, че предишни изследвания потвърдиха множествената им застъпеност, както и съвместното освобождаване (Holzer, 1988).

Други изследвания потвърждават, че SP функционира като медиатор или модулатор в отделен подклас на първични тригеминални сензорни неврони (Hökfelt et al., 1975). Идеята, че SP функционира като възбуждащ трансмитер в първичните аферентни влакна, е изказана за първи път от *Otsuka* и *Konishi* (1976) (*Otsuka* M, 1976). По-късно тази теория е потвърдена от *Otsuka* и съавтори (1982), които откриват, че гръбначните неврони са силно стимулирани, когато SP се освобождава от първичните аферентни терминали в гръбначния мозък в отговор на електрическа стимулация на дорзалните корени (*Otsuka* et al., 1982). Тези резултати показват, че невроните на мозъчния ствол участват в съдовата болка от главата, което се потвърждава от съобщените невронни реакции в каудалното подядро на спиналното тригеминално ядро в мозъчния ствол, предизвикани от електрическа стимулация на *a. meningeae media* (Davis and Dostrovsky, 1986).

Според теорията на *Moskowitz* за ортодромното провеждане на болезнени стимули към мозъчния ствол и висшите мозъчни центрове за регистриране на

болката, SP се освобождава от централните терминали в тригеминалния нерв, стимулирайки невронната мрежа в каудалното спинално тригеминално ядро (Moskowitz et al., 1989). Заслужава да се отбележи, че емпиричните данни подкрепят схващането, че CGRP усилва трансудацията на плазмени протеини, генерирана от SP (Gamse and Saria, 1985). Според *Pedersen-Bjergaard et al.* (1991) инжектирането на CGRP и SP в човешкия *m. temporalis* предизвиква миофациален дискомфорт. Този резултат води до заключението, че неuropeптидните ефекти са основен допринасящ фактор за това усилване на болката (Pedersen-Bjergaard et al., 1991).

В съответствие с това *Uddman et al.* (1985) предлагат, че едновременното освобождаване на CGRP и SP от активираните от тригеминално-съдовата система нервни влакна на мозъка допринася за опосредстването на съдовите реакции (Uddman et al., 1985). Комбинираните ефекти на тези неuropeптиди са потвърдени от няколко изследвания. По-специално, доказано е, че CGRP увеличава ефектите на SP, когато се прилага заедно с него в ЦНС (Wiesenfeld-Hallin et al., 1984). Смята се, че това подобрене се дължи на способността на CGRP да блокира ензим, който разгражда SP (Le Greves et al., 1985). По този начин след електрическа стимулация на тригеминалния ганглий тези субстанции могат да се произвеждат от централните тригеминални терминали и да взаимодействат с CGRP и SP в каудалното подядро на спиналното тригеминално ядро.

Следователно степента и/или продължителността на болезнените стимули може да бъде свързана с производството на CGRP в тригеминалния ганглий, тъй като SP, произвеждана в клетъчните тела, се доставя както до периферните, така и до централните аксони. Освен това се предлага съпоставимо освобождаване от периферните аксони на сетивните неврони на тригеминалния ганглий, инервиращи дуралните кръвоносни съдове, по време на тригеминалната активация, като се предполага съвместно освобождаване на CGRP и SP от централните тригеминални терминали по време на експериментална мигрена. Това е в съответствие с проучванията, показващи повишени нива на SP и CGRP в слюнчените секрети на пациенти с мигрена и cluster главоболие (Nicolodi and Bianco, 1990).

Въпреки това, съобщените несъответствия за липса на определени неuropeптиди (Friebert et al., 1994) в кръвта на пациентите по време на началото на мигренозната аура вероятно се дължат на използвания метод за вземане на периферна кръв (Vécsei et al., 1995). Вероятно пептидите са претърпели разграждане преди да бъде взета кръв или че времевата рамка, предвидена за натрупване на концентрациите на неuropeптидите в кръвта, не е била достатъчно точна. Според Vécsei et al. (1995) бързият метаболизъм на освободения CGRP го принуждава да загуби инхибиращото си действие върху ензимното разграждане на SP (Vécsei et al., 1995). Тази идея се подкрепя от откритието, че след електрическа стимулация на *sinus sagittalis superior* антагонистът на SP, GR205171 не е в състояние да блокира или намали експресията на c-fos в тригеминалното ядро на котката (Goadsby et al., 1998). Това е в съответствие с клиничните констатации (Goldstein et al., 1997; Diener and Goadsby, 1998), че SP антагонистите са неефективни при спирането на остри мигренозни епизоди.

Възможният патомеханизъм, предложен от Moskowitz (1989), е свързан с корелацията, която тези неuropeптиди имат с мигрената. Според този автор ноцицептивни медиатори като простагландини, хистамин, серотонин и брадикинини биха се произвеждали, синтезирали или транспортирали от кръвообращението при активиране на тригеминално-васкуларната система, например при увреждане на стената на кръвоносните съдове. Тези медиатори деполяризират или намаляват прага на сетивните периваскуларни нервни влакна, като се свързват с определени рецептори на тези влакна. Като предизвиква локализирано освобождаване на вазоактивни невротрансмитери като SP от периферните тригеминални нерви в стените на кръвоносните съдове. Деполяризацията едновременно насърчава ортодромното и антидромното провеждане на сетивния стимул. Докато ортодромната ос предава ноцицептивната информация към спиналното тригеминално ядро и висшите мозъчни области за регистриране на болката, антидромната проводимост отговаря за разпространението на възпалителния отговор към близките тъкани (Moskowitz et al., 1989). В резултат на това е

предложено, че активирането на периферната тригеминоваскуларна система предизвиква централно съвместно освобождаване на CGRP и SP, което, от своя страна, стимулира ноцицептивните мрежи на спиналното тригеминално ядро и висшите мозъчни центрове.

BDNF, който се произвежда от централните терминали на първичните сензорни неврони на спиналните ганглии, е замесен в процесите на централна сенсибилизация в гръбначния мозък (Kerr et al., 1999; Mannion et al., 1999). Тъй като периферното възпаление повишава нивата на NGF, невроналната активност и регулирането на BDNF, критичната функция на BDNF в централната сенсибилизация изглежда е най-изявена точно след възпалителна реакция (Mannion et al., 1999). Важно е да се подчертае, че повечето състояния на тригеминална болка са свързани с възпалителен механизъм (Pietrobon and Striessnig, 2003a). В тази връзка, NGF се свързва с тригеминалните болкови състояния в клинични изследвания като едно такова проучване установява, че лицата с хронично главоболие имат по-високи от нормалните нива на NGF в цереброспиналната течност (Sarchielli et al., 2001). Освен това TrkA, високоафинитетен NGF рецептор, се експресира от ноцицепторите на тригеминалния ганглий и контролира синтеза на BDNF в тези клетки (Pan et al., 2000). Резултатите от настоящото проучване са сред първите, които доказват експресия на BDNF в спиналното тригеминално ядро и съответно предполагат, че BDNF може да подобна ноцицептивна функция, присъща на гръбначния мозък.

Ние показваме, че BDNF присъства в нервните влакна в спиналното тригеминално ядро. Следователно е възможно BDNF да играе роля в процесите на централна сенсибилизация в тригеминалните ноцицептивни пътища. Според по-ранни изследвания (Jacobs and Miller, 1999; King et al., 1999) невроните от втори ред в тригеминалните сетивни пътища експресират високоафинитетния рецептор за BDNF, TrkB, което подкрепя това твърдение.

Данните в литературата представят и друг уникален механизъм за регулиране на освобождаването на BDNF, контролиран от CGRP. Според наличната

информация централно освободеният CGRP може да засили освобождаването на BDNF в пресинаптичните терминали на тригеминалните ноцицептори. Това твърдение се подкрепя от откритието, че човешките тригеминални ганглии *in vivo* съдържат CGRP мРНК (Edvinsson et al., 1997). Освен това има доказателства, че CGRP увеличава освобождаването на глутамат и аспартат от първичните аферентни пресинаптични терминали в задния рог на гръбначния мозък (Kangrga and Randic, 1990). Рецепторът на CGRP е разположен в гръбначния мозък, както на пресинаптични, така и на постсинаптични места (Ye et al., 1999). Предишни изследвания показаха, че BDNF и други растежни фактори могат да контролират производството и освобождаването на CGRP и от сетивните неврони (Malcangio, 1997; Malcangio and Lessmann, 2003; Price et al., 2005). Следователно е възможно BDNF и CGRP да взаимодействат реципрочно в тригеминалните синапси.

Като се има предвид, че както BDNF, така и CGRP се регулират от възпалителни състояния, това е от особено значение за механизмите, включващи индуцирана от възпаление хипералгезия и други форми на сензорна пластичност (Donaldson et al., 1992; Donnerer et al., 1992; Mapp et al., 1993). Това предполага, че тригеминалните неврони могат да кодират динамичните характеристики на даден стимул чрез комбиниране на традиционните невротрансмитери с активно-зависимото освобождаване на BDNF.

В същото време, добре известно е, че влиянието на серотонина зависи от това към кой подтип серотонинов рецептор невромедиаторът ще се захване. Например активирането на рецепторите 5-HT_{2A} и 5-HT₃ има тенденция да увеличава ноцицепцията, но активирането на рецепторите 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} и 5-HT₇ обикновено има антиноцицептивен ефект (Ossipov, et al., 2014). Друга предишна работа показва, че увреждането на инфраорбиталния нерв променя ефикасността на редактирането на РНК (Nakae et al., 2008), което променя състава на изоформите на 5-HT_{2C} рецептора в шийната част на гръбначния мозък на плъхове. Спиналните 5-HT рецептори стават по-отзивчиви към серотонин в резултат на тази предизвикана от увреждането промяна, която също така е намалила експресията на по-

редактираните изоформи и е повишила експресията на по-малко редактираните изоформи. В резултат на това серотонинът инхибира ноцицептивните сигнали от първичните аферентни неврони към каудалното спинално тригеминално подядро, като активира низходящия инхибиторен път на мозъчния ствол към гръбначния мозък. Според *Nakae et al.* тази регулация на редактирането на мРНК е предложена като адаптивна стратегия, защитаваща входно-изходния баланс на 5-НТ системата в отговор на серотонинергичната дисфункция при специфични клинични ситуации, като например изчерпване на 5-НТ или хирургичен стрес (Nakae et al., 2008).

В изследванията върху хора ноцицептивната болка в периферните тъкани е била обект на три клинични проучвания (Van Gerven et al., 2017; Exposto et al., 2018; Boscato et al., 2022), а едно проучване (Costa et al., 2019) е изследвало невропатната болка чрез генотипизиране. Мозъчният ствол не е изследван при хора, а единственият невротрофин, който е взет предвид, е NGF и неговият рецептор. Периферната тъкан е избрана като мишена поради нейната достъпност и ниските рискове за пациентите. Освен това нивата на NGF в проби от назална биопсия от пациенти с идиопатичен ринит не се променят (Van Gerven et al., 2017). *M. masseter*, но не и *m. temporalis*, става по-механично чувствителен към многократни интрамускулни инжекции на NGF при здрави хора. Въпреки това нито честотата на отнесената болка, нито броят на дните с главоболие се увеличават от инжектирането на NGF (Exposto et al., 2018). Само кортикомоторната възбудимост е била значително повлияна от инжектирането на NGF в *m. masseter* на хора с *bruxismus* и на контролите. Както и в двете групи NGF сенсбилизацията е подобрила механизмите за регулиране на силата и функцията на *m. masseter*, което може да е защитило орофациалните мускулно-скелетни структури, като е забавило настъпването на по-интензивен челюстен дискомфорт. Накрая, съществува изследване (Jasim et al., 2020), което не разкрива връзка между човешката тригеминална невралгия и полиморфизмите в гена *TrkA*. Разгледани в съвкупност, резултатите от клиничните проучвания сочат защитен ефект към ноцицепцията, но неясна роля за NGF (Boscato et al., 2022).

6.3 Ограничения на проучването

6.3.1 Технически недостатъци на методите за оцветяване

Настоящото проучване показва малките и стъблестите неврони, които са характерни за спиналното тригеминално ядро, но също и идентифицира и голям брой невронни типове в ядрото с различна външна морфология. По-специално, изследването съобщава за наличие на единични големи неврони с диаметър на тялото до 45 μm , характеристика, която не е документирана в спиналното тригеминално ядро на плъх досега. Освен това неврони с характерни форми, като октоподобни, ладиевидни и лобулирани клетки, са докладвани за пръв път в спиналното тригеминално ядро на плъх, без прецедент за наличие на подобни неврони в това ядро на други видове. Въпреки това, за визуализиране и характеризиране на невроналните видове, от решаващо значение е да се отчитат факторите, влияещи върху методите за оцветяване, включително вида и селективността на оцветителния метод, разликите в хистологичните техники, прилагани в различните лаборатории, възрастта на експерименталните животни и начина на фиксиране, наред с други променливи (Zaqout & Kaindl, 2016). С оглед на това, ние логично допускаме, че е напълно възможно някои от типовете неврони, съобщени за първи път в това проучване, да съществуват и в спиналното тригеминално ядро на други животински видове, но неоткриването им до момента да се дължи на някои от горепосочените технически фактори, влияещи върху процеса на оцветяване и последваща визуализация на нервните клетки.

6.3.2 Недостатъци на полуколичествената имунохистохимия

За да обективизираме имунохистохимичните находки в това изследване, ние приложихме количествени техники, базирани на компютърно подпомагана микроскопия. Тази техника, обаче, има редица потенциални недостатъци, които минимизират общата ѝ полезност. Първо, разликите в обработката на тъканите в

партидната специфичност на имунооцветяване могат да повлияят на резултата от имунохистохимичната процедура, особено на интензивността на имунооцветяването и по този начин могат да компрометират правилното тълкуване на резултатите от оцветяването. Като се има предвид, че качеството на хистологичното оцветяване зависи от първичната обработка на тъканта, е напълно възможно различията в интензивността на имунооцветяването да са резултат от разлики в тъканната фиксация или пренасищане на хромогенната реакция, което, от своя страна, може да доведе до разлики в получените цифрови изображения, като по този начин повлияе анализа на изображението. За да преодолеем този проблем, в хода на реакциите ние едновременно инкубирахме срезове от трите подядра, за да намалим всякакви грешки, причинени от вариации по време на имунохистохимичната процедура.

Друг методологичен проблем може да бъде точното калибриране на системата преди използването ѝ за количествено определяне на интензитета. За тази цел системата за анализ на изображението трябва да има калибратори, подходящи за типа анализ и параметрите, които се оценяват. Освен това те трябва да бъдат така избрани, за да бъдат подходящи и впоследствие коригирани. Поради тези проблеми цифровите методи изискват подходящо валидиране и следователно системата трябва да бъде прецизно калибрирана, преди да започне измерването на яркостта.

И накрая, цифровата фотомикроскопия е основен източник на потенциална променливост; правилното получаване на цифрово изображение се оказва трудно освен ако всички фактори, които могат да повлияят на качеството на снимката, не са известни и строго контролирани. Освен това, наличните в търговската мрежа програми са ограничени до праг на цветовете и преброяване на пиксели; всеки цвят е ограничен до присвояване на цифрова стойност или сива скала между 0 и 255. В крайна сметка обработката и анализът на изображенията трябва да се извършват по идентичен начин за експерименталните и контролни проби.

Независимо от всички потенциални технически ограничения на количествената имунохистохимия, нашето проучване показва, че този подход може да се използва за точно определяне на количеството биоактивни вещества и техните

рецептори, представляващи интерес в специфична(и) тъкан(и). Въпреки това са необходими мерки за контрол на качеството при окончателния анализ на данните.

6.3.3 Ограничения и спецификации в експерименталната група животни

Макар че настоящото проучване допринася с ценна информация за нивото на експресия на различни невротрансмитери, биоактивни вещества, ензими, свързани с метаболизма на някои невромедиатори, както и на невротрофни фактори и техните рецептори в трите подядра на спиналното тригеминално ядро у плъх, съществуват някои конкретни ограничения на изследването, които трябва да бъдат признати. На първо място, използвани в това изследване експериментални животни са само мъжки плъхове. Това означава, че половите различия в структурата и неврохимичната принадлежност на изследваните неврони не са отчетени. Този аспект е важен, тъй като съществен акцент в подобни генерални проучвания през последните десет години, е евентуално наличие на полови различия в патологичния механизъм на болката, чиято биологична основа е описана в няколко обзорни научни труда, свързани с невропатичната болка (Sorge et al., 2015; Mapplebeck et al., 2016). Авторите на тези студии установяват например, че участието на BDNF, отделен от микроглиални клетки в гръбначния мозък, в индуцирането на механична алодиния след невронална увреда е специфично за мъжете (Sorge et al., 2015). В допълнение, изследвано е влиянието на 17- β -естрадиол върху нарушенията в темпоромандибуларната става, и е отчетено че жените с репродуктивна способност са особено засегнати от този вид болка (Wu et al., 2015). Приведените данни показват, че 17- β -естрадиол регулира експресията на TRPV1 и NGF по дозозависим начин (Wu et al., 2015). Освен това е установено, че NGF повишава броя на невроните, които експресират NMDA рецептора в тригеминалния ганглий на плъх и при двата пола, но експресията на някои сензорни неuropeптиди (CGRP и SP) се е увеличила в ганглийните клетки само при женските плъхове (Van Gerven et al., 2017). Тези изследвания подсказват, че са налице значителни полови различия в начина, по

който се експресират някои от тестваните от нас невроактивни протеини. С оглед на тези съществуващи разлики, възможно е резултатите от настоящото изследване да са различни, ако са били включени женски плъхове.

Второ, всички плъхове, използвани в това проучване, са от една и съща порода, което може да ограничи обобщаването на резултатите върху целия вид животни. Възможно е различните породи плъхове да експресират проучените активни вещества по различен начин в трите подядра на спиналното тригеминално ядро, което означава, че резултатите от това проучване може да не са приложими за други породи плъхове или други експериментални животни. Оттук трябва да се направи изводът, че представените резултати и тяхната интерпретация се отнасят за плъхове порода Wistar.

И накрая, важно е да се отбележи, че настоящото проучване се фокусира само върху нивата на имунохистохимична експресия на проучените субстанции в спиналното тригеминално ядро у плъх, без да се взимат под внимание каквито и да е било променливи величини. Други потенциални фактори, като например диетата на плъховете, околната среда и предишен опит, не са взети под внимание.

Тъй като нашето изследване има за цел да установи базалните нива на много субстанции, чиято роля се оказва важна и комплексна в състоянията, които засягат предаването на болковата информация от главата, диетата на плъховете трябва да се вземе предвид при по-нататъшни изследвания. Оказва се, че диетата оказва влияние върху състояния, които са свързани със сетивната трансдукция. Досега са изследвани ефектите на различни видове диети по отношение на мигрената и главоболието (Bellamy et al., 2006; Alpay et al., 2010; Di Lorenzo et al., 2013). Предполага се, че хранителните интервенции биха могли да повлияят на характеристиките на главоболието/мигрената чрез различни механизми. Тези механизми могат да включват повлияване на серотонинергичната дисфункция, невроналната възбудимост, нивата на неврохимични фактори като CGRP и азотен оксид (NO), а също и на някои хормони като адипонектин и лептин с роля в патогенезата на мигрената, влиянието на мозъчната митохондриална функция, невровъзпалението,

хипоталамичната функция и тромбоцитната агрегация (Le May et al., 2000; Bellamy et al., 2006; Peterlin et al., 2016; Deen et al., 2017; Edvinsson et al., 2018; Ramachandran, 2018). Тези фактори биха могли да повлияят на синтеза на биоактивните вещества в трите изучавани подядра.

Въпреки тези ограничения, ние вярваме че настоящото изследване дава важен принос към областта на невронауките и подчертава потенциалната роля на някои неврохимикали в невроналната функция и преживяемостта на невроните в спиналното тригеминално ядро. Бъдещите изследвания могат да имат за цел да се справят с тези ограничения и да разширят резултатите от настоящото проучване, за да се постигне по-цялостно разбиране на основните аспекти в цитоархитектониката и неврохимията на това ядро.

6.4 Бъдещи насоки и перспективи

Като се има предвид гореизложеното, бъдещите ни изследователски усилия ще бъдат насочени към проучване на експресията на други субстанции, които могат да имат влияние върху невроналната трофика и сетивна трансдукция в спиналното тригеминално ядро, както и продължаване на изследванията, свързани със структурата на трите подядра на клетъчно и субклетъчно ниво. В този контекст ние планираме провеждане на конкретни експерименти за изследване на следните характеристики на спиналното тригеминално ядро:

6.4.1 Проучване на степента на имунохистохимична експресия на допамин

Към момента на последната актуализация на познанията ни по темата към датата на завършване на този труд, специфичната роля на допамина в спиналното тригеминално ядро не е широко проучена или добре документирана в литературата. Понастоящем, по-голямата част от изследванията, свързани с допамин, традиционно се фокусират върху ролята му в ЦНС, особено в области като базалните ганглии (Smith & Kieval, 2000) и мезолимбичния път (Pierce and Kumaresan, 2006).

Допаминът е невротрансмитер, който играе решаваща роля в различни физиологични функции, като например двигателен контрол (Gepshtein et al., 2014), механизми за възнаграждение (Lewis et al., 2021) и регулиране на настроението (Salgado-Pineda et al., 2005). Той е свързан предимно с допаминергичните пътища в мозъка, като нигростриаталния път и мезокортиколимбичния път. Допаминовите рецептори се намират в различни части на ЦНС, като например в гръбначния мозък, където модулират сензорните и моторните функции. В достъпната литература са налице данни за експресия на допамин и допаминови рецептори на иРНК и протеинно ниво в мезенцефалното тригеминално ядро (Лазаров, 2000; Lazarov, 2002, 2007), но досега не е акцентирано върху експресията им в спиналното тригеминално ядро (Liu et al., 2019), както и за потенциалните взаимодействия или модулиращи ефекти на допамина в тригеминалната сензорна обработка (Bergerot et al., 2007).

Ето няколко точки, които биха могли да бъдат проучени в бъдещи изследвания:

- Изследване на нивата на експресия на допамина в трите подядра на спиналното тригеминално ядро чрез имунохистохимични реакции;
- Модуляция на сетивната обработка: проучване дали и кои от допаминовите рецептори в спиналното тригеминално ядро модулират сензорната обработка на усещанията за лицето и главата. Това би могло да включва изучаване на ефектите на допаминовите агонисти и антагонисти върху сетивните реакции в SpV.
- Модуляция на болката: Изследване на ролята на допамина в модулирането на сигналите за болка, обработвани в спиналното тригеминално ядро. Известно е, че допаминът играе роля във възприемането на болката и разбирането на влиянието му в това специфично ядро може да има последици за лечението на болката.
- Взаимодействия с други невротрансмитери: изследване на потенциалните взаимодействия между допамина и други невротрансмитерни системи в спиналното тригеминално ядро. Невротрансмитерните системи често си взаимодействат по сложен начин и разбирането на тези взаимодействия би

могло да даде представа за по-широкото функциониране на тригеминалния сетивен път.

Нашите намерения са да продължим да изучаваме неврохимичния профил на спиналното тригеминално ядро, като хвърлим повече светлина върху деликатните взаимовръзки между отделните невротрасмитери в ядрото, които заедно водят до приемане, обработка и предаване на сетивната информация за болка и температура.

6.4.2 Стереологични изследвания за цитоархитектурата на трите части на спиналното тригеминално ядро

Стереологията е изключително важен и систематичен метод за безпристрастен количествен анализ на триизмерни структури, което я прави основен инструмент за изследване на клетъчните и структурните характеристики на нервните ядра, включително спиналното тригеминално ядро. Тъй като това ядро участва в обработката на сензорна информация, свързана с лицето и главата, то изисква прецизни количествени оценки, за да се разберат в детайли неговите структурни особености и функционални отнасяния.

- **Количествена оценка на невроните:** Стереологичните техники позволяват точна количествена оценка на общия брой неврони в трите части на спиналното тригеминално ядро. Това е от основно значение за разбирането на клетъчния състав и потенциалните вариации в броя на невроните в различните региони на ядрото.
- **Оценка на обема:** Стереологията позволява безпристрастна оценка на обема на трите части на спиналното тригеминално ядро. Промените в обема на ядрото могат да дадат ценна информация за налични промени в структурната организация, което потенциално може да даде представа за функционалните различия или адаптационните изменения в ядрото в отговор на различни външни стимули или патологични състояния.

- **Дължина и плътност на капилярната мрежа:** Количественото определяне на общата дължина на капилярната мрежа в спиналното тригеминално ядро предоставя информация за съдовото снабдяване, поддържащо нервната тъкан. Оценката на плътността на капилярите помага да се разбере пространственото разпределение на кръвоносните съдове в ядрото, което е от решаващо значение за метаболитните нужди и за поддържане на невронната активност.
- **Площ на напречното сечение на капилярите:** Стереологичните методи могат да бъдат приложени за определяне на глобалната средна площ на напречното сечение на капилярите в трите части на спиналното тригеминално ядро. Този параметър е от съществено значение за разбирането на ефективността на обмена на хранителни вещества и кислород в нервната тъкан, като може да хвърли допълнителна светлина върху метаболитните нужди на различните области в ядрото.
- **Взаимовръзка между невронните и съдовите параметри:** Изследването на връзката между общия брой неврони и съдовите параметри (дължина, плътност и площ на напречното сечение на капилярите) дава цялостна представа за невро-съдовата връзка в спиналното тригеминално ядро. Тази информация е от съществено значение за разкриване на сложните взаимодействия между невронните и съдовите компоненти при поддържането на нормалната физиологична функция.
- **Патологични последици:** Стереологичният анализ на спиналното тригеминално ядро може да бъде особено ценен при патологични състояния, засягащи тригеминалната система. Промените в броя на невроните, обема и съдовите параметри могат да послужат като количествени маркери за прогресията на заболяването, допринасяйки за по-доброто разбиране на структурните промени, свързани с неврологичните заболявания, засягащи лицето и главата.

В заключение, прилагането на стереология в бъдещата ни работа върху спиналното тригеминално ядро е от ключово значение за получаването на обективни

и точни количествени данни. Комбинацията от невронни и съдови оценки ще осигури цялостен поглед върху структурните и функционалните характеристики на различните области в рамките на спиналното тригеминално ядро, допринасяйки за напредъка в разбирането ни за сетивната обработка и потенциалните последици за неврологичното здраве.

6.4.3 Проучване на ултраструктурата на спиналното тригеминално ядро у плъх

Бъдещите проучвания, насочени към изясняване на ултраструктурата на трите подядра на спиналното тригеминално ядро, биха били възможни с прилагането на модерни техники за образно изобразяване като сканираща електронна микроскопия и трансмисионна електронна микроскопия. Успешно реализирани, те обещават да допринесат за по-доброто разбиране на клетъчната и синаптичната организация в това критично ядро на мозъчния ствол.

Сканиращата електронна микроскопия предлага възможност за визуализиране на повърхностната морфология на невроните, глиалните клетки и синаптичните връзки в най-малки подробности. Като изследва триизмерната архитектура на невронните тела, дендрити и аксонални терминали, сканиращата електронна микроскопия може да предостави ценни сведения за структурните характеристики и пространствените взаимоотношения на клетъчните елементи в рамките на спинално тригеминално ядро. Високата разделителна способност на този метод за визуализация може да разкрие и сложни характеристики като наличие на дендритни шипове, аксонни терминали и синаптични контакти между спиналните тригеминални неврони, хвърляйки допълнителна светлина върху синаптичната организация на ядрото.

Трансмисионната електронна микроскопия (ТЕМ), от друга страна, осигурява визуализиране на ултраструктурни детайли в нанометричен мащаб, което позволява изследване на клетъчни органели, синаптични везикули и синаптични мембрани с несравнима разделителна способност. ТЕМ може да даде представа за субклетъчната организация на невроните, включително морфологията и разпределението на

синаптичните контакти, разположението на невротрансмитерните рецептори и ултраструктурните характеристики на синаптичното предаване в ядрото. Чрез характеризиране на синаптичната архитектура и синаптичната ултраструктура в рамките на спиналното тригеминално ядро изследванията с ТЕМ могат да подобрят разбирането ни за синаптичната организация и функционалната свързаност, които са в основата на сензорната обработка и модулацията на болката в тази област на мозъчния ствол.

Освен това, в хода на изследванията могат да се прилагат допълнителни подходи, като имуноелектронна микроскопия (CLEM – correlation between light and electron microscopy) за локализиране на специфични протеини, невротрансмитери и рецептори на ултраструктурно ниво, като се даде представа за молекулярния състав и синаптичната локализация на ключови сигнални молекули в рамките на спиналното тригеминално ядро.

Като цяло, гореописаните бъдещи проучвания имат потенциала да изяснят сложната ултраструктурна организация на трите подядра на спиналното тригеминално ядро, разкривайки синаптичната архитектура и клетъчната му свързаност, които са в основата на сензорната обработка, модулацията на болката и неврохимичната сигнализация в това критично ядро на мозъчния ствол.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спиналното тригеминално ядро е важна структура в ЦНС, което получава сетивна информация за болка и температура от главата и лицето. Ядрото представлява билатерален клъстер от непрекъснати неврони, разположени от най-ростралните области на гръбначния мозък, продължаващ в продълговатия мозък и достигащ до моста, като по хода си то може да се раздели на три части – *subnucleus caudalis*, *interpolaris* и *oralis*, съответно представени от рострална към каудална посока. В клетъчно отношение, ядрото се състои от различни по големина и форма неврони, глиални клетки и нервни влакна. Това описание на ядрото корелира с функционалната обособеност на ядрото, показващо, че отделните части на ядрото са свързани с приемането, обработката и предаването на сетивна информация от различни участъци на лицето.

Изследването на невроните в спиналното тригеминално ядро обхваща различни методологии, всяка от които хвърля светлина върху различни аспекти на невронните му характеристики. Това изследване се впуска в разширено проучване отвъд традиционните класификации, основани на размера на клетките, като има за цел да осигури нюансирано разбиране чрез включване на оценки на невронната морфология и разкриване на неврохимичния профил в това ядро.

Включвайки морфологични дескриптори, настоящото изследване прилага втори подход, като разглежда внимателно разнообразните форми на невронните тела в рамките на спиналното тригеминално ядро. Чрез вникване в тънкостите на невронната морфология се постига по-цялостно описание на седем различни морфологични типове неврони, присъстващи в това ядро.

Освен размера и формата, неврохимичният състав на невроните е друг важен аспект, който влияе върху обслужваните от тях функционалните модалности. Това изследване повишава нивото на изследване, като разкрива неврохимичния профил на невроните в рамките на спиналното тригеминално ядро, хвърляйки светлина

върху основните биоактивни вещества, синтезирани от неговите невронални субпопулации.

В нашето проучване ние установихме забележително неврохимично кодиране на спиналните тригеминални неврони, което разкрива присъствие на широк спектър от невроактивни субстанции, вкл. класически невротрансмитери, невропептиди и невротрофини, за които се предполага, че осъществяват важна роля в болковата трансдукция. С голяма доза сигурност може да се предположи, че невроните на спиналното тригеминално ядро посредством утилизирани от тях невротрансмитери модулират сетивната информация за болка. Спиналните тригеминални неврони също така експресират невротрофни фактори и техните съответстващи рецептори, които най-вероятно допринасят за тяхната преживяемост при необичайни условия на околната им среда и подпомагат невроналната пластичност към промените от постъпващата болкова информация.

В светлината на гореспоменатите съображения настоящото изследване представя обобщена характеристика на спиналните тригеминални неврони, като изяснява съществуващото тясно взаимодействие между невроналната морфология и неврохимичните профили. Като възприемаме холистичен подход, ние се стремим да допринесем за натрупване на разширено познание и нови прозрения за сложната архитектура на спиналното тригеминално ядро и неговата решаваща роля в сензорната обработка на информацията от областта на главата и лицето.

VIII. ИЗВОДИ

1. Спиналното тригеминално ядро (SpV) притежава сложна вътрешна структура, включваща специфично подреждане на неврони, глиални клетки и техните влакна. Тази структурна организация обуславя важната роля на ядрото в приемане, обработка и предаване на соматосетивната информация от лицето.
2. Наличието на неврони с различна външна морфология на своите перикариони показва структурната комплексност в организацията на трите подядра на SpV.
3. Неврохимичният профил на спиналното тригеминално ядро се характеризира с голямо разнообразие от ендогенни невроактивни лиганди, които включват класически невротрансмитери като GABA, 5-НТ, неuropeптидите SP, NPY и CGRP, както и ензимите nNOS и AChE, свързани с метаболизма на някои от тези невротрансмитери/невромодулари. Те предполагаемо играят важна роля при трансдукцията, обработването и пренасянето на болковата информация.
4. Клетъчните популации в спиналното тригеминално ядро у плъх експресират невротрофни фактори и съответните им рецептори, които най-вероятно са значими за преживяемостта на невроните както на това ядро като обща структура, така и на отделните му подядра.
5. Разликата в морфологията на невроните в трите подядра на SpV е свързана с различия в експресията на изследваните биоактивни вещества. Всяко подядро притежава своя уникален неврохимичен профил, който най-вероятно му предоставя възможност да обработва сетивна информация по различен начин.
6. Невроните във всяко подядро на SpV експресират по диференциран начин имунореактивност към невротрофни фактори и техните рецептори. Това най-вероятно означава, че всяко подядро притежава специфичен модел на отговор към увреждащи стимули, поддържайки трофиката на невроните си и тяхната неврохимична пластичност. Неминуемо идентифицираните невротрофните фактори, невротрансмитерите и невромодулаторите взаимодействат помежду си за поддържането на локалната среда в подядрата на SpV.

IX. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Потвърдителни приноси

1. Спиналното тригеминално ядро у плъх е организирано в три ростокаудални подядра, всяко от тях с характерна цитоархитектоника.
2. Установени са високи експресионни нива на класически инхибиторни медиатори като гама-аминомаслена киселина и моноаминовия трансмитер серотонин в невроните на спиналното тригеминално ядро.
3. В спиналните тригеминални неврони е намерена повишена експресия на неuropeптидите субстанция Р и калцитонин генно-свързан пептид, както и ниски експресионни нива на неuropeптид Y в невроните и нервните влакна в спиналното тригеминално ядро.
4. Демонстрирана е активност на метаболитни ензими като невронална азотен оксид синтаза и ацетилхолинестераза в единични неврони и нервни влакна в спиналното тригеминално ядро на плъх.
5. Наблюдавана е забележима имунореактивност за невротрофните фактори NGF, BDNF, NT-3 и GDNF, и техните специфични рецептори TrkA, TrkB, TrkC и GFR α 1 в клетките на спиналното тригеминално ядро у плъх.

Оригинални приноси

1. Представена е цялостна морфологична и обобщена неврохимична характеристика на спиналните тригеминални неврони в мозъка на плъх.
2. Описана е детайлната структурната организация и цитоархитектониката на подразделенията на спиналното тригеминално ядро у плъх.
3. Дефинирани са седем морфологични типа неврони в спиналното тригеминално ядро на плъши мозък.
4. Направен е сравнителен статистически анализ на разпределението на изследваните биоактивни вещества в трите подядра на спиналното тригеминално ядро у плъх и е установен точния неврохимичен профил на невроните в тях.
5. Установена е пряка корелация между дефинираното химично кодиране на невроналните субпопулации в структурните подразделения на спиналното тригеминално ядро и обслужваните от тях функционални модалности.

Х. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. (2019) Cytoarchitecture of the spinal trigeminal nucleus in rats. *Acta morphologica et anthropologica* **26**: 46-50.
2. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. (2023) Expression of neurotrophic factors and their receptors in the rat spinal trigeminal nucleus. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, in press **(IF – 0.329)**
3. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. (2024) Neuronal types in the rat spinal trigeminal nucleus. *Acta morphologica et anthropologica*, in press

XI. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. Neuroanatomy of the trigeminal spinal nucleus in rats. *XXIV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society, May 31 – June 2, 2019, Stara Zagora, Abstracts, p. 67.*
2. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. Cytoarchitecture of the trigeminal spinal nucleus in the rat. *Scientific Conference with International Participation “Neuroscience, Bioinformatics, Microbiome and Beyond”, September 17-19, 2019, Bachinovo, Abstract Book, pp. 57-58.*
3. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. Expression of Some Neurotrophic Factors in the Spinal Trigeminal Nucleus in Rats. *XI International Symposium on Clinical Anatomy, October 2-4, 2020, Varna, Scripta Scientifica Medica 52 Suppl. 1, 2020: 40-41.*
4. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. Expression of NGF, BDNF, and NT3 in the Spinal Trigeminal Nucleus in Rats. *Third Scientific Conference “Neurosciences – From the Theory to the Experiment and Practice”, October 23-25, 2020, Bachinovo, Abstracts, p. 28*
5. **Ivanov A.**, Atanasova D., Lazarov N. Expression of Neurotrophic Factors and Their Receptors in the Rat Spinal Trigeminal Nucleus. *XXV National Congress of the Bulgarian Anatomical Society with International Participation, May 28-30, 2021, Pleven, Journal of Biomedical & Clinical Research 14(1), Suppl. 1, 2021, 53-54.*

ХІІ. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Давидов, М. (1982). *Имуноцитохимични методи за изучаване на нервната система*. Невроморфология, том (бр.) 10, БАН, София.
2. Давидов, М., Гълъбов, П. (1981). *Съвременни хистохимични методи за изучаване на нервната система*. Невроморфология, бр. 8, БАН, София.
3. Дандов, А. (2016). *Морфологична и неврохимична пластичност в мезенцефалното тригеминално ядро на плъх след периферна нервна увреда*. Дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“, Медицински университет - София.
4. Abdulla, F. A., & Smith, P. A. (1999). Nerve injury increases an excitatory action of neuropeptide Y and Y2- agonists on dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 89(1). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00443-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00443-6)
5. Acheson, A., Conover, J. C., Fandl, J. P., Dechiara, T. M., Russell, M., Thadani, A., Squinto, S. P., Yancopoulos, G. D., & Lindsay, R. M. (1995). A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature*, 374(6521). <https://doi.org/10.1038/374450a0>
6. Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S. R., & Kimura, H. (1991). Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 306(3). <https://doi.org/10.1002/cne.903060303>
7. Akerman, S., Williamson, D. J., Kaube, H., & Goadsby, P. J. (2002). Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *British Journal of Pharmacology*, 137(1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704842>
8. Allen, J. M., Gibson, S. J., Adrian, T. E., Polak, J. M., & Bloom, S. R. (1984). Neuropeptide Y in human spinal cord. *Brain Research*, 308(1). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90926-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90926-0)
9. Allen, Y. S., Adrian, T. E., Allen, J. M., Tatemoto, K., Crow, T. J., Bloom, S. R., & Polak, J. M. (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science*, 221(4613). <https://doi.org/10.1126/science.6136091>
10. Almond, J. R., Westrum, L. E., & Henry, M. A. (1996). Post-embedding immunogold labeling of gamma-aminobutyric acid in lamina II of the spinal trigeminal subnucleus pars caudalis: I. A qualitative study. *Synapse*, 24(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199609\)24](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199609)24)
11. Alpay, K., Erta, M., Orhan, E. K., Üstay, D. K., Lieners, C., & Baykan, B. (2010). Diet restriction in migraine, based on IgG against foods: A clinical double-blind, randomised, cross-over trial. *Cephalalgia*, 30(7). <https://doi.org/10.1177/0333102410361404>
12. Amara, S. G., Arriza, J. L., Leff, S. E., Swanson, L. W., Evans, R. M., & Rosenfeld, M. G. (1985). Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide

- homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*, 229(4718).
<https://doi.org/10.1126/science.2994212>
13. Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S., & Evans, R. M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298(5871).
<https://doi.org/10.1038/298240a0>
 14. Arcourt, A., Gorham, L., Dhandapani, R., Prato, V., Taberner, F. J., Wende, H., Gangadharan, V., Birchmeier, C., Heppenstall, P. A., & Lechner, S. G. (2017). Touch Receptor-Derived Sensory Information Alleviates Acute Pain Signaling and Fine-Tunes Nociceptive Reflex Coordination. *Neuron*, 93(1).
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.027>
 15. Aroca, P., Lorente-Cánovas, B., Mateos, F. R., & Puelles, L. (2006). Locus coeruleus neurons originate in alar rhombomere 1 and migrate into the basal plate: Studies in chick and mouse embryos. *Journal of Comparative Neurology*, 496(6).
<https://doi.org/10.1002/cne.20957>
 16. Ashina, H., Schytz, H. W., and Ashina, M. (2018). CGRP in human models of primary headaches. In *Cephalgia* (Vol. 38, Issue 2).
<https://doi.org/10.1177/0333102416684344>
 17. Ashina, M. (2002). Nitric oxide synthase inhibitors for the treatment of chronic tension-type headache. In *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (Vol. 3, Issue 4).
<https://doi.org/10.1517/14656566.3.4.395>
 18. Austin, L. and Berry, W. K. (1953). Two selective inhibitors of cholinesterase. *The Biochemical Journal*, 54(4). <https://doi.org/10.1042/bj0540695>
 19. Balasubramanian, S., Teissère, J. A., Raju, D. V., & Hall, R. A. (2004). Hetero-oligomerization between GABAA and GABAB Receptors Regulates GABAB Receptor Trafficking. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18).
<https://doi.org/10.1074/jbc.M313470200>
 20. Baraban, S. C., Hollopeter, G., Erickson, J. C., Schwartzkroin, P. A., & Palmiter, R. D. (1997). Knock-out mice reveal a critical antiepileptic role for neuropeptide Y. *Journal of Neuroscience*, 17(23). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-23-08927.1997>
 21. Barber, R. P., Vaughn, J. E., Randall Slemmon, J., Salvaterra, P. M., Roberts, E., & Leeman, S. E. (1979). The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 184(2).
<https://doi.org/10.1002/cne.901840208>
 22. Basbaum, A. I., Clanton, C. H., & Fields, H. L. (1976). Opiate and stimulus produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(12).
<https://doi.org/10.1073/pnas.73.12.4685>

23. Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1978). Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. In *Annals of Neurology* (Vol. 4, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/ana.410040511>
24. Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1984). Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 7. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001521>
25. Beitz, A. J. (1982). The nuclei of origin of brainstem serotonergic projections to the rodent spinal trigeminal nucleus. *Neuroscience Letters*, 32(3). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90297-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90297-X)
26. Bell, C. (1821). Xxviii. on the nerves; giving an account of some experiments on their structure and functions; which lead to a new arrangement of the system. In *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (Vol. 111, pp. 398–424).
27. Bellamy, J., Bowen, E. J., Russo, A. F., & Durham, P. L. (2006). Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons. *European Journal of Neuroscience*, 23(8). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04742.x>
28. Bennett, G. J., Abdelmoumene, M., Hayashi, H., & Dubner, R. (1980). Physiology and morphology of substantia gelatinosa neurons intracellularly stained with horserdich peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, 194(4). <https://doi.org/10.1002/cne.901940407>
29. Benoliel, R., Eliav, E., & Iadarola, M. J. (2001). Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: Is there correlation to somatosensory parameters? *Pain*, 91(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00417-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00417-6)
30. Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
31. Bergerot, A., Storer, R. J., & Goadsby, P. J. (2007). Dopamine inhibits trigeminovascular transmission in the rat. *Annals of Neurology*, 61(3). <https://doi.org/10.1002/ana.21077>
32. Besson, J. M., & Chaouch, A. (1987). Peripheral and spinal mechanisms of nociception. In *Physiological Reviews* (Vol. 67, Issue 1). <https://doi.org/10.1152/physrev.1987.67.1.67>
33. Biane, J., Conner, J. M., & Tuszynski, M. H. (2014). Nerve growth factor is primarily produced by GABAergic neurons of the adult rat cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00220>
34. Birgbauer, E., & Fraser, S. E. (1994). Violation of cell lineage restriction compartments in the chick hindbrain. *Development*, 120(6). <https://doi.org/10.1242/dev.120.6.1347>

35. Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C., & Kaila, K. (2009). Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. In *Neuron* (Vol. 61, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003>
36. Bonaventure, P., Voorn, P., Luyten, W. H. M. L., Jurzak, M., Schotte, A., & Leysen, J. E. (1997). Detailed mapping of serotonin 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptor messenger RNA and ligand binding sites in guinea-pig brain and trigeminal ganglion: Clues for function. *Neuroscience*, 82(2). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00302-3)
37. Boscato, N., Exposto, F. G., Costa, Y. M., & Svensson, P. (2022). Effect of standardized training in combination with masseter sensitization on corticomotor excitability in bruxer and control individuals: a proof of concept study. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21504-w>
38. Boucher, T. J., & McMahon, S. B. (2001). Neurotrophic factors and neuropathic pain. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 1, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(01\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(01)00010-8)
39. Bradley, J. (2014). Matters of Priority: Herbert Mayo, Charles Bell and Discoveries in the Nervous System. In *Medical History* (Vol. 58, Issue 4, pp. 564–584). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/mdh.2014.53>
40. Brady, R., Zaidi, S. I. A., Mayer, C., & Katz, D. M. (1999). BDNF is a target-derived survival factor for arterial baroreceptor and chemoafferent primary sensory neurons. *Journal of Neuroscience*, 19(6). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-06-02131.1999>
41. Brain, S. D., Williams, T. J., Tippins, J. R., Morris, H. R., & MacIntyre, I. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313(5997). <https://doi.org/10.1038/313054a0>
42. Brentegani, L. G., & Lico, M. C. (1982). Dental pain and injection of agents into the trigeminal nucleus of guinea pigs. *Physiology and Behavior*, 28(1). [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90100-7)
43. Brodal, P. (2010). *The Central Nervous System* (4th ed.). Oxford University Press.
44. Brown, W. J., & Palay, S. L. (1972). Acetylcholinesterase activity in certain glomeruli and Golgi cells of the granular layer of the rat cerebellar cortex. *Zeitschrift Für Anatomie Und Entwicklungsgeschichte*, 137(3). <https://doi.org/10.1007/BF00519100>
45. Brumovsky, P., Shi, T. S., Landry, M., Villar, M. J., & Hökfelt, T. (2007). Neuropeptide tyrosine and pain. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 28, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.12.003>
46. Brüning, G., Funk, U., & Mayer, B. (1994). Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the brain of the chicken. *NeuroReport*, 5(18). <https://doi.org/10.1097/00001756-199412000-00005>
47. Brüning, G., Wiese, S., & Mayer, B. (1994). Nitric oxide synthase in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *Journal of Comparative Neurology*, 348(2). <https://doi.org/10.1002/cne.903480203>

48. Burton, H., & Craig, A. D. (1979). Distribution of trigeminothalamic projection cells in cat and monkey. *Brain Research*, 161(3). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90680-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90680-2)
49. Burton, H., Craig, A. D., Poulos, D. A., & Molt, J. T. (1979). *Efferent Projections from Temperature Sensitive Recording Loci within the Marginal Zone of the Nucleus Caudalis of the Spinal Trigeminal Complex in the Cat.*
50. Butcher, L. L., Oh, J. D., & Woolf, N. J. (1993). Cholinergic Function and Dysfunction. In *Progress in Brain Research* (Vol. 98).
51. Cambroner, F., & Puelles, L. (2000). Rostrocaudal nuclear relationships in the avian medulla oblongata: A fate map with quail chick chimeras. *Journal of Comparative Neurology*, 427(4). [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001127\)427:4<522::AID-CNE3>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001127)427:4<522::AID-CNE3>3.0.CO;2-Y)
52. Carter, M. S., & Krause, J. E. (1990). Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide γ . *Journal of Neuroscience*, 10(7). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-07-02203.1990>
53. Ceni, C., Unsain, N., Zeinieh, M. P., & Barker, P. A. (2014). Neurotrophins in the regulation of cellular survival and death. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 220. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_8
54. Chang, M. M., Leeman, S. E., & Niall, H. D. (1971). Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biology*, 232(29). <https://doi.org/10.1038/newbio232086a0>
55. Chan-Palay, V., & Palay, S. L. (1977). Ultrastructural identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord by immunocytochemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.4050>
56. Chatonnet, A., & Masson, P. (1986). Is the peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptidylaminopeptidase? *Biochimie*, 68(5). [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(86\)80160-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(86)80160-2)
57. Chen, V. P., Luk, W. K. W., Chan, W. K. B., Leung, K. W., Guo, A. J. Y., Chan, G. K. L., Xu, S. L., Choi, R. C. Y., & Tsim, K. W. K. (2011). Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00036>
58. Chouchkov, C., & Lazarov, N. (1994). Correlation of gamma-aminobutyric acid and tyrosine hydrolase immunoreactivity in the cat mesencephalic trigeminal nucleus. *Ann Anat*, 176, 68.
59. Chouchkov, C., & Lazarov, N. (1995). The mesencephalic trigeminal nucleus of the cat: Analysis of the neuronal structure and synaptic organization of peptidergic and monoaminergic afferents. *Ann Anat*, 177, 66–67.

60. Christie, A. E., Fontanilla, T. M., Roncalli, V., Cieslak, M. C., & Lenz, P. H. (2014). Identification and developmental expression of the enzymes responsible for dopamine, histamine, octopamine and serotonin biosynthesis in the copepod crustacean *Calanus finmarchicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 195. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.10.003>
61. Chronwall, B. M., DiMaggio, D. A., Massari, V. J., Pickel, V. M., Ruggiero, D. A., & O'donohue, T. L. (1985). The anatomy of neuropeptide-y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, 15(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90260-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90260-X)
62. Chubb, I. W., Hodgson, A. J., & White, G. H. (1980). Acetylcholinesterase hydrolyzes substance P. *Neuroscience*, 5(12). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90124-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90124-4)
63. Chubb, I. W., Ranieri, E., White, G. H., & Hodgson, A. J. (1983). The enkephalins are amongst the peptides hydrolyzed by purified acetylcholinesterase. *Neuroscience*, 10(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90118-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90118-5)
64. Copray, J. C. V. M., Ter Horst, G. J., Liem, R. S. B., & Van Willigen, J. D. (1990). Neurotransmitters and neuropeptides within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: An immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 37(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90410-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90410-6)
65. Cornea-Hébert, V., Riad, M., Wu, C., Singh, S. K., & Descarries, L. (1999). Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 409(2). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990628\)409:2<187::AID-CNE2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990628)409:2<187::AID-CNE2>3.0.CO;2-P)
66. Costa, G. M. F., Rocha, L. P. C., Siqueira, S. R. D. T. De, Moreira, P. R., & Almeida-Leite, C. M. (2019). No Association of Polymorphisms in Nav1.7 or Nerve Growth Factor Receptor Genes with Trigeminal Neuralgia. *Pain Medicine (United States)*, 20(7). <https://doi.org/10.1093/pm/pny191>
67. Costa, J. J. L., Averill, S., Saavedra, J. P., & Priestley, J. V. (1994). Serotonin innervation of enkephalin containing neurones in the rat spinal trigeminal nucleus. *Neuroscience Letters*, 168(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90442-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90442-1)
68. Coull, J. A. M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Sík, A., De Koninck, P., & De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, 424(6951). <https://doi.org/10.1038/nature01868>
69. Csillik, B., Tóth, L., & Karcsu, S. (1973). Acetylcholinesterase activity of Renshaw elements and Renshaw bulbs. A light- and electron-histochemical study. *Journal of Neurocytology*, 2(4). <https://doi.org/10.1007/BF01103800>
70. Dahlström, A. F. K. (1964). Evidence for the Existence of Monoamine-containing neurons in the central nervous system. In *Acta Physiologica Scandinavica*.

71. Dam, T. V., & Quirion, R. (1986). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of substance P receptors in guinea pig brain. *Peptides*, 7(5). [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(86\)90106-3](https://doi.org/10.1016/0196-9781(86)90106-3)
72. Davies, A. M., Minichiello, L., & Klein, R. (1995). Developmental changes in NT3 signalling via TrkA and TrkB in embryonic neurons. *EMBO Journal*, 14(18). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00127.x>
73. Davis, K. D., & Dostrovsky, J. O. (1986). Activation of trigeminal brain-stem nociceptive neurons by dural artery stimulation. *Pain*, 25(3). [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(86\)90244-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(86)90244-7)
74. Day, G. S., Swartz, R. H., Chenkin, J., Shamji, A. I., & Frost, D. W. (2014). Lateral medullary syndrome: A diagnostic approach illustrated through case presentation and literature review. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 16(2). <https://doi.org/10.2310/8000.2013.131059>
75. De Koninck, Y. (2007). Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.11.005>
76. Deen, M., Christensen, C. E., Hougaard, A., Hansen, H. D., Knudsen, G. M., & Ashina, M. (2017). Serotonergic mechanisms in the migraine brain - A systematic review. In *Cephalalgia* (Vol. 37, Issue 3). <https://doi.org/10.1177/0333102416640501>
77. DeFelipe, J. (1993). Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cerebral Cortex*, 3(4). <https://doi.org/10.1093/cercor/3.4.273>
78. Del Fiacco, M., Quartu, M., Floris, A., & Diaz, G. (1990). Substance P-like immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neuroscience Letters*, 110(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90780-D](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90780-D)
79. Delpire, E. (2000). Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. *News in Physiological Sciences*, 15(6). <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.6.309>
80. Di Lorenzo, C., Coppola, G., Sirianni, G., & Pierelli, F. (2013). Short term improvement of migraine headaches during ketogenic diet: a prospective observational study in a dietician clinical setting. *The Journal of Headache and Pain*, 14(S1). <https://doi.org/10.1186/1129-2377-14-s1-p219>
81. Diaz-delCastillo, M., Woldbye, D. P. D., & Heegaard, A. M. (2018). Neuropeptide Y and its Involvement in Chronic Pain. In *Neuroscience* (Vol. 387). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.050>
82. Diener, H. C., & Goadsby, P. (1998). Treatment of acute migraine attacks - New developments in headache research. In *Aktuelle Neurologie* (Vol. 25, Issue 8). <https://doi.org/10.1055/s-2007-1017708>

83. Diogenes, A., Akopian, A. N., & Hargreaves, K. M. (2007). NGF Up-regulates TRPA1: Implications for orofacial pain. *Journal of Dental Research*, 86(6). <https://doi.org/10.1177/154405910708600612>
84. Dohrn, C. S., Mullett, M. A., Price, R. H., & Beitz, A. J. (1994). Distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive interneurons in the spinal trigeminal nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 346(3). <https://doi.org/10.1002/cne.903460308>
85. Donaldson, L. F., Harmar, A. J., McQueen, D. S., & Seckl, J. R. (1992). Increased expression of preprotachykinin, calcitonin gene-related peptide, but not vasoactive intestinal peptide messenger RNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat. *Molecular Brain Research*, 16(1–2). [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(92\)90204-O](https://doi.org/10.1016/0169-328X(92)90204-O)
86. Donnerer, J., Schuligoi, R., & Stein, C. (1992). Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: Evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience*, 49(3). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90237-V](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90237-V)
87. Doods, H., Hallermayer, G., Wu, D., Entzeroth, M., Rudolf, K., Engel, W., & Eberlein, W. (2000). Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 129(3). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703110>
88. Drew, J. P., Westrum, L. E., & Ho, R. H. (1986). Mapping of the normal distribution of substance P-like immunoreactivity in the spinal trigeminal nucleus of the cat. *Experimental Neurology*, 93(1). [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(86\)90156-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(86)90156-1)
89. Dreyfus, C. F. (1989). Effects of nerve growth factor on cholinergic brain neurons. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 10, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(89\)90166-1](https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90166-1)
90. Dubner, R., & Bennett, G. J. (1983). Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annual Review of Neuroscience*, Vol. 6. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.06.030183.002121>
91. Dumont, Y., Martel, J. C., Fournier, A., St-Pierre, S., & Quirion, R. (1992). Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 38, Issue 2). [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(92\)90038-G](https://doi.org/10.1016/0301-0082(92)90038-G)
92. Duysen, E. G., Li, B., Xie, W., Schopfer, L. M., Anderson, R. S., Broomfield, C. A., & Lockridge, O. (2001). Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: Supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2).
93. Eaton, M. J., Blits, B., Ruitenber, M. J., Verhaagen, J., & Oudega, M. (2002). Amelioration of chronic neuropathic pain after partial nerve injury by adeno-

- associated viral (AAV) vector-mediated over-expression of BDNF in the rat spinal cord. *Gene Therapy*, 9(20). <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301814>
94. Edvinsson, L. (2017). The Trigeminovascular Pathway: Role of CGRP and CGRP Receptors in Migraine. *Headache*, 57. <https://doi.org/10.1111/head.13081>
 95. Edvinsson, L., Cantera, L., Jansen-Olesen, I., & Uddman, R. (1997). Expression of calcitonin gene-related peptide1 receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral arteries. *Neuroscience Letters*, 229(3). [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00456-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00456-4)
 96. Edvinsson, L., Haanes, K. A., Warfvinge, K., & Krause, Di. N. (2018). CGRP as the target of new migraine therapies - Successful translation from bench to clinic. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0003-1>
 97. Edvinsson, L., Villalón, C. M., & Maassenvandenbrink, A. (2012). Basic mechanisms of migraine and its acute treatment. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 136, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.011>
 98. Eftekhari, S., & Edvinsson, L. (2011). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level. *BMC Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-112>
 99. El-Dwairi, Q. A., Al-Hussain, S. M., Banihani, A. S., Bataineh, Z. M., Djouhri, L., Mustafa, A. G., & Zaqout, S. (2023). Neuronal Cell Types in the Spinal Trigeminal Nucleus of the Camel Brain. *Brain Sciences*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/brainsci13020312>
 100. Erspamer, V. (1983). Amphibian skin peptides in mammals - looking ahead. *Trends in Neurosciences*, 6(C). [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(83\)90091-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(83)90091-7)
 101. Exposto, F. G., Masuda, M., Castrillon, E. E., & Svensson, P. (2018). Effects of nerve growth factor experimentally-induced craniofacial muscle sensitization on referred pain frequency and number of headache days: A double-blind, randomized placebo-controlled study. *Cephalalgia*, 38(14). <https://doi.org/10.1177/0333102418758481>
 102. Falls, W. M., Rice, R. E., & Vanwagner, J. P. (1985). The dorsomedial portion of trigeminal nucleus oralis (vo) in the rat: Cytology and projections to the cerebellum. *Somatosensory & Motor Research*, 3(2). <https://doi.org/10.3109/07367228509144579>
 103. Farzi, A., Reichmann, F., & Holzer, P. (2015). The homeostatic role of neuropeptide Y in immune function and its impact on mood and behaviour. In *Acta Physiologica* (Vol. 213, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/apha.12445>
 104. Feniuk, W., Humphrey, P. P. A., & Perren, M. J. (1989). The selective carotid arterial vasoconstrictor action of GR43175 in anaesthetized dogs. *British Journal of Pharmacology*, 96(1). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb11787.x>
 105. Fernández-García, S., Sancho-Balsells, A., Longueville, S., Hervé, D., Gruart, A., Delgado-García, J. M., Alberch, J., & Giralt, A. (2020). Astrocytic BDNF and TrkB

- regulate severity and neuronal activity in mouse models of temporal lobe epilepsy. *Cell Death and Disease*, 11(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2615-9>
106. Fields, H. L., & Basbaum, A. I. (1978). Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. In *Annual review of physiology* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.40.030178.001245>
 107. Fields, H. L., Heinricher, M. M., & Mason, P. (1991). Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 14). <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.001251>
 108. Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., & Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23(6). <https://doi.org/10.1161/01.HYP.23.6.1121>
 109. Forstermann, U., Mulsch, A., Bohme, E., & Busse, R. (1986). Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circulation Research*, 58(4). <https://doi.org/10.1161/01.RES.58.4.531>
 110. Friberg, L., Olesen, J., Olsen, T. S., Karle, A., Ekman, R., & Fahrenkrug, J. (1994). Absence of vasoactive peptide release from brain to cerebral circulation during onset of migraine with aura. *Cephalalgia*, 14(1). <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1994.1401047.x>
 111. Fumal, A., & Schoenen, J. (2008). Tension-type headache: current research and clinical management. In *The Lancet Neurology* (Vol. 7, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70325-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70325-3)
 112. Gaddum, J. H., & Schild, H. (1934). Depressor substances in extracts of intestine. *The Journal of Physiology*, 83(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1934.sp003206>
 113. Gamse, R., & Saria, A. (1985). Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *European Journal of Pharmacology*, 114(1). [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(85\)90520-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90520-5)
 114. Ganchrow, D. (1978). Intratrigeminal and thalamic projections of nucleus caudalis in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): A degeneration and autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology*, 178(2). <https://doi.org/10.1002/cne.901780206>
 115. García-Guillén, I. M., Martínez-de-la-Torre, M., Puelles, L., Aroca, P., & Marín, F. (2021). Molecular Segmentation of the Spinal Trigeminal Nucleus in the Adult Mouse Brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnana.2021.785840>
 116. Gepshtein, S., Li, X., Snider, J., Plank, M., Lee, D., & Poizner, H. (2014). Dopamine function and the efficiency of human movement. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 26(3). https://doi.org/10.1162/jocn_a_00503
 117. Gerald, C., Walker, M. W., Criscione, L., Gustafson, E. L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K. E., Vaysse, P., Durkin, M. M., Laz, T. M., Linemeyer, D. L., Schaffhauser, A. O., Whitebread, S., Hofbauer, K. G., Taber, R. I., Brancheck, T. A., & Weinshank, R. L.

- (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*, 382(6587). <https://doi.org/10.1038/382168a0>
118. Gerald, C., Walker, M. W., Vaysse, P. J. J., He, C., Branchek, T. A., & Weinshank, R. L. (1995). Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26758>
119. Giacobini, E. (1956). Histochemical Demonstration of AChE Activity in Isolated Nerve Cells. *Acta Physiologica Scandinavica*, 36(3). <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1956.tb01325.x>
120. Gibson, S. J., Polak, J. M., Allen, J. M., Adrian, T. E., Kelly, J. S., & Bloom, S. R. (1984). The distribution and origin of a novel brain peptide, neuropeptide Y, in the spinal cord of several mammals. *Journal of Comparative Neurology*, 227(1). <https://doi.org/10.1002/cne.902270109>
121. Ginestal, E., & Matute, C. (1993). Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry*, 99(1). <https://doi.org/10.1007/BF00268020>
122. Goadsby, P. J., Edvinsson, L., & Ekman, R. (1990). Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Annals of Neurology*, 28(2). <https://doi.org/10.1002/ana.410280213>
123. Goadsby, P. J., & Hoskin, K. L. (1998). Serotonin inhibits trigeminal nucleus activity evoked by craniovascular stimulation through a 5HT(1B/1D) receptor: A central action in migraine? *Annals of Neurology*, 43(6). <https://doi.org/10.1002/ana.410430605>
124. Goadsby, P. J., Hoskin, K. L., & Knight, Y. E. (1998). Substance P blockade with the potent and centrally acting antagonist GR205171 does not effect central trigeminal activity with superior sagittal sinus stimulation. *Neuroscience*, 86(1). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00013-X)
125. Gobel, S. (1975). Golgi studies of the substantia gelatinosa neurons in the spinal trigeminal nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 162(3). <https://doi.org/10.1002/cne.901620308>
126. Gobel, S. (1978). Golgi studies of the neurons in layer I of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *Journal of Comparative Neurology*, 180(2). <https://doi.org/10.1002/cne.901800212>
127. Gobel, S. (1979). Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *Pain*, 6(3). [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(79\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0304-3959(79)90062-9)
128. Goldstein, D. J., Wang, O., Saper, J. R., Stoltz, R., Silberstein, S. D., & Mathew, N. T. (1997). Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: A crossover study. *Cephalalgia*, 17(7). <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1997.1707785.x>

129. Gonçalves, J., Martins, J., Baptista, S., Ambrósio, A. F., & Silva, A. P. (2016). Effects of drugs of abuse on the central neuropeptide Y system. In *Addiction Biology* (Vol. 21, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/adb.12250>
130. Götz, R., Köster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Scharl, M., & Thoenen, H. (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*, *372*(6503). <https://doi.org/10.1038/372266a0>
131. Gregor, P., Feng, Y., DeCarr, L. B., Cornfield, L. J., & McCaleb, M. L. (1996). Molecular characterization of a second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(44). <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27776>
132. Gu, X. L., & Yu, L. C. (2007). The colocalization of CGRP receptor and AMPA receptor in the spinal dorsal horn neuron of rat: A morphological and electrophysiological study. *Neuroscience Letters*, *414*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.12.056>
133. Gupta, V. K., You, Y., Gupta, V. B., Klistorner, A., & Graham, S. L. (2013). TrkB receptor signalling: Implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms140510122>
134. Hanko, J., Hardebo, J. E., & Kahrstrom, J. (1986). Existence and coexistence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P in cerebrovascular nerves and trigeminal ganglion cells. *Acta Physiologica Scandinavica*, *127*(SUPPL. 552).
135. Harding, A., Paxinos, G., & Halliday, G. (2004). The Serotonin and Tachykinin Systems. In *The Rat Nervous System*. <https://doi.org/10.1016/B978-012547638-6/50035-3>
136. Hassler, R. (1982). *Architectonic organization of the thalamic nuclei* (2nd ed.). Thieme.
137. Hay, D. L., Garelja, M. L., Poyner, D. R., & Walker, C. S. (2018). Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 175, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/bph.14075>
138. Hefti, F. (1986). Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *Journal of Neuroscience*, *6*(8). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-08-02155.1986>
139. Heilig, M., McLeod, S., Brot, M., Heinrichs, S. C., Menzaghi, F., Koob, G. F., & Britton, K. T. (1993). Anxiolytic-like action of neuropeptide Y: Mediation by Y1 receptors in amygdala, and dissociation from food intake effects. *Neuropsychopharmacology*, *8*(4). <https://doi.org/10.1038/npp.1993.35>
140. Henry, J. L., Sessle, B. J., Lucier, G. E., & Hu, J. W. (1980). Effects of substance P on nociceptive and non-nociceptive trigeminal brain stem neurons. *Pain*, *8*(1). [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(80\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0304-3959(80)90088-3)

141. Henssen, D. J. H. A., Kurt, E., Kozicz, T., van Dongen, R., Bartels, R. H. M. A., & van Cappellen van Walsum, A. M. (2016). New insights in trigeminal anatomy: A double orofacial tract for nociceptive input. *Frontiers in Neuroanatomy*, *10*(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00053>
142. Herbert Mayo. (1822). *Anatomical and Physiological Commentaries* (Vol. 1). Thomas and George Underwood.
143. Herbert Mayo. (1823). *Anatomical and Physiological Commentaries* (Vol. 2). Thomas and George Underwood.
144. Herzog, H., Hort, Y. J., Ball, H. J., Hayes, G., Shine, J., & Selbie, L. A. (1992). Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5794>
145. Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., & Barde, Y. A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO Journal*, *9*(8). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07423.x>
146. Hökfelt, T., Brumovsky, P., Shi, T., Pedrazzini, T., & Villar, M. (2007). NPY and pain as seen from the histochemical side. In *Peptides* (Vol. 28, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.07.024>
147. Hökfelt, T., Elde, R., Johansson, O., Luft, R., Nilsson, G., & Arimura, A. (1976). Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience*, *1*(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(76\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(76)90008-7)
148. Hökfelt, T., Kellerth, J. O., Nilsson, G., & Pernow, B. (1975). Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Research*, *100*(2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(75\)90481-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(75)90481-3)
149. Hökfelt, T., Ljungdahl, A., Terenius, L., Elde, R., & Nilsson, G. (1977). Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: Enkephalin and substance P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.3081>
150. Holzer, P. (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*, *24*(3). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90064-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90064-4)
151. Hoskin, K. L., Bulmer, D. C. E., & Goadsby, P. J. (1999). Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neuroscience Letters*, *266*(3). [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00281-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00281-5)

152. Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *American Journal of Clinical Pathology*, 75(6). <https://doi.org/10.1093/ajcp/75.6.816>
153. Hua, X. Y., Saria, A., Gamse, R., Theodorsson-Norheim, E., Brodin, E., & Lundberg, J. M. (1986). Capsaicin induced release of multiple tachykinins (substance P, neurokinin A and eledoisin-like material) from guinea-pig spinal cord and ureter. *Neuroscience*, 19(1). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90024-2)
154. Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 24). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.677>
155. Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G. (1988). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131). <https://doi.org/10.1038/328632a0>
156. Ibáñez, C. F. (1995). Neurotrophic factors: From structure-function studies to designing effective therapeutics. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 13, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88949-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88949-0)
157. Ichiyama, A., Nakamura, S., Nishizuka, Y., & Hayaishi, O. (1970). Enzymic studies on the biosynthesis of serotonin in mammalian brain. *Journal of Biological Chemistry*, 245(7). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77149-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77149-x)
158. Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G., & Schmelz, M. (2006). The neurobiology of itch. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrn1950>
159. Indo, Y. (2010). Nerve growth factor, pain, itch and inflammation: Lessons from congenital insensitivity to pain with anhidrosis. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 10, Issue 11). <https://doi.org/10.1586/ern.10.154>
160. J. H. Martin. (2003). *Neuroanatomy: Text and Atlas* (3rd ed.). McGraw-Hill.
161. Jacobs, J. S., & Miller, M. W. (1999). Expression of nerve growth factor, p75, and the high affinity neurotrophin receptors in the adult rat trigeminal system: Evidence for multiple trophic support systems. *Journal of Neurocytology*, 28(7). <https://doi.org/10.1023/A:1007019422675>
162. Jasim, H., Ghafouri, B., Gerdle, B., Hedenberg-Magnusson, B., & Ernberg, M. (2020). Altered levels of salivary and plasma pain related markers in temporomandibular disorders. *Journal of Headache and Pain*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s10194-020-01160-z>
163. Jellinger, K. A. (2001). GABA in the Nervous System: the View at Fifty Years. *European Journal of Neurology*, 8(3). <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.0200a.x>
164. Ji, R. R., Zhang, X., Wiesenfeld-Hallin, Z., & Hökfelt, T. (1994). Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y (Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal

- root ganglia following peripheral tissue inflammation. *Journal of Neuroscience*, 14(11 D). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-11-06423.1994>
165. Jones, S. L., & Light, A. R. (1990). Termination patterns of serotonergic medullary raphespinal fibers in the rat lumbar spinal cord: An anterograde immunohistochemical study. *Journal of Comparative Neurology*, 297(2). <https://doi.org/10.1002/cne.902970209>
 166. Kahle, K. T., Staley, K. J., Nahed, B. V., Gamba, G., Hebert, S. C., Lifton, R. P., & Mount, D. B. (2008). Roles of the cation - Chloride cotransporters in neurological disease. In *Nature Clinical Practice Neurology* (Vol. 4, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0883>
 167. Kangrga, I., & Randic, M. (1990). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. *Journal of Neuroscience*, 10(6). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-06-02026.1990>
 168. Kerr, B. J., Bradbury, E. J., Bennett, D. L. H., Trivedi, P. M., Dassan, P., French, J., Shelton, D. B., McMahon, S. B., & Thompson, S. W. N. (1999). Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 19(12). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-12-05138.1999>
 169. Khan, N., & Smith, M. T. (2015). Neurotrophins and neuropathic pain: Role in pathobiology. *Molecules*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/molecules200610657>
 170. Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W., & Medford, R. M. (1996). Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17). <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9114>
 171. Kiecker, C., & Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 6, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrn1702>
 172. Kim, M. D., Lily, Y. J., & Yuh, N. J. (2006). The bHLH-PAS protein spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons. *Genes and Development*, 20(20). <https://doi.org/10.1101/gad.1459706>
 173. Kimball, R. W., Friedman, A. P., & Vallejo, E. (1960). Effect of serotonin in migraine patients. *Neurology*, 10(2). <https://doi.org/10.1212/wnl.10.2.107>
 174. King, V. R., Michael, G. J., Joshi, R. K., & Priestley, J. V. (1999). TRKA, TRKB, and TRKC messenger RNA expression by bulbospinal cells of the rat. *Neuroscience*, 92(3). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00072-X)
 175. Kitayama, T. (2018). The Role of K⁺-Cl⁻-Cotransporter-2 in Neuropathic Pain. *Neurochemical Research*, 43(1). <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2344-3>

176. Klein, R., Jing, S., Nanduri, V., O'Rourke, E., & Barbacid, M. (1991). The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*, 65(1). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90419-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90419-Y)
177. Kolta, A., Dubuc, R., & Lund, J. P. (1993). An immunocytochemical and autoradiographic investigation of the serotonergic innervation of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in the rabbit. *Neuroscience*, 53(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90494-Z](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90494-Z)
178. Kolta, A., Lund, J. P., & Rossignol, S. (1990). Modulation of activity of spindle afferents recorded in trigeminal mesencephalic nucleus of rabbit during fictive mastication. *Journal of Neurophysiology*, 64(4). <https://doi.org/10.1152/jn.1990.64.4.1067>
179. Korsching, S. (1993). The neurotrophic factor concept: A reexamination. In *Journal of Neuroscience* (Vol. 13, Issue 7). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-07-02739.1993>
180. Koulchitsky, S., Fischer, M. J. M., De Col, R., Schlechtweg, P. M., & Messlinger, K. (2004). Biphasic response to nitric oxide of spinal trigeminal neurons with meningeal input in rat-possible implications for the pathophysiology of headaches. *Journal of Neurophysiology*, 92(3). <https://doi.org/10.1152/jn.01210.2003>
181. Krejci, E., Thomine, S., Boschetti, N., Legay, C., Sketelj, J., & Massoulié, J. (1997). The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 272(36). <https://doi.org/10.1074/jbc.272.36.22840>
182. Kumar, A., Pareek, V., Faiq, M. A., Kumar, P., Raza, K., Prasoon, P., Dantham, S., & Mochan, S. (2017). Regulatory role of NGFs in neurocognitive functions. In *Reviews in the Neurosciences* (Vol. 28, Issue 6). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2016-0031>
183. Kwiat, G. C., & Basbaum, A. I. (1992). The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosensory & Motor Research*, 9(2). <https://doi.org/10.3109/08990229209144768>
184. Lai, Y. Y., Clements, J. R., & Siegel, J. M. (1993). Glutamatergic and cholinergic projections to the pontine inhibitory area identified with horseradish peroxidase retrograde transport and immunohistochemistry. *Journal of Comparative Neurology*, 336(3). <https://doi.org/10.1002/cne.903360302>
185. Lam, H. H. D., Hanley, D. F., Trapp, B. D., Saito, S., Raja, S., Dawson, T. M., & Yamaguchi, H. (1996). Induction of spinal cord neuronal nitric oxide synthase (NOS) after formalin injection in the rat hind paw. *Neuroscience Letters*, 210(3). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12702-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12702-6)
186. Lange, R., Schwarz, J., & Hohn, M. (2000). Acetylsalicylic Acid Effervescent 1000 mg (Aspirin®) in Acute Migraine Attacks; A Multicentre, Randomized, Double-Blind, Single-Dose, Placebo-Controlled Parallel Group Study. *Cephalalgia*, 20(7). <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2000.00101.x>

187. Larhammar, D., Blomqvist, A. G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., & Wahlestedt, C. (1992). Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)49854-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)49854-2)
188. Lassen, L. H., Ashina, M., Christiansen, I., Ulrich, V., & Olesen, J. (1997). Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet*, 349(9049). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80021-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80021-9)
189. Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. In *Journal of Pain* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>
190. Lavielle, S., Chassaing, G., Ploux, O., Loeuillet, D., Besseyre, J., Julien, S., Marquet, A., Convert, O., Beaujouan, J. C., Torrens, Y., Bergström, L., Saffroy, M., & Glowinski, J. (1988). Analysis of tachykinin binding site interactions using constrained analogues of tachykinins. *Biochemical Pharmacology*, 37(1). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90753-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90753-8)
191. Lazarov, N. (1994). Primary trigeminal afferent neuron of the cat: II. Neuropeptide- and serotonin-like immunoreactivity. *Journal of Brain Research*, 35(3).
192. Lazarov, N. (1995). Distribution of calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in the trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the cat. *Acta Histochemica*, 97(2). [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(11\)80102-9](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(11)80102-9)
193. Lazarov, N., & Dandov, A. (1998). Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus of the cat. A histochemical and immunohistochemical study. *Acta Anatomica*, 163(4).
194. Lazarov, N. E. (2002). Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 66, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(01)00021-1)
195. Lazarov, N. E., & Chouchkov, C. N. (1995). Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase and gamma-aminobutyric acid in the mesencephalic trigeminal nucleus of the cat: A light and electron microscopic study. *The Anatomical Record*, 242(1). <https://doi.org/10.1002/ar.1092420116>
196. Le Greves, P., Nyberg, F., Terenius, L., & Hökfelt, T. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *European Journal of Pharmacology*, 115(2–3). [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(85\)90706-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(85)90706-X)
197. Le May, C., Pineau, T., Bigot, K., Kohl, C., Girard, J., & Pégrier, J. P. (2000). Reduced hepatic fatty acid oxidation in fasting PPAR α null mice is due to impaired mitochondrial hydroxymethylglutaryl-CoA synthase gene expression. *FEBS Letters*, 475(3). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01648-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01648-3)
198. Leblanc, A. (1992). Anatomy and Imaging of the Cranial Nerves. In *Anatomy and Imaging of the Cranial Nerves*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-97042-9>

199. Lecat, S., Belemnaba, L., Galzi, J. L., & Bucher, B. (2015). Neuropeptide Y receptor mediates activation of ERK1/2 via transactivation of the IGF receptor. *Cellular Signalling*, 27(7). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.03.016>
200. Lee, S. E., & Kim, J. H. (2007). Involvement of substance P and calcitonin gene-related peptide in development and maintenance of neuropathic pain from spinal nerve injury model of rat. *Neuroscience Research*, 58(3). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.03.004>
201. Lee, Y., Kawai, Y., Shiosaka, S., Takami, K., Kiyama, H., Hillyard, C. J., Girgis, S., MacIntyre, I., Emson, P. C., & Tohyama, M. (1985). Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Research*, 330(1). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90027-7)
202. Lehtosalo, J. I., Uusitalo, H., Stjernschantz, J., & Palkama, A. (1984). Substance P-like immunoreactivity in the trigeminal ganglion - A fluorescence, light and electron microscope study. *Histochemistry*, 80(5). <https://doi.org/10.1007/BF00495429>
203. Lembeck, F. (1953). Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse - III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv Für Experimentelle Pathologie Und Pharmakologie*, 219(3). <https://doi.org/10.1007/BF00246293>
204. Lewin, G. R., & Barde, Y. A. (1996). Physiology of the neurotrophins. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001445>
205. Lewis, R. G., Florio, E., Punzo, D., & Borrelli, E. (2021). The Brain's Reward System in Health and Disease. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1344). https://doi.org/10.1007/978-3-030-81147-1_4
206. Li, J. L., Kaneko, T., Nomura, S., Li, Y. Q., & Mizuno, N. (1997). Association of serotonin-like immunoreactive axons with nociceptive projection neurons in the caudal spinal trigeminal nucleus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 384(1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970721\)384:1<127::AID-CNE8>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970721)384:1<127::AID-CNE8>3.0.CO;2-3)
207. Li, Y. Q., Li, H., Kaneko, T., & Mizuno, N. (1999). Substantia gelatinosa neurons in the medullary dorsal horn: An intracellular labeling study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 411(3). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990830\)411:3<399::AID-CNE4>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990830)411:3<399::AID-CNE4>3.0.CO;2-6)
208. Lin, Q., Paleček, J., Palečková, V., Peng, Y. B., Wu, J., Cui, M., & Willis, W. D. (1999). Nitric oxide mediates the central sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *Journal of Neurophysiology*, 81(3). <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.3.1075>

209. Lin, S., Boey, D., & Herzog, H. (2004). NPY and Y receptors: Lessons from transgenic and knockout models. In *Neuropeptides* (Vol. 38, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.npep.2004.05.005>
210. Liu, S., Tang, Y., Shu, H., Tatum, D., Bai, Q., Crawford, J., Xing, Y., Lobo, M. K., Bellinger, L., Kramer, P., & Tao, F. (2019). Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway-produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. *Pain*, *160*(2). <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001414>
211. Ljungdahl, Å., Hökfelt, T., & Nilsson, G. (1978). Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat-I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience*, *3*(10). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90116-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90116-1)
212. Loh, K., Herzog, H., & Shi, Y. C. (2015). Regulation of energy homeostasis by the NPY system. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 26, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.01.003>
213. Lovenberg, W., Jequier, E., & Sjoerdsma, A. (1967). Tryptophan hydroxylation: Measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, *155*(3759). <https://doi.org/10.1126/science.155.3759.217>
214. Lübbert, M., Kyereme, J., Schöbel, N., Beltrán, L., Wetzel, C. H., & Hatt, H. (2013). Transient Receptor Potential Channels Encode Volatile Chemicals Sensed by Rat Trigeminal Ganglion Neurons. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077998>
215. Lumsden, A. (1990). The cellular basis of segmentation in the developing hindbrain. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 13, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(90\)90144-Y](https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90144-Y)
216. Lv, J., Wang, L., & Liu, F. (2017). 5-hydroxytryptamine synthesized in the aorta-gonad-mesonephros regulates hematopoietic stem and progenitor cell survival. *Mechanisms of Development*, *145*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.04.485>
217. M. Falls, W. (1983). A Golgi type II neuron in trigeminal nucleus oralis: A Golgi study in the rat. *Neuroscience Letters*, *41*(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90214-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90214-8)
218. Magnussen, C., Hung, S. P., & Ribeiro-da-Silva, A. (2015). Novel expression pattern of neuropeptide Y immunoreactivity in the peripheral nervous system in a rat model of neuropathic pain. *Molecular Pain*, *11*(1). <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0029-y>
219. Mai, J. K., & Paxinos, G. (2012). The human nervous system [electronic book] / edited by Jürgen K. Mai, George Paxinos. In *Online access with subscription: Elsevier (Sciencedirect Freedom Collection)*.
220. Malcangio, M. (1997). Nerve growth factor treatment increases stimulus-evoked release of sensory neuropeptides in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, *9*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01462.x>

221. Malcangio, M., & Lessmann, V. (2003). A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 24, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00025-7)
222. Mannion, R. J., Costigan, M., Decosterd, I., Amaya, F., Ma, Q. P., Holstege, J. C., Ji, R. R., Acheson, A., Lindsay, R. M., Wilkinson, G. A., & Woolf, C. J. (1999). Neurotrophins: Peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9385>
223. Mapp, P. I., Terenghi, G., Walsh, D. A., Chen, S. T., Cruwys, S. C., Garrett, N., Kidd, B. L., Polak, J. M., & Blake, D. R. (1993). Monoarthritis in the rat knee induces bilateral and time-dependent changes in substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord. *Neuroscience*, 57(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90051-G](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90051-G)
224. Mapplebeck, J. C. S., Beggs, S., & Salter, M. W. (2016). Sex differences in pain: A tale of two immune cells. *Pain*, 157. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000389>
225. Marín, F., & Puelles, L. (1995). Morphological Fate of Rhombomeres in Quail/Chick Chimeras: A Segmental Analysis of Hindbrain Nuclei. *European Journal of Neuroscience*, 7(8). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00693.x>
226. Mark, M. A., Colvin, L. A., & Duggan, A. W. (1998). Spontaneous release of immunoreactive neuropeptide y from the central terminals of large diameter primary afferents of rats with peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 83(2). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00402-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00402-8)
227. Mark, M. A., Jarrott, B., Colvin, L. A., MacMillan, S. J. A., & Duggan, A. W. (1997). The release of immunoreactive neuropeptide Y in the spinal cord of the anaesthetized rat and cat. *Brain Research*, 754(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00061-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00061-9)
228. Marquez de Prado, B., Hammond, D. L., & Russo, A. F. (2009). Genetic Enhancement of Calcitonin Gene-Related Peptide-Induced Central Sensitization to Mechanical Stimuli in Mice. *Journal of Pain*, 10(9). <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.03.018>
229. Martin, D. L. (1993). Short-term control of GABA synthesis in brain. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 60, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90010-H](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90010-H)
230. Marvizón, J. C. G., Pérez, O. A., Song, B., Chen, W., Bunnett, N. W., Grady, E. F., & Todd, A. J. (2007). Calcitonin receptor-like receptor and receptor activity modifying protein 1 in the rat dorsal horn: Localization in glutamatergic presynaptic terminals containing opioids and adrenergic $\alpha 2C$ receptors. *Neuroscience*, 148(1). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.05.036>

231. Massoulié, J. (2002). The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. In *NeuroSignals* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.1159/000065054>
232. Matthews, M. A., Hernandez, T. V., Romanska, A. I., & Hoffman, K. D. (1989). Golgi and immunocytochemical analysis of neurons in trigeminal subnucleus interpolaris: Correlations with cellular localization of enkephalin. *Neuroscience*, 32(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90094-8)
233. McCullough, L. A., Egan, T. M., & Westfall, T. C. (1998). Neuropeptide Y receptors involved in calcium channel regulation in PC12 cells. *Regulatory Peptides*, 75–76. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00058-5](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00058-5)
234. McDonald, D. M., & Rasmussen, G. L. (1971). Ultrastructural characteristics of synaptic endings in the cochlear nucleus having acetylcholinesterase activity. *Brain Research*, 28(1). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90520-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90520-8)
235. Mendel, B., & Rudney, H. (1943). Studies on cholinesterase: 1. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase. *The Biochemical Journal*, 37(1).
236. Merrill, J. E. (1996). NEUROGLIA. H. Kettenmann and B. R. Ransom, eds. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 55(8). <https://doi.org/10.1097/00005072-199608000-00011>
237. Mikkelsen, R. B., & Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 37 REV. ISS. 3). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206663>
238. Miyakawa, A., Furue, H., Katafuchi, T., Jiang, N., Yasaka, T., Kato, G., & Yoshimura, M. (2005). Action of neuropeptide Y on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, 134(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.045>
239. Moore, A. W., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2002). hamlet, a binary genetic switch between single- and multiple-dendrite neuron morphology. *Science*, 297(5585). <https://doi.org/10.1126/science.1072387>
240. Moore, J. K., & Moore, R. Y. (1983). Neurological anatomy in relation to clinical medicine, third edition. By Alf Brodal New York, Oxford University Press, 1981 1,053 pp, illustrated, \$38.50 . *Annals of Neurology*, 13(3). <https://doi.org/10.1002/ana.410130332>
241. Morales, M., Battenberg, E., & Bloom, F. E. (1998). Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT3 receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 402(3). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19981221\)402:3<385::AID-CNE7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981221)402:3<385::AID-CNE7>3.0.CO;2-Q)
242. Moran, T. D., Colmers, W. F., & Smith, P. A. (2004). Opioid-like actions of neuropeptide Y in rat substantia gelatinosa: Y1 suppression of inhibition and Y2 suppression of excitation. *Journal of Neurophysiology*, 92(6). <https://doi.org/10.1152/jn.00096.2004>

243. Moskowitz, M. A., Buzzi, M. G., Sakas, D. E., & Linnik, M. D. (1989). Pain mechanisms underlying vascular headaches. Progress report 1989. In *Revue Neurologique* (Vol. 145, Issue 3).
244. Muddhry, P. K., Ghatki, M. A., Spokks, R. A., Jonhs, P. M., Pierson, A. M., Hamid, Q. A., Kanse, S., Amara, S. G., Burrik, J. M., Legon, S., Polak, J. M., & Bloom, S. R. (1988). Differential expression of α -CGRP and β -CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience*, 25(1). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90018-8)
245. Munglani, R., Bond, A., Smith, G. D., Harrison, S. M., Elliot, P. J., Birch, P. J., & Hunt, S. P. (1995). Changes in neuronal markers in a mononeuropathic rat model: relationship between neuropeptide Y, pre-emptive drug treatment and long-term mechanical hyperalgesia. *Pain*, 63(1). [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00013-I](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00013-I)
246. Nakae, A., Nakai, K., Tanaka, T., Hagihira, S., Shibata, M., Ueda, K., & Masimo, T. (2008). The role of RNA editing of the serotonin 2C receptor in a rat model of orofacial neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, 27(9). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06205.x>
247. Ng, Y. K., Wong, W. C., & Ling, E. A. (1993). A qualitative and quantitative study of substance P immuno-cytochemistry of the trigeminal ganglion in the monkey. *Anatomy and Embryology*, 188(1). <https://doi.org/10.1007/BF00191451>
248. Nicolodi, M., & Bianco, E. Del. (1990). Sensory Neuropeptides (Substance P, Calcitonin Gene-Related Peptide) and Vasoactive Intestinal Polypeptide in Human Saliva: Their Pattern in Migraine and Cluster Headache. *Cephalalgia*, 10(1). <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.1990.1001039.x>
249. Nieuwenhuys, R., & Puelles, L. (2015). Towards a new neuromorphology. In *Towards a New Neuromorphology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25693-1>
250. Nikolai, L., Dandov, A., & C. N., C. (1998). Comparative localization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in the feline trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Ann. Anat.*, 180, 307–307.
251. Nilsson, A. S., Fainzilber, M., Falck, P., & Ibáñez, C. F. (1998). Neurotrophin-7: A novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Letters*, 424(3). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00192-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00192-6)
252. Nishio, T., Furukawa, S., Akiguchi, I., Oka, N., Ohnishi, K., Tomimoto, H., Nakamura, S., & Klmura, J. (1994). Cellular localization of nerve growth factor-like immunoreactivity in adult rat brain: Quantitative and immunohistochemical study. *Neuroscience*, 60(1). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90204-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90204-6)
253. Noguchi, K., de León, M., Nahin, R. L., Senba, E., & Ruda, M. A. (1993). Quantification of axotomy-induced alteration of neuropeptide mRNAs in dorsal root ganglion neurons with special reference to neuropeptide Y mRNA and the effects of neonatal capsaicin treatment. *Journal of Neuroscience Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1002/jnr.490350108>

254. O'Connor, T. P., & Van der Kooy, D. (1988). Enrichment of a vasoactive neuropeptide (calcitonin gene related peptide) in the trigeminal sensory projection to the intracranial arteries. *Journal of Neuroscience*, 8(7). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.08-07-02468.1988>
255. O'Dell, T. J., Hawkins, R. D., Kandel, E. R., & Arancio, O. (1991). Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24). <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11285>
256. Ognen Petroff. (2002). GABA and glutamate in the human brain. *The Neuroscientist*, 66, 562–573.
257. Oku, R., Satoh, M., Fujii, N., Otaka, A., Yajima, H., & Takagi, H. (1987). Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Research*, 403(2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90074-6)
258. Olesen, J., Diener, H.-C., Husstedt, I. W., Goadsby, P. J., Hall, D., Meier, U., Pollentier, S., & Lesko, L. M. (2004). Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist BIBN 4096 BS for the Acute Treatment of Migraine. *New England Journal of Medicine*, 350(11). <https://doi.org/10.1056/nejmoa030505>
259. Olszewski, J. (1950). On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 92(3). <https://doi.org/10.1002/cne.900920305>
260. Ossipov, M. H., Morimura, K., & Porreca, F. (2014). Descending pain modulation and chronification of pain. In *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000055>
261. Otsuka M, K. S. (1976). Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of new born rat. *Nature*, 264, 84–84.
262. Otsuka, M., & Konishi, S. (1976). Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature*, 264(5581). <https://doi.org/10.1038/264083a0>
263. Otsuka, M., Konishi, S., Yanagisawa, M., Tsunoo, A., & Akagi, H. (1982). Role of substance P as a sensory transmitter in spinal cord and sympathetic ganglia. In *Ciba Foundation symposium* (Issue 91). <https://doi.org/10.1002/9780470720738.ch3>
264. Otsuka, M., & Yoshioka, K. (1993). Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. In *Physiological Reviews* (Vol. 73, Issue 2). <https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.2.229>
265. Oury, F., Murakami, Y., Renaud, J. S., Pasqualetti, M., Charnay, P., Ren, S. Y., & Rijli, F. M. (2006). Hoxa2- and rhombomere-dependent development of the mouse facial somatosensory map. *Science*, 313(5792). <https://doi.org/10.1126/science.1130042>

266. Pan, M., Naftel, J. P., & Wheeler, E. F. (2000). Effects of deprivation of neonatal nerve growth factor on the expression of neurotrophin receptors and brain-derived neurotrophic factor by dental pulp afferents of the adult rat. *Archives of Oral Biology*, *45*(5). [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00002-9)
267. Panneton, W. M., & Burton, H. (1982). Origin of ascending intratrigeminal pathways in the cat. *Brain Research*, *236*(2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90728-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90728-4)
268. Pantopoulos, K., & Hentze, M. W. (1995). Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: Direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1267>
269. Pardutz, A., Krizbai, I., Multon, S., Vecsei, L., & Schoenen, J. (2000). Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *NeuroReport*, *11*(14). <https://doi.org/10.1097/00001756-200009280-00008>
270. Pardutz, A., Szatmári, E., Vecsei, L., & Schoenen, J. (2004). Nitroglycerin-induced nNOS increase in rat trigeminal nucleus caudalis is inhibited by systemic administration of lysine acetylsalicylate but not of sumatriptan. *Cephalalgia*, *24*(6). <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2004.00699.x>
271. Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., & Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, *155*(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
272. Patapoutian, A., & Reichardt, L. F. (2001). Trk receptors: Mediators of neurotrophin action. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 11, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00208-7)
273. Patel, N. M., & M Das, J. (2019). Neuroanatomy, Spinal Trigeminal Nucleus. In *StatPearls*.
274. Paxinos, G., & Watson, C. (2014). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Seventh Edition. *Elsevier Academic Press*, 170.
275. Pedersen-Bjergaard, U., Nielsen, L. B., Jensen, K., Edvinsson, L., Jansen, I., & Olesen, J. (1991). Calcitonin gene-related peptide, neurokinin A and substance P: Effects on Nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle. *Peptides*, *12*(2). [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(91\)90022-H](https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90022-H)
276. Peterlin, B. L., Sacco, S., Bernecker, C., & Scher, A. I. (2016). Adipokines and Migraine: A Systematic Review. In *Headache* (Vol. 56, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/head.12788>
277. Pezet, S., & McMahon, S. B. (2006). Neurotrophins: Mediators and modulators of pain. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929>
278. Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? In *Neuroscience and*

- Biobehavioral Reviews* (Vol. 30, Issue 2).
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.016>
279. Pietrobon, D., & Striessnig, J. (2003a). Neurobiology of migraine. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(5). <https://doi.org/10.1038/nrn1102>
280. Pietrobon, D., & Striessnig, J. (2003b). Neurological diseases: Neurobiology of migraine. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(5).
281. Poitras, D., & Parent, A. (1978). Atlas of the distribution of monoamine-containing nerve cell bodies in the brain stem of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 179(4). <https://doi.org/10.1002/cne.901790402>
282. Pozdnyakov, N., Lloyd, A., Reddy, V. N., & Sitaramayya, A. (1993). Nitric oxide-regulated endogenous ADP-ribosylation of rod outer segment proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192(2). <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1459>
283. Price, T. J., Cervero, F., Gold, M. S., Hammond, D. L., & Prescott, S. A. (2009). Chloride regulation in the pain pathway. In *Brain Research Reviews* (Vol. 60, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.015>
284. Price, T. J., Louria, M. D., Candelario-Soto, D., Dussor, G. O., Jeske, N. A., Patwardhan, A. M., Diogenes, A., Trott, A. A., Hargreaves, K. M., & Flores, C. M. (2005). Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: Effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion. *BMC Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-4>
285. Priestley, J. V., Somogyi, P., & Cuello, A. C. (1982). Immunocytochemical localization of substance P in the spinal trigeminal nucleus of the rat: A light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology*, 211(1). <https://doi.org/10.1002/cne.902110105>
286. Puelles, L., Amat, J. A., & Martinez-de-la-Torre, M. (1987). Segment-related, mosaic neurogenetic pattern in the forebrain and mesencephalon of early chick embryos: I. Topography of ache-positive neuroblasts up to stage HH18. *Journal of Comparative Neurology*, 266(2). <https://doi.org/10.1002/cne.902660210>
287. Raffaelli, B., & Reuter, U. (2018). The biology of monoclonal antibodies: Focus on calcitonin gene-related peptide for prophylactic migraine therapy. *Neurotherapeutics*, 15(2). <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0622-7>
288. Rajagopal, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., & Chao, M. V. (2004). Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *Journal of Neuroscience*, 24(30). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0010-04.2004>
289. Ramachandran, R. (2018). Neurogenic inflammation and its role in migraine. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 40, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0676-y>

290. Regoli, D., Boudon, A., & Fauchère, J. L. (1994). Receptors and antagonists for substance P and related peptides. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 46, Issue 4).
291. Reid, G. A., Chilukuri, N., & Darvesh, S. (2013). Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.054>
292. Ren, K., & Dubner, R. (1999). Central Nervous System Plasticity and Persistent Pain. *Journal of Orofacial Pain*, 13(2).
293. Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 96(3). <https://doi.org/10.1002/cne.900960303>
294. Rexed, B. (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 100(2). <https://doi.org/10.1002/cne.901000205>
295. Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., & Wink, D. A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. In *Biological Chemistry* (Vol. 385, Issue 1). <https://doi.org/10.1515/BC.2004.001>
296. Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716). <https://doi.org/10.1038/16697>
297. Roberts, E. (1986). Failure of GABAergic inhibition: a key to local and global seizures. In *Advances in neurology* (Vol. 44).
298. Roda, R. S., & Blanton, P. L. (1998). The anatomy of local anesthesia. In *Texas dental journal* (Vol. 115, Issue 5).
299. Rogoz, K., Andersen, H. H., Kullander, K., & Lagerström, M. C. (2014). Glutamate, substance p, and calcitonin gene-related peptide cooperate in inflammation-induced heat hyperalgesias. *Molecular Pharmacology*, 85(2). <https://doi.org/10.1124/mol.113.089532>
300. Rogoz, K., Andersen, H. H., Lagerström, M. C., & Kullander, K. (2014). Multimodal use of calcitonin gene-related peptide and substance P in itch and acute pain uncovered by the elimination of vesicular glutamate transporter 2 from transient receptor potential cation channel subfamily v member 1 neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(42). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1722-14.2014>
301. Rose, P. M., Fernandes, P., Lynch, J. S., Frazier, S. T., Fisher, S. M., Kodukula, K., Kienzle, B., & Seethala, R. (1995). Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(39). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.22661>
302. Ruedrich, E. D., Chikkannaiah, M., & Kumar, G. (2016). Wallenberg's lateral medullary syndrome in an adolescent. *American Journal of Emergency Medicine*, 34(11). <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2016.05.022>

303. Runge, K., Cardoso, C., & de Chevigny, A. (2020). Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. In *Frontiers in Synaptic Neuroscience* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2020.00036>
304. Russo, A. F., & Hay, D. L. (2023). CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond. In *Physiological reviews* (Vol. 103, Issue 2). <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2021>
305. Russo, A. F., Nelson, C., Roos, B. A., & Rosenfeld, M. G. (1988). Differential regulation of the coexpressed calcitonin/ α -CGRP and β -CGRP neuroendocrine genes. *Journal of Biological Chemistry*, 263(1). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)57346-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)57346-x)
306. Rusu, M. C. (2004). The spinal trigeminal nucleus - Considerations on the structure of the nucleus caudalis. *Folia Morphologica*, 63(3).
307. Saito, S., Kidd, G. J., Trapp, B. D., Dawson, T. M., Bredt, D. S., Wilson, D. A., Traystman, R. J., Snyder, S. H., & Hanley, D. F. (1994). Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase. *Neuroscience*, 59(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90608-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90608-4)
308. Sajdyk, T. J., Vandergriff, M. G., & Gehlert, D. R. (1999). Amygdalar neuropeptide Y Y1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, 368(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00018-7)
309. Salgado-Pineda, P., Delaveau, P., Blin, O., & Nieoullon, A. (2005). Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. *Clinical Neuropharmacology*, 28(5). <https://doi.org/10.1097/01.wnf.0000185824.57690.f0>
310. Sarchielli, P., Alberti, A., Codini, M., Floridi, A., & Gallai, V. (2000). Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia*, 20(10). <https://doi.org/10.1046/j.1468-2982.2000.00146.x>
311. Sarchielli, P., Alberti, A., Floridi, A., & Gallai, V. (2001). Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients. *Neurology*, 57(1). <https://doi.org/10.1212/WNL.57.1.132>
312. Sarhan, M., Pawlowski, S. A., Barthas, F., Yalcin, I., Kaufling, J., Dardente, H., Zachariou, V., Dileone, R. J., Barrot, M., & Veinante, P. (2013). BDNF parabrachio-amygdaloid pathway in morphine-induced analgesia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(7). <https://doi.org/10.1017/S146114571200168X>
313. Saria, A., Ma, R. C., & Dun, N. J. (1985). Neurokinin A depolarizes neurons of the guinea pig inferior mesenteric ganglia. *Neuroscience Letters*, 60(2). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90235-6)
314. Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., & Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 469, Issues 5–6). <https://doi.org/10.1007/S00424-017-1964-4>

315. Satoh, K., Staines, W. A., Atmadja, S., & Fibiger, H. C. (1983). Ultrastructural observations of the cholinergic neuron in the rat striatum as identified by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry. *Neuroscience*, *10*(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90103-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90103-3)
316. Schäfer, M. K. H., Eiden, L. E., & Weihe, E. (1998). Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience*, *84*(2). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00516-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00516-2)
317. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
318. Schmidt-Wilcke, T., Fuchs, E., Funke, K., Vlachos, A., Müller-Dahlhaus, F., Puts, N. A. J., Harris, R. E., & Edden, R. A. E. (2018). GABA—from Inhibition to Cognition: Emerging Concepts. In *Neuroscientist* (Vol. 24, Issue 5). <https://doi.org/10.1177/1073858417734530>
319. Schoenen, J. (1982). The dendritic organization of the human spinal cord: The dorsal horn. *Neuroscience*, *7*(9). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(82\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(82)90120-8)
320. Scott, S. A., Dinowitz, S., Terhaar, K., Sherlock, D., Campbell, M. A., & Levine, D. (1994). Cytochemical characteristics of neurons in the trigeminal mesencephalic nucleus of hatchling chicks. *Journal of Comparative Neurology*, *350*(2). <https://doi.org/10.1002/cne.903500212>
321. Sessle, B. J. (2014). Neural Basis of Oral and Facial Function. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00035-0>
322. Seybold, V. S. (2009). The role of peptides in central sensitization. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 194). https://doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_13
323. Sharp, T., & Barnes, N. M. (2020). Central 5-HT receptors and their function; present and future. In *Neuropharmacology* (Vol. 177). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108155>
324. Shigenaga, Y., Okamoto, T., Nishimori, T., Suemune, S., Nasution, I. D., Chen, I. C., Tsuru, K., Yoshida, A., Tabuchi, K., Hosoi, M., & Tsuru, H. (1986). Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, *244*(1). <https://doi.org/10.1002/cne.902440102>
325. Shih, J. C., Chen, K., & Ridd, M. J. (1999). Monoamine oxidase: From genes to behavior. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.197>
326. Shults, C. W., Quirion, R., Chronwall, B., Chase, T. N., & O'Donohue, T. L. (1984). A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors

- in the rat central nervous system. *Peptides*, 5(6). [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90177-3](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90177-3)
327. Singh, G. P. (2019). Anatomy of Trigeminal Nerve. In *Handbook of Trigeminal Neuralgia*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2333-1_2
 328. Singh, S., Johnson, P. I., Javed, A., Gray, T. S., Lonchyna, V. A., & Wurster, R. D. (1999). Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation*, 99(3). <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.3.411>
 329. Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: An Overview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 846). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_1
 330. Small, D. H., Moir, R. D., Fuller, S. J., Michaelson, S., Bush, A. I., Li, Q. X., Milward, E., Masters, C. L., Hilbich, C., Weidemann, A., & Beyreuther, K. (1991). A Protease Activity Associated with Acetylcholinesterase Releases the Membrane-Bound Form of the Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease. *Biochemistry*, 30(44). <https://doi.org/10.1021/bi00108a027>
 331. Smith, Y., & Kieval, J. Z. (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 23, Issue 10 SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S1471-1931\(00\)00023-9](https://doi.org/10.1016/S1471-1931(00)00023-9)
 332. Sørensen, G., Lindberg, C., Wörtwein, G., Bolwig, T. G., & Woldbye, D. P. D. (2004). Differential roles for neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in anxiety and sedation. *Journal of Neuroscience Research*, 77(5). <https://doi.org/10.1002/jnr.20200>
 333. Sorge, R. E., Mapplebeck, J. C. S., Rosen, S., Beggs, S., Taves, S., Alexander, J. K., Martin, L. J., Austin, J. S., Sotocinal, S. G., Chen, D., Yang, M., Shi, X. Q., Huang, H., Pilon, N. J., Bilan, P. J., Tu, Y., Klip, A., Ji, R. R., Zhang, J., ... Mogil, J. S. (2015). Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature Neuroscience*, 18(8). <https://doi.org/10.1038/nn.4053>
 334. Steinbusch, H. W. M. (1981). Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-Cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90146-9)
 335. Sten Shi, T. J., Cui, J. G., Meyerson, B. A., Linderth, B., & Hökfelt, T. (1999). Regulation of galanin and neuropeptide Y in dorsal root ganglia and dorsal horn in rat mononeuropathic models: Possible relation to tactile hypersensitivity. *Neuroscience*, 93(2). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00105-0)
 336. Stoyanova, I., Dandov, A., Lazarov, N., & Chouchkov, C. (1998). GABA- and glutamate-immunoreactivity in sensory ganglia of cat: A quantitative analysis. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 106(5). <https://doi.org/10.1076/apab.106.5.362.4360>
 337. Sumner, S. C. J., Gallagher, K. S., Davis, D. G., Covell, D. G., Jemigan, R. L., & Ferretti, J. A. (1990). Conformational analysis of the tachykinins in solution:

- Substance p and physalaemin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 8(3). <https://doi.org/10.1080/07391102.1990.10507836>
338. Sun, Q. Q., Huguenard, J. R., & Prince, D. A. (2001). Neuropeptide Y receptors differentially modulate G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat thalamic neurons. *Journal of Physiology*, 531(1). <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0067j.x>
339. Szabat, E., Soinila, S., Häppölä, O., Linnala, A., & Virtanen, I. (1992). A new monoclonal antibody against the GABA-protein conjugate shows immunoreactivity in sensory neurons of the rat. *Neuroscience*, 47(2). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90255-Z](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90255-Z)
340. Tajti, J., Uddman, R., Möller, S., Sundler, F., & Edvinsson, L. (1999). Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 76(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(99\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(99)00024-7)
341. Takeda, M., Takahashi, M., Kitagawa, J., Kanazawa, T., Nasu, M., & Matsumoto, S. (2013). Brain-derived neurotrophic factor enhances the excitability of small-diameter trigeminal ganglion neurons projecting to the trigeminal nucleus interpolaris/caudalis transition zone following masseter muscle inflammation. *Molecular Pain*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1744-8069-9-49>
342. Tassorelli, C., & Joseph, S. A. (1995). Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Research*, 682(1–2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00348-T](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00348-T)
343. Tassorelli, C., Joseph, S. A., & Nappi, G. (1997). Neurochemical mechanisms of nitroglycerin-induced neuronal activation in rat brain: A pharmacological investigation. *Neuropharmacology*, 36(10). [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00122-6)
344. Tatemoto, K., Carlquist, M., & Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y - A novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296(5858). <https://doi.org/10.1038/296659a0>
345. Taylor, B. K. (2005). NPY analgesia: moving from acute to chronic pain. In *The NPY Family of Peptides in Immune Disorders, Inflammation, Angiogenesis and Cancer*. https://doi.org/10.1007/3-7643-7427-6_8
346. Ten Donkelaar, H. J. (2020). Clinical neuroanatomy: Brain circuitry and its disorders. In *Clinical Neuroanatomy: Brain Circuitry and Its Disorders*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41878-6>
347. Terenghi, G., Polak, J. M., Ghatei, M. A., Mulderry, P. K., Butler, J. M., Unger, W. G., & Bloom, S. R. (1985). Distribution and origin of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the sensory innervation of the mammalian eye. *Journal of Comparative Neurology*, 233(4). <https://doi.org/10.1002/cne.902330410>
348. Tervo, K., Tervo, T., Eränkö, L., Eränkö, O., & Cuello, A. C. (1981). Immunoreactivity for substance P in the gasserian ganglion, ophthalmic nerve and

- anterior segment of the rabbit eye. *The Histochemical Journal*, 13(3). <https://doi.org/10.1007/BF01005059>
349. Theodore J. Price, Fernando Cervero, & Yves de Koninck. (2005). Role of Cation-Chloride-Cotransporters (CCC) in Pain and Hyperalgesia. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(6). <https://doi.org/10.2174/1568026054367629>
 350. Timofeeva, E., Dufresne, C., Sík, A., Zhang, Z. W., & Deschênes, M. (2005). Cholinergic modulation of vibrissal receptive fields in trigeminal nuclei. *Journal of Neuroscience*, 25(40). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3073-05.2005>
 351. Törnwall, J., Uusitalo, H., & Kontinen, Y. T. (1994). The distribution and origin of nerve fibers immunoreactive for substance P and neurokinin A in the anterior buccal gland of the rat. *Cell & Tissue Research*, 277(2). <https://doi.org/10.1007/BF00327778>
 352. Torvik, A. (1956). Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures. An experimental study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 106(1). <https://doi.org/10.1002/cne.901060104>
 353. Toyoda, H., Yamada, J., Ueno, S., Okabe, A., Kato, H., Sato, K., Hashimoto, K., & Fukuda, A. (2005). Differential functional expression of cation-Cl⁻ cotransporter mRNAs (KCC1, KCC2, and NKCC1) in rat trigeminal nervous system. *Molecular Brain Research*, 133(1). <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.09.015>
 354. Trang, T., Beggs, S., Wan, X., & Salter, M. W. (2009). P2X₄-receptor-mediated synthesis and release of brain-derived neurotrophic factor in microglia is dependent on calcium and p38-mitogen-activated protein kinase activation. *Journal of Neuroscience*, 29(11). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5714-08.2009>
 355. Trevor Huff. (2022). *Neuroanatomy, Cranial Nerve 4 (Trigeminal)*. StatPearls Publishing.
 356. Tubbs, R. S., Loukas, M., Shoja, M. M., Shokouhi, G., & Oakes, W. J. (2008). François Magendie (1783-1855) and his contributions to the foundations of neuroscience and neurosurgery. *Journal of Neurosurgery*, 108(5). <https://doi.org/10.3171/JNS/2008/108/5/1038>
 357. Turman, J., & Chandler, S. H. (1994). Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse*, 18(1). <https://doi.org/10.1002/syn.890180103>
 358. Tyler, W. J., Perrett, S. P., & Pozzo-Miller, L. D. (2002). The role of neurotrophins in neurotransmitter release. In *Neuroscientist* (Vol. 8, Issue 6). <https://doi.org/10.1177/1073858402238511>
 359. Uddman, R., Edvinsson, L., Ekman, R., Kingman, T., & McCulloch, J. (1985). Innervation of the feline cerebral vasculature by nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide: Trigeminal origin and co-existence with substance P. *Neuroscience Letters*, 62(1). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90296-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90296-4)
 360. Urits, I., Jones, M. R., Gress, K., Charipova, K., Fiocchi, J., Kaye, A. D., & Viswanath, O. (2019). CGRP Antagonists for the Treatment of Chronic Migraines: a

- Comprehensive Review. In *Current Pain and Headache Reports* (Vol. 23, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s11916-019-0768-y>
361. Usunoff, K. G., Marani, E., & Schoen, J. H. (1997). The trigeminal system in man. In *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* (Vol. 136).
 362. von Euler, U. S., & Gaddum, J. H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *The Journal of Physiology*, 72(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1931.sp002763>
 363. Vécsei, L., Tajti, J., Knyihár, E., & Samsam, M. (1995). Neuropeptides and Migraine: The Role of CGRP. *Cephalalgia*, 15(16_suppl). <https://doi.org/10.1177/0333102495015s1603>
 364. Van Der Cruyssen, F., & Politis, C. (2018). Neurophysiological aspects of the trigeminal sensory system: An update. *Reviews in the Neurosciences*, 29(2). <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0044>
 365. Van Gerven, L., Alpizar, Y. A., Steelant, B., Callebaut, I., Kortekaas Krohn, I., Wouters, M., Vermeulen, F., Boeckxstaens, G., Talavera, K., & Hellings, P. W. (2017). Enhanced chemosensory sensitivity in patients with idiopathic rhinitis and its reversal by nasal capsaicin treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.03.014>
 366. Viggiano, A., Monda, M., Viggiano, A., Chiefari, M., Aurilio, C., & De Luca, B. (2004). Evidence that GABAergic neurons in the spinal trigeminal nucleus are involved in the transmission of inflammatory pain in the rat: A microdialysis and pharmacological study. *European Journal of Pharmacology*, 496(1). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.019>
 367. von Blankenfeld, G., Trotter, J., & Kettenmann, H. (1991). Expression and Developmental Regulation of a GABAA Receptor in Cultured Murine Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *European Journal of Neuroscience*, 3(4). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00817.x>
 368. Wakisaka, S., Kajander, K. C., & Bennett, G. J. (1992). Effects of peripheral nerve injuries and tissue inflammation on the levels of neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat primary afferent neurons. *Brain Research*, 598(1–2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90206-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90206-O)
 369. Walsh, G. S., Krol, K. M., & Kawaja, M. D. (1999). Absence of the p75 neurotrophin receptor alters the pattern of sympathosensory sprouting in the trigeminal ganglia of mice overexpressing nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*, 19(1). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-01-00258.1999>
 370. Wang, H., Nie, H., Zhang, R. X., & Qiao, J. T. (1999). Peripheral nitric oxide contributes to both formalin- and NMDA-induced activation of nociceptors: An immunocytochemical study in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 57(6). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990915\)57:6<824::AID-JNR7>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990915)57:6<824::AID-JNR7>3.0.CO;2-V)

371. Wang, S. J. (2005). Activation of neuropeptide Y Y1 receptors inhibits glutamate release through reduction of voltage-dependent Ca²⁺ entry in the rat cerebral cortex nerve terminals: Suppression of this inhibitory effect by the protein kinase C-dependent facilitatory pathway. *Neuroscience*, *134*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.053>
372. Watson, C., Kirkcaldie, M., & Paxinos, G. (2010). The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy. In *The Brain: an Introduction to Functional Neuroanatomy*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01579-7>
373. Watson, C., Leanage, G., Makki, N., & Tvrdik, P. (2017). Escapees from Rhombomeric Lineage Restriction: Extensive Migration Rostral to the r4/r5 Border of Hox-a3 Expression. *Anatomical Record*, *300*(10). <https://doi.org/10.1002/ar.23628>
374. Westrum, L. E., & Broderson, S. H. (1976). Acetylcholinesterase activity of synaptic structures in the spinal trigeminal nucleus. *Journal of Neurocytology*, *5*(5). <https://doi.org/10.1007/BF01175569>
375. White, D. M. (1998). Contribution of neurotrophin-3 to the neuropeptide Y-induced increase in neurite outgrowth of rat dorsal root ganglion cells. *Neuroscience*, *86*(1). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00034-7)
376. Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Forssmann, W. G., Reinecke, M., Tschopp, F. A., & Fischer, J. A. (1984). Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neuroscience Letters*, *52*(1–2). [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90374-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90374-4)
377. Woldbye, D. P. D., Klemp, K., & Madsen, T. M. (1998). Neuropeptide Y attenuates naloxone-precipitated morphine withdrawal via Y5-like receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *284*(2).
378. Woldbye, D. P. D., Larsen, P. J., Mikkelsen, J. D., Klemp, K., Madsen, T. M., & Bolwig, T. G. (1997). Powerful inhibition of kainic acid seizures by neuropeptide Y via Y5-like receptors. *Nature Medicine*, *3*(7). <https://doi.org/10.1038/nm0797-761>
379. Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, *306*(5944). <https://doi.org/10.1038/306686a0>
380. Wu, J., Fang, L., Lin, Q., & Willis, W. D. (2000). Fos expression is induced by increased nitric oxide release in rat spinal cord dorsal horn. *Neuroscience*, *96*(2). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00534-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00534-5)
381. Wu, Y. W., Hao, T., Kou, X. X., Gan, Y. H., & Ma, X. C. (2015). Synovial TRPV1 is upregulated by 17-β-estradiol and involved in allodynia of inflamed temporomandibular joints in female rats. *Archives of Oral Biology*, *60*(9). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.011>
382. Xie, H. Q., Choi, R. C. Y., Leung, K. W., Chen, V. P., Chu, G. K. Y., & Tsim, K. W. K. (2009). Transcriptional regulation of proline-rich membrane anchor (PRiMA) of

- globular form acetylcholinesterase in neuron: An inductive effect of neuron differentiation. *Brain Research*, 1265. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.065>
383. Xie, W., Stribley, J. A., Chatonnet, A., Wilder, P. J., Rizzino, A., McComb, R. D., Taylor, P., Hinrichs, S. H., & Lockridge, O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(3).
384. Xiong, Z., & Cheung, D. W. (1995). ATP-Dependent inhibition of Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells by neuropeptide Y. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 431(1). <https://doi.org/10.1007/BF00374383>
385. Xu, X. J., Hao, J. X., Hökfelt, T., & Wiesenfeld-Hallin, Z. (1994). The effects of intrathecal neuropeptide Y on the spinal nociceptive flexor reflex in rats with intact sciatic nerves and after peripheral axotomy. *Neuroscience*, 63(3). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90526-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90526-6)
386. Yaksh, T. L., Dirig, D. M., Conway, C. M., Svensson, C., Luo, Z. D., & Isakson, P. C. (2001). The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E₂ is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *Journal of Neuroscience*, 21(16). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-05847.2001>
387. Yasuda, T., & Mochizuki, H. (2010). Use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 10, Issue 6). <https://doi.org/10.1586/ern.10.55>
388. Ye, Z., Wimalawansa, S. J., & Westlund, K. N. (1999). Receptor for calcitonin gene-related peptide: Localization in the dorsal and ventral spinal cord. *Neuroscience*, 92(4). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00088-3)
389. Zaqout, S., & Kaindl, A. M. (2016). Golgi-cox staining step by step. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00038>
390. Zhang, J., Yi, Q. T., Gong, M., Zhang, Y. Q., Liu, D., & Zhu, R. J. (2019). Upregulation of TRPV1 in spinal dorsal root ganglion by activating NGF-TrkA pathway contributes to pelvic organ cross-sensitisation in rats with experimental autoimmune prostatitis. *Andrologia*, 51(8). <https://doi.org/10.1111/and.13302>
391. Zhang, P., He, Q., Chen, D., Liu, W., Wang, L., Zhang, C., Ma, D., Li, W., Liu, B., & Liu, F. (2015). G protein-coupled receptor 183 facilitates endothelial-to-hematopoietic transition via Notch1 inhibition. *Cell Research*, 25(10). <https://doi.org/10.1038/cr.2015.109>
392. Zhang, X., Bean, A. J., Wiesenfeld-Hallin, Z., & Hökfelt, T. (1995). Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord-IV. Effects of peripheral axotomy with special reference to neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine. *Neuroscience*, 64(4). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00487-P](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00487-P)

393. Zhang, X., Shi, T., Holmberg, K., Landry, M., Huang, W., Xiao, H., Ju, G., & Hokfelt, T. (1997). Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.729>
394. Zhou, L., & Zhu, D. Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001>
395. Zhou, X. F., Deng, Y. S., Xian, C. J., & Zhong, J. H. (2000). Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *European Journal of Neuroscience*, *12*(1). <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00884.x>
396. Zhou, X. F., & Rush, R. A. (1994). Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Research*, *643*(1–2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90022-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90022-1)
397. Zhou, Y., & Danbolt, N. C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 121, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8>
398. Zill, P., Büttner, A., Eisenmenger, W., Müller, J., Möller, H. J., & Bondy, B. (2009). Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: A postmortem study in human brain. *Neuroscience*, *159*(4). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.006>

S U M M A R Y

An important part of the brainstem, the spinal trigeminal nucleus, is vital to the intricate processing of sensory data related to the craniofacial region. This nucleus is a complex structure with unique functional and neurochemical properties that is situated cranially to the spinal cord. There are several levels in the brainstem where the spinal trigeminal nucleus is located, starting from the upper levels of the cervical spinal cord and ending in the pons. It has a key location for the integration and transmission of sensory information from the face and head. Typically, the nucleus is separated into the caudal (SpVc), interpolar (SpVi), and oral (SpVo) subnuclei. In the craniofacial area, each subnucleus contributes to complicated sensory processing and is linked to distinct functional characteristics. By methodically analyzing the immunoexpression and differential distribution of important neurotransmitters and neuroactive chemicals in its subnuclei, this study contributes to our knowledge of the spinal trigeminal nucleus. We have found strong evidence for the immunoexpression of serotonin and GABA, with different distribution patterns in each of the three subnuclei. Substance P, neuropeptide Y, and CGRP, three significant neuroactive substances, had their immunoexpression levels well defined as well. In the craniofacial region, these compounds are crucial for both modulating pain and amplifying sensory inputs. The investigation clarified the immunoexpression levels of two enzymes that are essential for neuronal transmission: acetylcholinesterase (AChE) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS), offering information on their possible functions as well as their distribution. In the spinal trigeminal nucleus, the expression patterns of certain neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, GDNF) and their corresponding receptors (TrkA, TrkB, TrkC, GFR α 1) were examined. This clarifies the trophic support processes in this area. The intricate relationship between GABA, serotonin, neuroactive chemicals, metabolic enzymes, neurotrophic factors, and receptors demonstrates the spinal trigeminal nucleus's intricate and well-coordinated activity. The spinal trigeminal nucleus is diverse, as evidenced by the different neurochemical profiles found in the three subnuclei. The distinct chemical fingerprints of each subnucleus are probably responsible for their distinct roles and specialized tasks in sensory processing. A more sophisticated knowledge of each

structure's unique contributions to craniofacial sensory integration and regulation is made possible by the capacity to neurochemically differentiate between them.

In summary, the spinal trigeminal nucleus is revealed to be a neurochemically varied entity in addition to an architecturally complicated area. Understanding the distinct neurochemical profiles seen in each of its subnuclei improves our comprehension of the intricate brain circuits governing craniofacial sensory processes. Future research aiming at determining the specific contribution of each subnucleus to sensory processing in the craniofacial area will build upon this neurochemical variability.