

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

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

СОФИЯ, 2024

Научно жури в състав от 5 хабилитирани лица в състав:

1. **Проф. д-р Лина Малинова, дм – вътрешен член за МУ-София, Катедра по анатомия, хистология и ембриология на Медицински факултет при МУ-София;**
2. **Доц. д-р Ангел Дандов, дм – вътрешен член за МУ-София, Катедра по анатомия, хистология и ембриология на Медицински факултет при МУ-София;**
3. **Проф. д-р Стефан Сивков, дм – външен член за МУ-София, Медицински университет-Пловдив;**
4. **Проф. д-р Яна Чекаларова, дм – външен член за МУ-София, Българска академия на науките;**
5. **Доц. д-р Стоян Павлов, дм – външен член за МУ-София, Медицински университет-Варна.**

Резервни членове:

1. **Доц. д-р Димо Кръстев, дм – вътрешен резервен член за МУ-София, МК „Йорданка Филаретова“ при МУ-София;**
2. **Доц. д-р Николай Димитров, дм – външен резервен член за МУ-София, Тракийски университет-Стара Загора.**

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

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор“

Професионално направление:
7.1 Медицина

Научна специалност:
„Анатомия, хистология и цитология“

Научен ръководител:
проф. д-р Николай Еленков Лазаров, д.м.н.

СОФИЯ, 2024

Дисертационният труд е написан на 211 стандартни страници и е онагледен с 36 фигури (26 комбинирани микрофотографии и 13 графики) и 3 таблици. В библиографския списък са включени 398 литературни източници, от които 3 на кирилица и 395 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на съвет на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология на Медицински университет-София, проведен на 12.03.2024 г.

Изследванията по дисертацията са извършени основно в лабораторията по функционална невроанатомия на Института по невробиология към БАН и в катедрата по анатомия, хистология и ембриология на Медицински университет-София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 04.06.2024г. от 13:00 часа в Анатомична аудитория на катедра по анатомия, хистология и ембриология към Медицински университет – София на адрес гр. София, бул. „Пенчо Славейков“ №52А.

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на катедрата по анатомия, хистология и ембриология към Медицински университет – София, ул. „Здраве“ №2, ет. 3.

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.....	i
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	6
3.1 Експериментални животни.....	6
3.2 Хистологични техники.....	7
3.3. Имунохистохимични методи.....	7
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ.....	9
4.1 Морфология на спиналното тригеминално ядро.....	9
4.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро.....	9
4.1.2 Морфологични видове неврони в спиналното тригеминално ядро.....	14
4.1.3 Морфометричен анализ на невроните в спиналното тригеминално ядро.....	17
4.2 Неврохимична характеристика на спиналното тригеминално ядро.....	20
4.2.1 Невротрансмитери и невропептиди в спиналното тригеминално ядро.....	20
4.2.3. Невротрофни фактори и техните рецептори.....	39
4.2.4 Обобщение върху неврохимичната анатомия на спиналното ядро.....	54
V. ОБСЪЖДАНЕ.....	56
5.1 Структурна организация на спиналното тригеминално ядро.....	56
5.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро.....	56
5.1.2 Видове неврони в спиналното тригеминално ядро.....	58
5.2 Химичен профил на спиналното тригеминално ядро.....	61
5.2.1 Невротрансмитери и невропептиди в спиналното тригеминално ядро.....	61
5.2.2 Газови невромодулатори.....	68
5.2.3. Невротрофни фактори и техните рецептори.....	70
5.3 Ограничения на проучването.....	72
5.4 Бъдещи насоки и перспективи.....	75
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	78
VII. ИЗВОДИ.....	79
IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	81
X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	81
XI. SUMMARY.....	82

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПНС	периферна нервна система
ХЕ	хематоксилин и еозин
ЦНС	централна нервна система
5-HT	5-хидрокситриптамин
ABC	авидин-биотин пероксидаза комплекс
AChE	ацетилхолинестераза
AMPA	α -амино-3-хидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионова киселина
ATP	аденозин трифосфат
BChE	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	гамааминомаслена киселина (ГАМК)
GAD	декарбиксилаза на глутаминовата киселина
GDNF	глиален невротрофен фактор
GFR 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 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, близък: трима близници) 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 росто-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 невромедиатори, 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 P, енкефалин и невропептид 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. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящето изследване е да се установи структурната 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 имунохистохимични техники на светлинномикроскопско ниво 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 невроните в отделните подядра и да се направи сравнителен статистически анализ на разпределението на изследваните биоактивни вещества в трите подядра на спиналното тригеминално ядро.
4. Да се даде функционално обяснение на ролята на установените невроактивни вещества в отделните подядра на спиналното тригеминално ядро при плъха.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1 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 (КЕНИМУС) в МУ-София.

3.2 Хистологични техники

3.2.1 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. Под дълбока анестезия, гръдната кухина беше отворена и възходящата аорта беше използвана за перфузионна фиксация, като канюлата се вкарваше през лявата камера на сърцето. След перфузията и изваждането на мозъка от черепната кухина, отпрепарирахме под лупа областта на интерес и тъканните блокчета бяха включени в парафин. С помощта на микротом Leica RM 2125 RTF парафиновите блокове бяха нарязани на срезове с дебелина 7 μm и серийните срезове бяха монтирани върху хром-желатинирани предметни стъкла. Тези срезове бяха обект на микроскопско изследване след оцветяване с рутинни хистологични техники:

3.2.2 Оцветяване с хематоксилин и еозин

3.2.3 Оцветяване с толуидиново синьо

3.2.4 Оцветяване с неутрално червено

3.3. Имунохистохимични методи

3.3.1 Имунохистохимична процедура

При имунохистохимичните реакции беше прилагана авидин-биотин пероксидаза комплекс (ABC) техниката, описана от *Hsu* и съавтори (*Hsu et al.*, 1981). За целите на това изследване, парафинови срезове с дебелина 7 μm бяха инкубирани във влажна среда с първични антитела, насочени срещу изследваните антигени и видово-специфични биотинилирани вторични антитела, посочени в таблици 1 и 2.

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

Първичен антисерум/ Антиген	Каталожен номер	Снабдител	Гостоприемник/Тип	Разреждане
Гама-аминомаслена киселина (GABA)	A-2052	Sigma BioSciences	заек/поликлонално	1:1000
Ацетилхолинестераза (AChE)	PA5-86086	Thermo Fisher Scientific	заек/поликлонално	1:500
Субстанция P (SP)	8834033	INCSTAR	заек/поликлонално	1:1000

Първичен антисерум/ Антиген	Каталожен номер	Снабдител	Гостоприемник/Тип	Разреждане
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
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

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

4.1 Морфология на спиналното тригеминално ядро

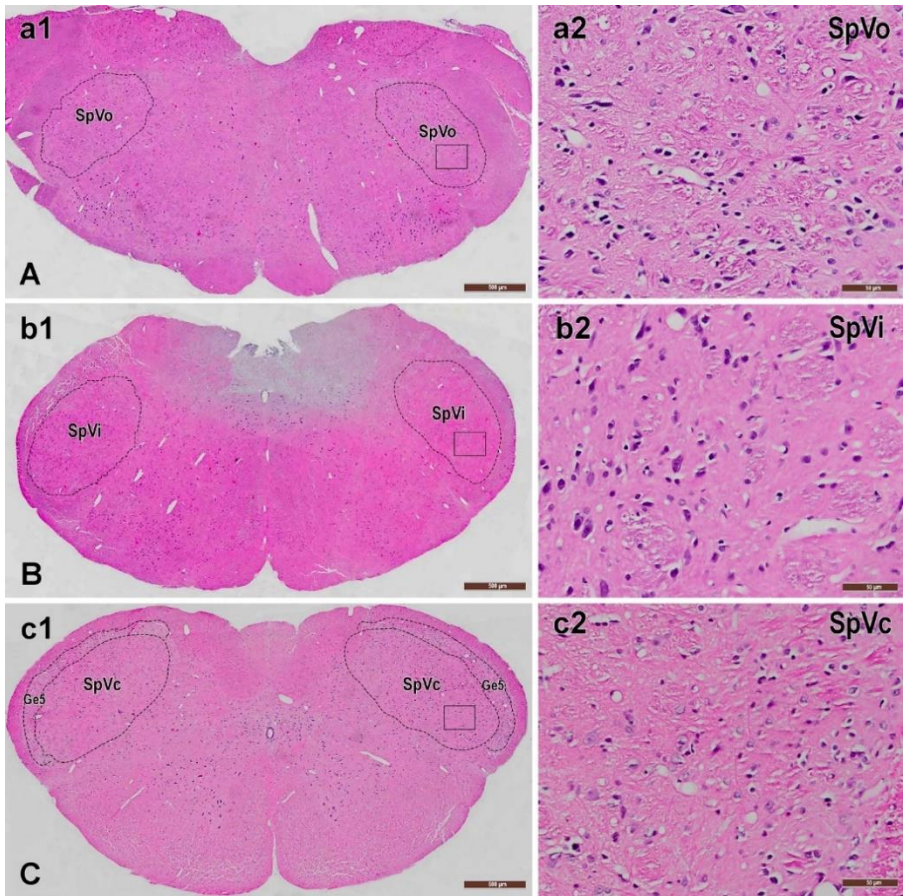
4.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро

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 пъх на *Paxinos* и *Watson*, 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 ядрото също 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 роstralно към каудално, спиналното тригеминално ядро се подразделя на три анатомично разграничими подядра: орално, интерполарно и каудално (фиг. 4.1-4.3).

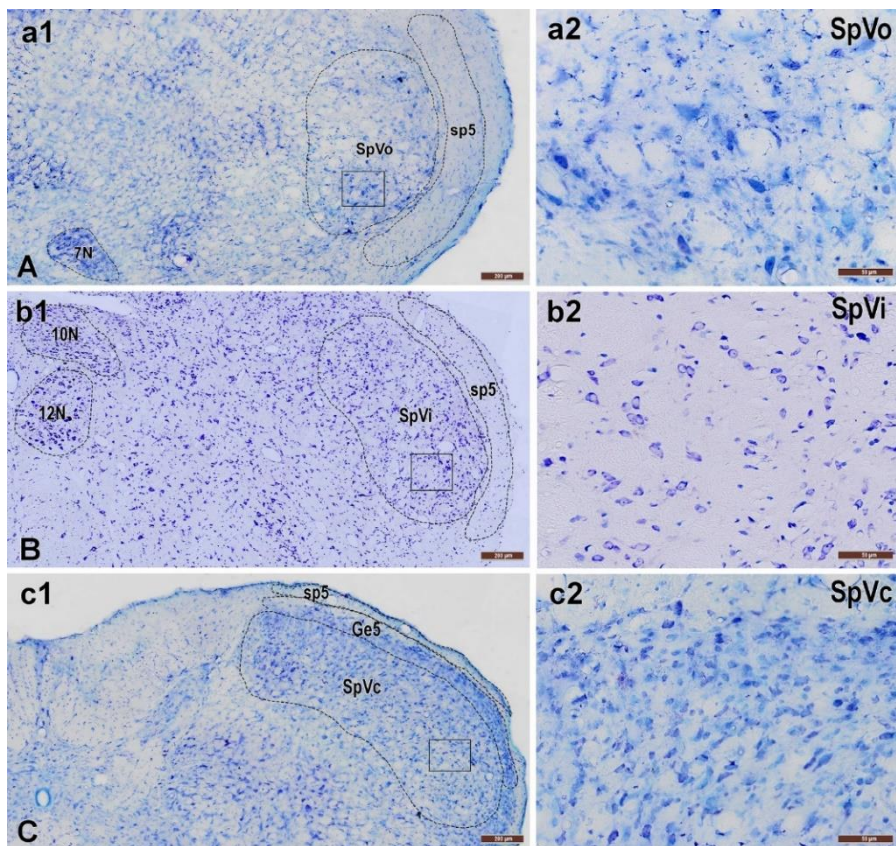
5.1.1.1 Каудално тригеминално ядро

Най-забележимото сетивно тригеминално подядро се простира от каудалната част на продълговатия мозък, от нивото, съответстващо на каудалния полюс на долния оливарен комплекс и *obex*, до втория сегмент на шийния гръбначен мозък (фиг. 4.1-4.3c1). Роstralно то продължава в интерполарното тригеминално подядро, 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 в него (фиг. 4.1-4.3c2). Повечето от тях са неправилно издължени мултиполарни клетки, като най-големите достигат до 21 μm в диаметър (фиг. 4.1c2). Другите перикариони са средноголеми. И двата типа клетки пригвежават 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



Фигура 4.1. 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, означено като subnucleus genalinosus (Ge5). Мащабна скала = 200 μm (a1, b1, c1), 50 μm (a2, b2, c2).

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 genalinosus* (фиг. 4.1c2). Повечето от неговите клетки са неправилно овални, средно големи клетки (около 12 μm в диаметър), с умерена, дифузна базофилия (фиг. 4.1-



Фигура 4.2. 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).

4.3.c2). Значителен 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 диаметър. В някои клетки телцата на *Nissl* са много ясно изразени. По цялата си ростокаудална дължина, каудалното спинално тригеминално подядро е оградено латерално от каудалната част на *tractus spinalis nervi trigemini*. Дорзално от спиналното тригеминално подядро се разполага *fasciculus cuneatus*. Медиално и вентромедиално от него се намира дорзалното подядро

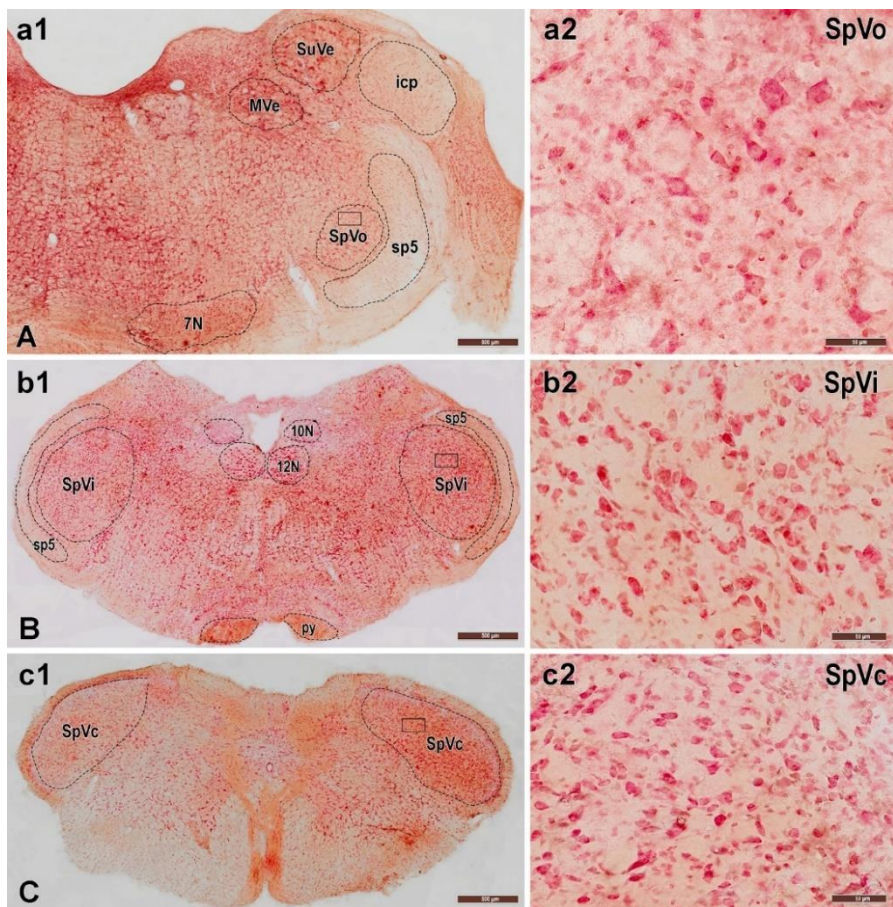
на централното ретикуларното ядро на продълговатия мозък, означавано като дорзално ретикуларно ядро на Paxinos и Huang (Mai and Paxinos, 2012). То, заедно с асцендентните спинални пътища, бележат вентралната граница на спиналното тригеминално подядро. На прехода към гръбначния мозък, спиналното тригеминално подядро образува подобен на буца връх и се продължава медиално в *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 подядро, 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. 4.1-4.3b2). 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. 4.2b2). 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), които притежават елиптични перикариони и показват силна, дифузна цитоплазмена базофилия (фиг. 4.1b2, 4.2b2). Такива големи неврони обикновено тук 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 rostrocaudalno протежение, интерполарното тригеминално подядро граничи латерално с *tractus spinalis nervi trigemini*. В каудална посока *nucleus solitarius* се придвижва медиално и в долните участъци за граница на подядрото служи *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 сравнително малко невронни перикариони по цялата медиална граница, тъй като тази област се пресича от многобройни видими снопове влакна (фиг. 4.2a1, 4.2a2).

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. 4.1a1). Ядрата им са сравнително големи и са заобиколени от тънък цитоплазмен участък, който е слабо оцветен (фиг. 4.1-4.3a2). Средните по размер неврони са с овални или фузиформени профили. Последните могат



Фигура 4.3. 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).

да достигнат диаметър на клетъчното тяло от 20 μm (фиг. 4.3a2). Невроните притежават дифузно базофилна цитоплазма (фиг. 4.2a2). 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*.

4.1.2 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. 4.4, 4.5).

4.1.2.1 Ладиевидни неврони

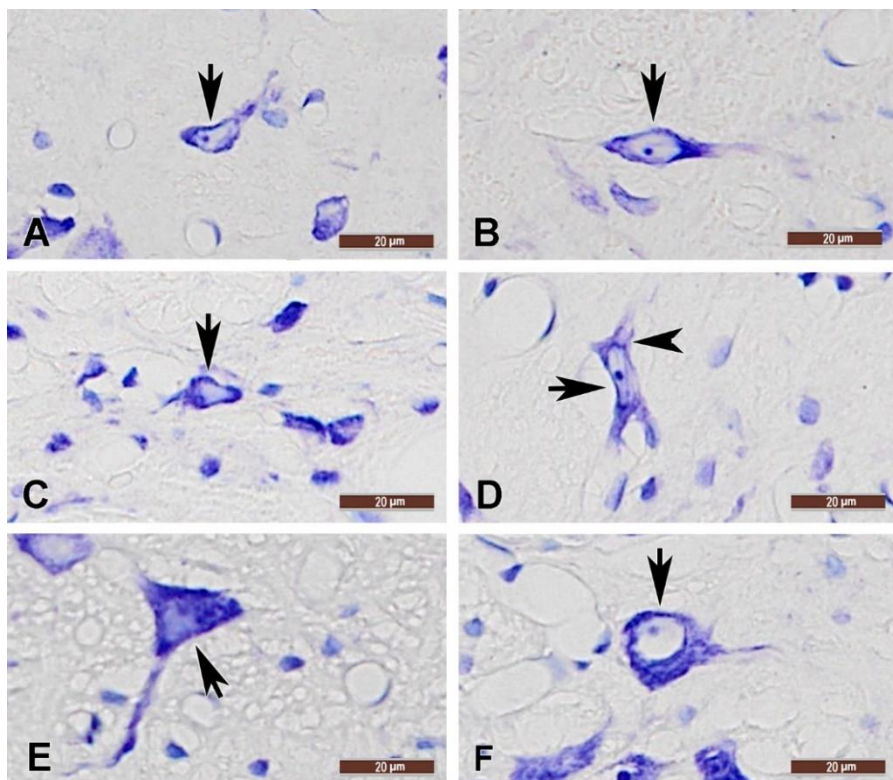
Проучването ни върху морфологичните характеристики на невроните в спиналното тригеминално ядро установи уникален фенотип на невроните, който се характеризира с необичайни по форма клетъчни тела, наподобяващи лодка (фиг. 4.4A). Наблюдавани под светлинен микроскоп, перикарионите на тези неврони приличат на лодки; те имат широка, издължена форма и гладка повърхностна структура. Морфометричното измерване на клетъчните размери установи, че техните перикариони 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.

4.1.2.2 Удължени неврони

Друг морфологичен тип неврони с уникални анатомични черти е характерен за средните по размер неврони в спиналното тригеминално ядро. Тази популация спинални тригеминални неврони се характеризира с фузиформени или удължени клетъчни тела (фиг. 4.4B), с вариращи по размер перикариони в диапазона от 14 до 21 μm и със среден диаметър $15 \mu\text{m} \pm 2.1$ ($n = 24$).

4.1.2.3 Лобулирани неврони

Нашето изследване разкри и наличие на друга популация от спинални тригеминални неврони с лобулирани клетъчни тела и неравномерни повърхостни изпъкналости или вдлъбнатини (фиг. 4.4C). 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 .



Фигура 4.4. Морфологични видове неврони в спиналното тригеминално ядро, оцветени с толуидиново синьо за визуализиране на клетъчните им тела. (А) Неврон с латерално тяло (стрелка); (В) Неврон с биполярен профил и удължено клетъчно тяло (стрелка); (С) Неврон с лобулирано клетъчно тяло (стрелка); (D) Неврон с дилатация (глава на стрелка) в началото на един от неговите израстъци; (Е) Неврон с характерна пирамидна форма на перикариона; (F) Типичен представител на невроните с овална форма на клетъчното тяло (стрелка). Мащабна скала = 20 µm.

4.1.2.4 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. 4.4D). Перикарионите на невроните с дилатации се различават

значително един от друг с оглед на техните размери и форма. Тази структурна хетерогенност представлява съществена отличителна черта в морфологията на този тип неврони вътре в спиналното тригеминално ядро.

4.1.2.5 Пирамидни неврони

Някои от невроните в спиналното тригеминално ядро притежават характерна триъгълна сома (фиг. 4.4E). При детайлното им разглеждане ние установихме, че тази популация от спинални тригеминални 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 с това специфично оцветяване.

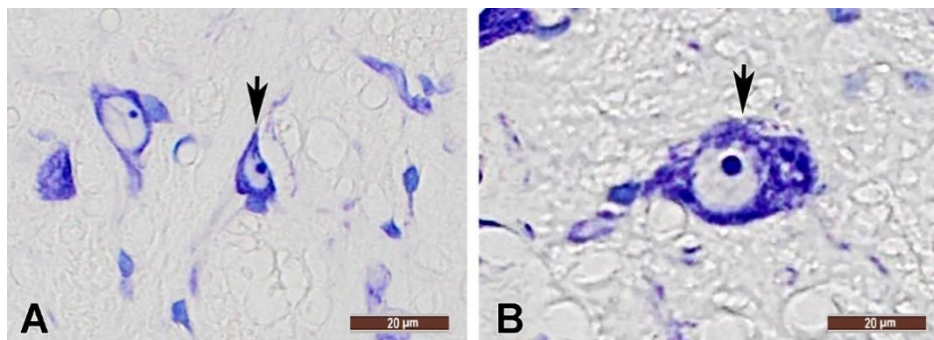
4.1.2.6 Овални (зърнести) неврони

В хода на проучването беше идентифицирана и една група от неврони в спиналното тригеминално ядро, притежаващи овални или сферични клетъчни тела (фиг. 4.4F). 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 група 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.

4.1.2.7 Полиморфни (мултиморфни) неврони

В спиналното тригеминално ядро наблюдавахме спорадично наличие и на отделна популация от много големи неврони (фиг. 4.5). 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. 4.5А, В).



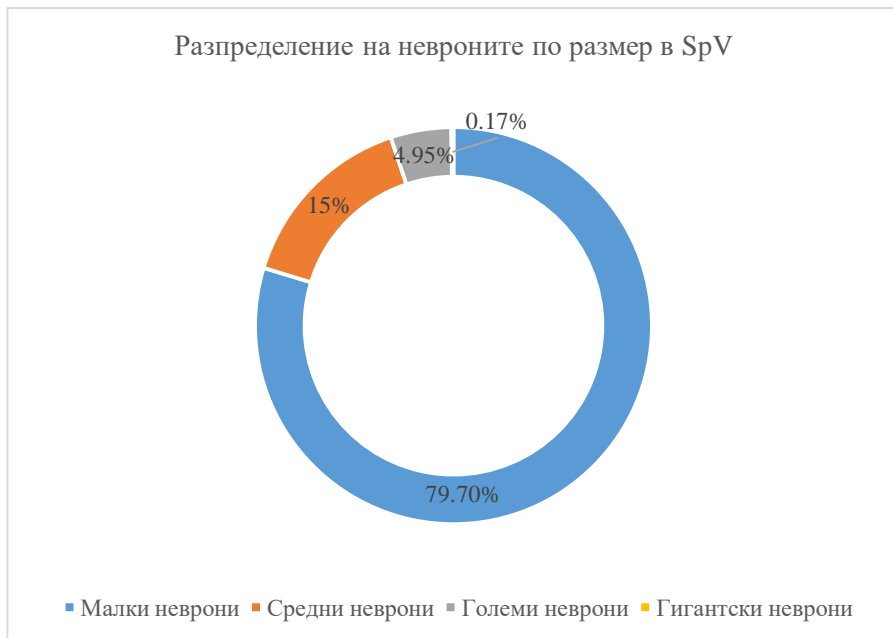
Фигура 4.5. Неврони с голям размер на перикарионите. Наблюдава се видимо разнообразие в соматичната морфология с различни профили на клетъчните тела, описани с крушовидни (А) и овални форми (В). Мащабна скала = 20 µm.

4.1.3 Морфометричен анализ на невроните в спиналното тригеминално ядро

Проведеният от нас морфометричен анализ с програмата Fijii идентифицира три различни подгрупи неврони в рамките на спиналното тригеминално ядро, разпределени въз основа на размерите на техните клетъчни тела, както е показано на фигура 4.6. 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. 4.6). 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.

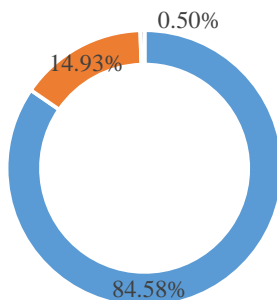
По-нататъшният анализ разкри различни разпределения на размерите на невроните в отделните подядра на спиналното тригеминално ядро. По-конкретно, в каудалното спинално тригеминално подядро (SpVc) малките клетки са голямата част от невроните (почти 85%), средните неврони са представени като 14.93%, следвани 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 4.6. Процентно разпределение на различните по размер неврони в спиналното тригеминално ядро.

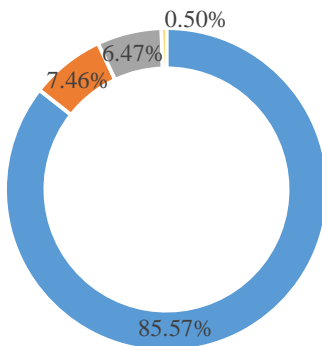
Разпределение на невроните по размер в SpVc



■ Малки неврони ■ Средни неврони ■ Големи неврони

Фигура 4.7. Процентно разпределение на различните по размер неврони в спиналното тригеминално ядро.

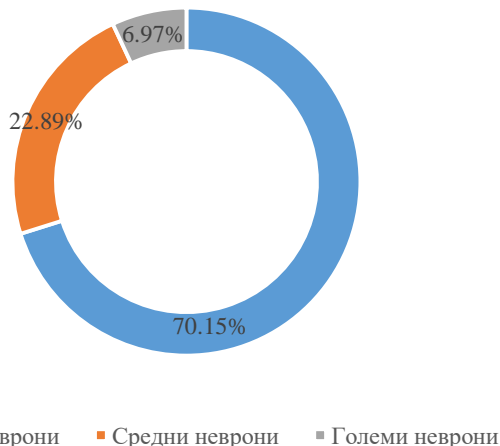
Разпределение на невроните по размер в SpVi



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

Фигура 4.8. Процентно разпределение на различните по размер неврони в спиналното тригеминално ядро.

Разпределение на невроните по размер в SpVo



Фигура 4.9. Процентно разпределение на различните по размер неврони в спиналното тригеминално ядро.

4.2 Неврохимична характеристика на спиналното тригеминално ядро

4.2.1 Невротрансмитери и невропептиди в спиналното тригеминално ядро

4.2.1.1 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 спиналното тригеминално ядро. 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. 4.10). По-голямата част от имунопозитивните неврони са малки по размер, което би могло да означава, че точно дефинирана клетъчна субпопулация в спиналното тригеминално ядро участва в инхибиторната GABAergic 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.

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

интензитета на оцветяване за GABA в трите части на ядрото. 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, 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 ($**p < 0.0096$) и между GABA-SpVo и GABA-SpVc подядро на спиналното тригеминално 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 оралното подядро. Между интерполарното и каудалното подядро се наблюдават също статистически значими различия ($*p < 0.024$).

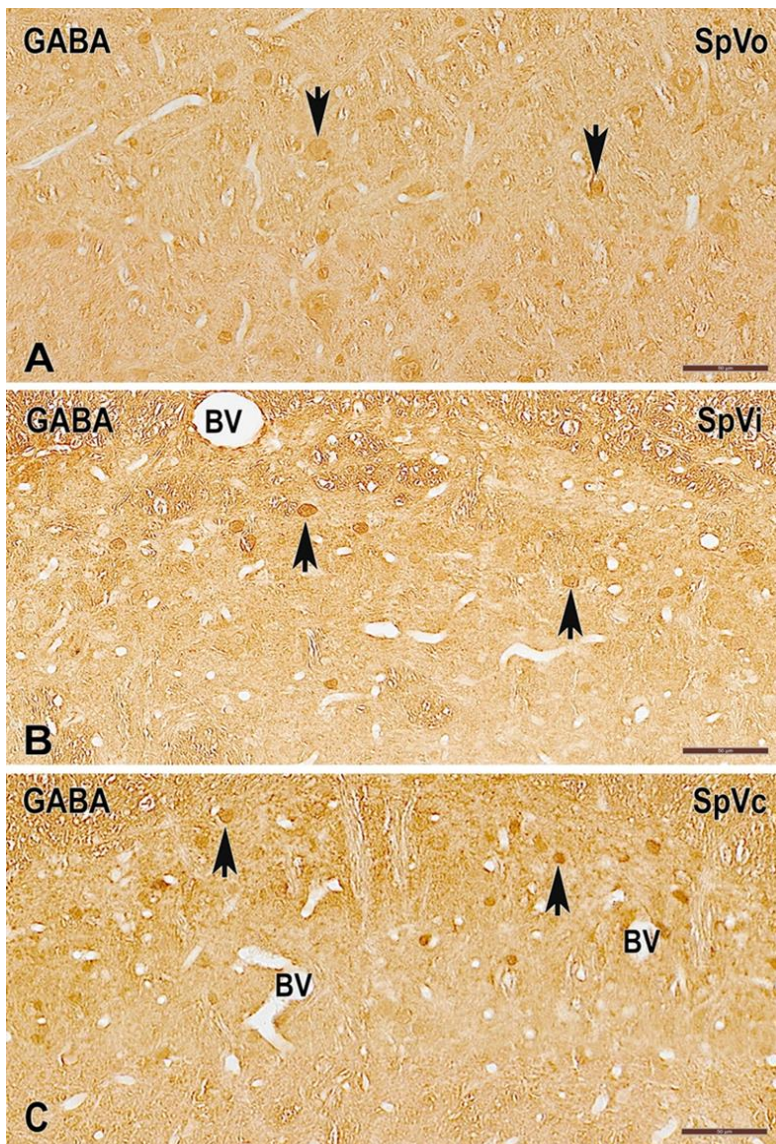
4.2.1.2 Ацетилхолин

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

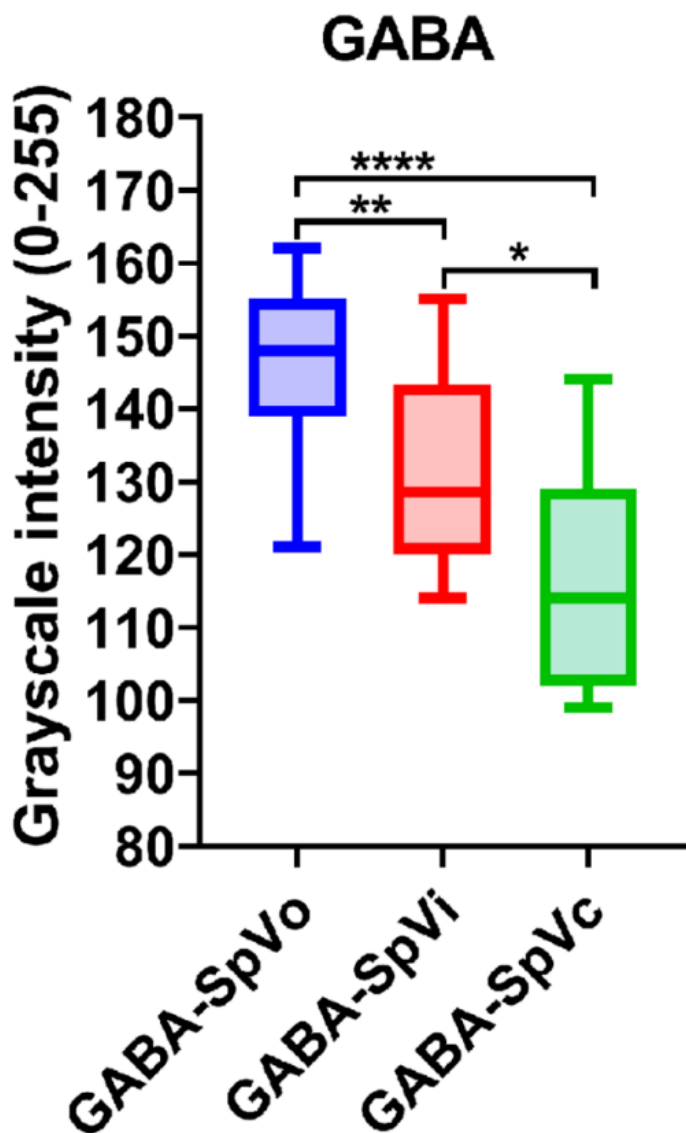
Светлинномикроскопското обследване на имунооцветените срезове показва, че многобройни нервни влакна в спиналното тригеминално ядро на плъх съдържат AChE. AChE-имунореактивните влакна бяха групирани в гъсти снопчета, които преминават по цялата дължина на ядрото (фиг. 4.12). Интересна находка бе установяването на част от тези имунобелязани нервни снопчета в непосредствена близост с кръвоносни съдове в ядрото, което подсказва възможна функционална свързаност между AChE-съдържащите нервни влакна и съдовите компоненти в спиналното тригеминално ядро.

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-деградиращият ензим е широко ангажиран в контрола на нервната активност в различни популации от спинални тригеминални неврони.

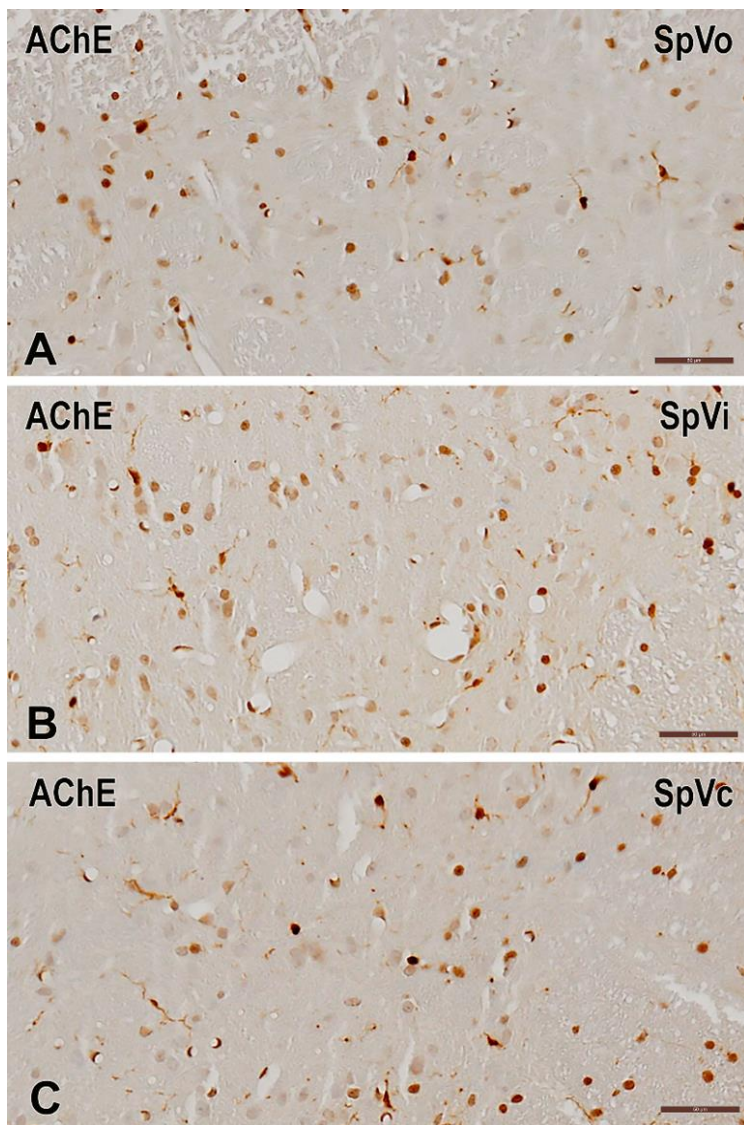
Топографското разпределение на AChE-имунопозитивните неврони в каудалните, интерполарните и оралните подразделения на спиналното тригеминално ядро беше също основна задача на нашето изследване (фиг. 5.12). Неизменното идентифициране на AChE-имунореактивни невронални клетъчни тела във всяко подядро подчертава широкото присъствие на ацетилхолин в спиналното тригеминално ядро, 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.



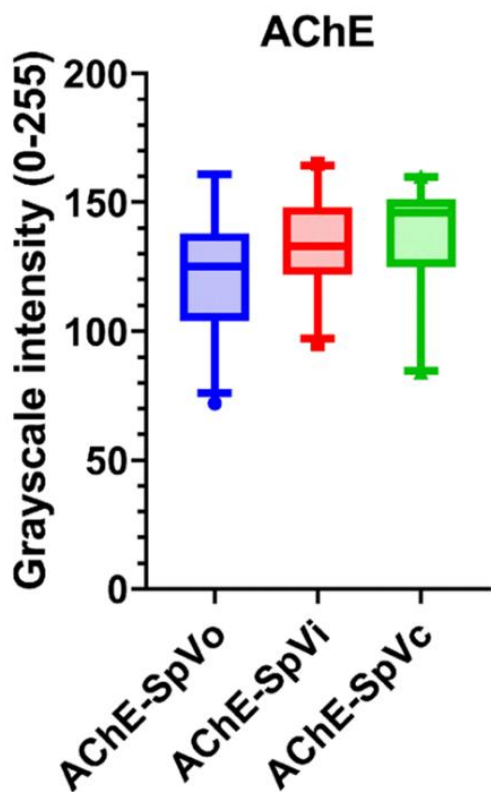
Фигура 4.10. Имунохистохимична реакция за гама-аминомаслената киселина (GABA) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Малки по размер имунореактивни неврони са показани със стрелки. BV, кръвоносни съдове. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.11. Бокс плот диаграми, представящи интензитета на имуноцветяване за GABA в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.



Фигура 4.12: 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 µm.



Фигура 4.13. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за AChE в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

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. 4.13). 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) подядро 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). Освен това, не бяха наблюдавани статистически значими различия в интензитета на оцветяване между каудалните и интерполарните подядра ($p > 0.9999$).

4.2.1.3 Серотонин (5-хидрокситриптамин)

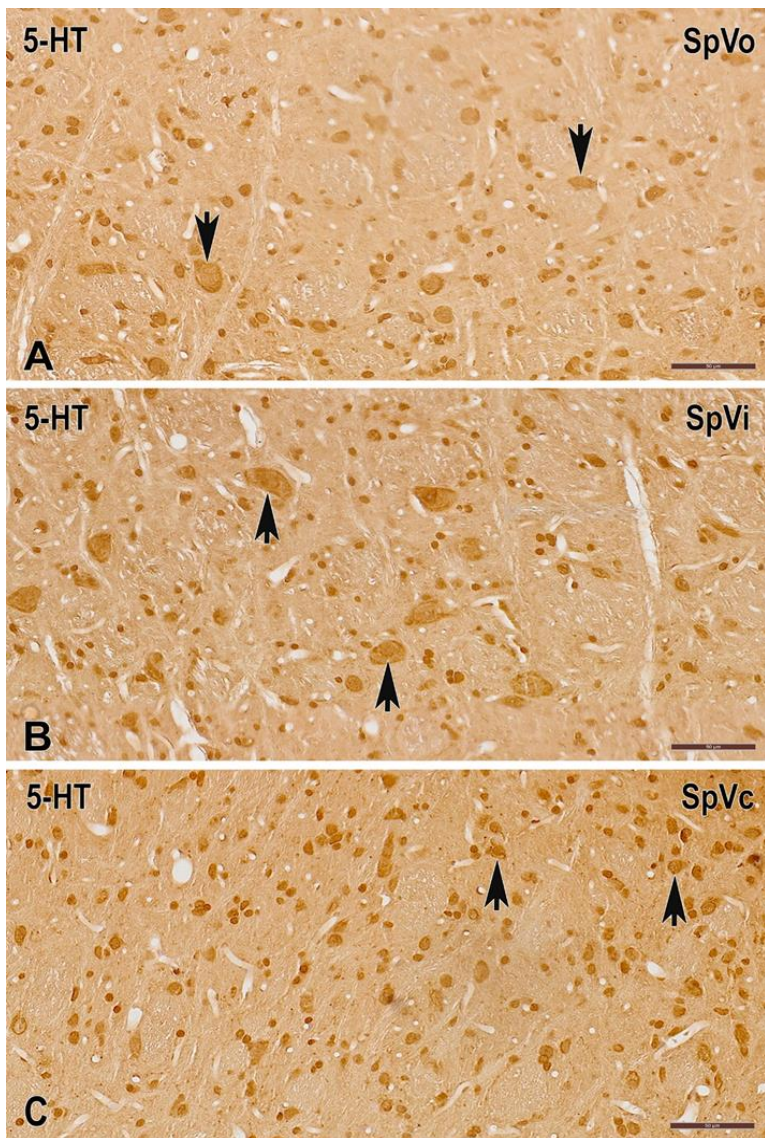
С помощта на светлинномикроскопски имунохистохимични методи ние успяхме да демонстрираме експресия на серотонин (5-НТ) във всички подядра на спиналното тригеминално ядро. Детайлното разглеждане под микроскоп на имунооцветените срезове на нивото на спиналното тригеминално ядро разкри подчертана и дифузна експресия на серотонин в много перикариони на неврони в ядрото. Практически всеки

имунобелязан неврон в спиналното тригеминално ядро, независимо от размера на своя перикарион, показва сходен модел и интензитет на имунооцветяване.

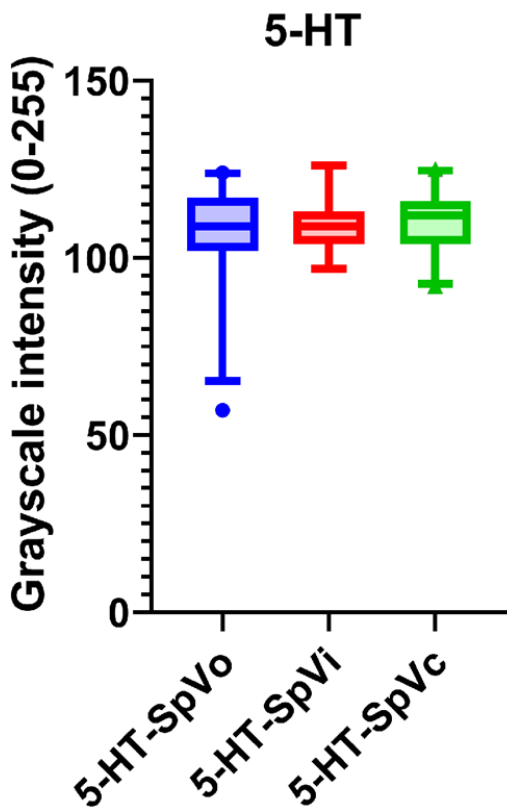
Характеризирахме също така локализацията и пространствената организация на серотонин-съдържащите клетки в каудалния, интерполарния и оралния подраздел на спиналното тригеминално ядро. По-конкретно, серотонин-имунореактивни клетки бяха наблюдавани във всяко подядро по цялата росто-каудална ос на спиналното тригеминално ядро, което подсказва възможна 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.

Тестът на *Kruskal-Wallis* беше приложен за сравняване на интензивността на имунооцветяване за 5-НТ в трите различни подядра на спиналното тригеминално ядро (фиг. 4.15). 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 отделните подядра, 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 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.



Фигура 4.14. Експресия на серотонин (5-HT) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Имунореактивни неврони с различни размери и варираща форма са показани със стрелки. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.15: Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за 5-HT в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

подядро спрямо останалите (фиг. 4.16C). Също така, изглежда, че малките по размер спинални тригеминални неврони показват по-силна имунореакция спрямо онези с по-големи размери.

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 една от

4.2.1.4 Субстанция P

За да изследваме наличието и разпределението на субстанция P-имунореактивност в отделните анатомичните дялове на спиналното тригеминално ядро, в настоящото проучване сме използвали индиректни имунохистохимични техники с антияло срещу този ундекапептид. Резултатите показаха, че субстанция P беше силно експресирана по цялото протежение на спиналното тригеминално ядро, включително в трите му различни подядра (каудално, интерполарно и орално) (фиг. 4.16).

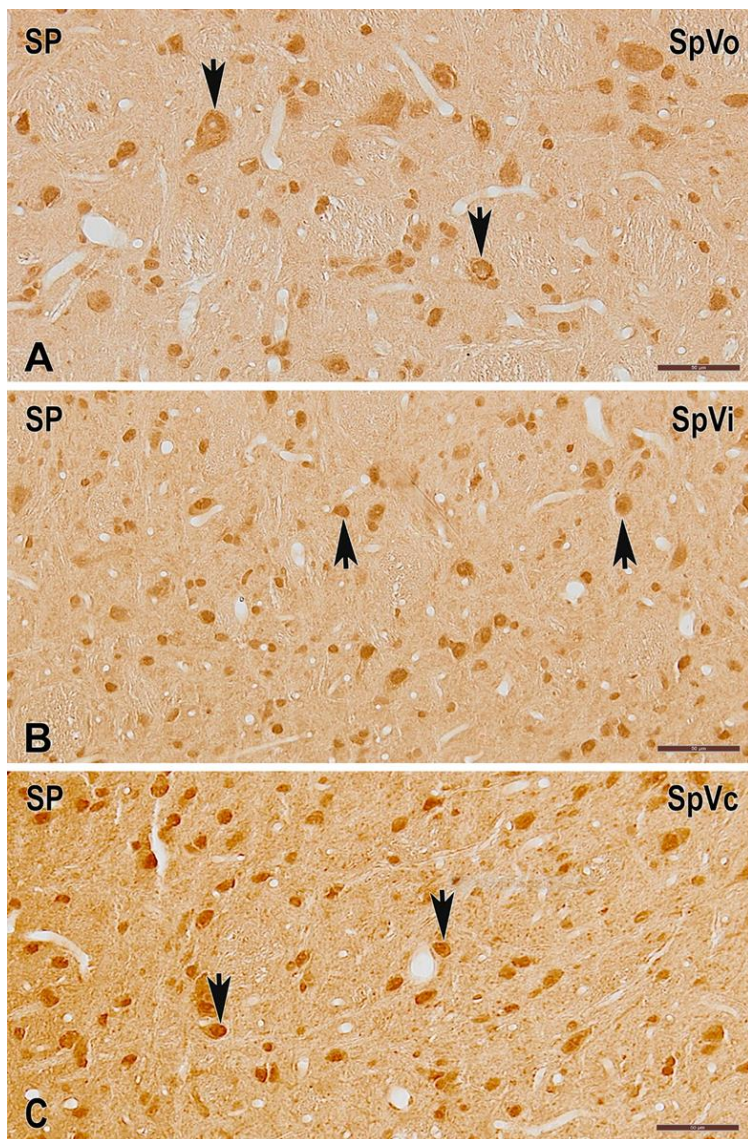
Светлинномикроскопската имунохистохимия демонстрира несъмнено наличие на субстанция P-имунопозитивни неврони в спиналното тригеминално ядро, с вариращи размери на техните перикариони. Нещо повече, отчетливо се наблюдават имунореактивни клетъчни тела на спинални тригеминални неврони по цялото протежение и на трите подядра. Прави впечатление, че реакцията е по-интензивна в каудалното

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 ($p < 0.0001$, 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. 4.17).

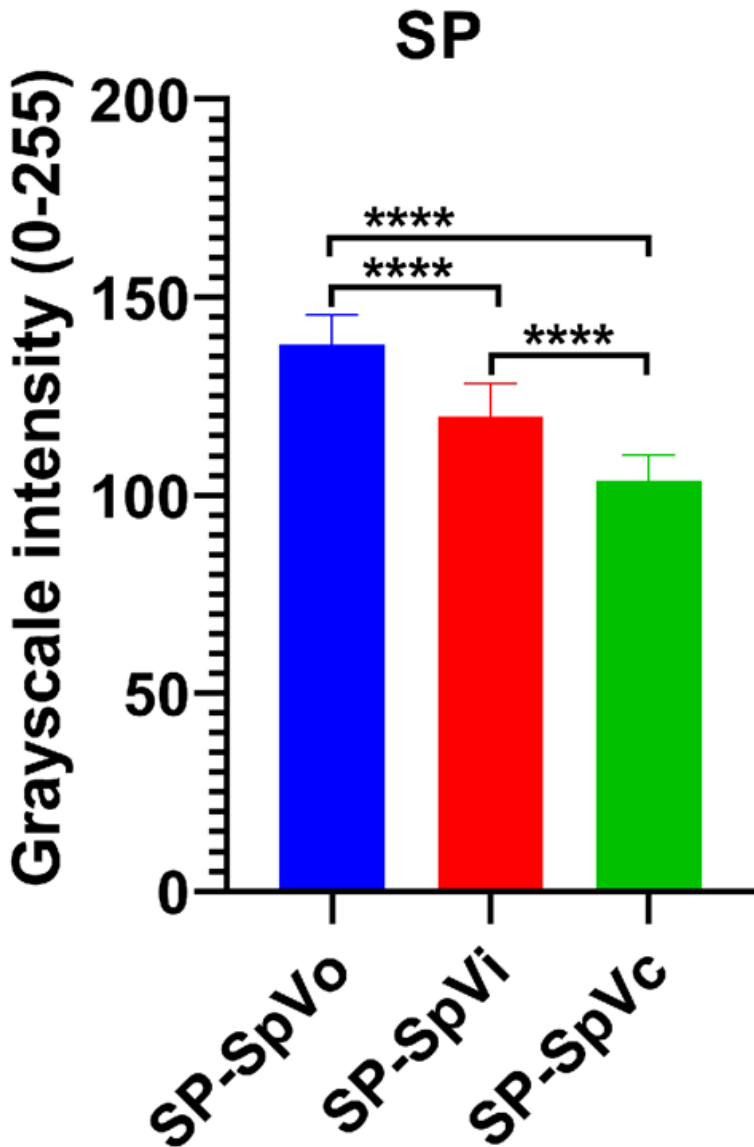
4.2.1.5 Калцитонин ген-свързан пептид

Проучването на моделите на експресия на CGRP предостави важна нова информация за неврохимичния състав на спиналното тригеминално ядро. 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. 4.18).

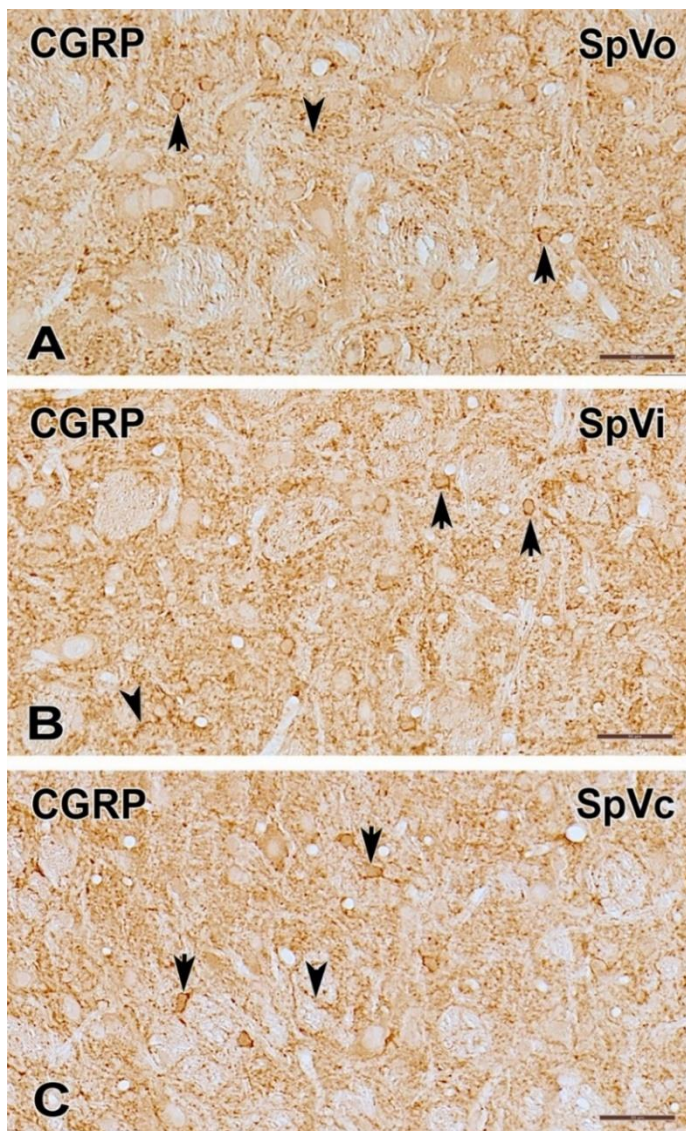
Освен разпознаваема експресия в невроналните тела, нашето проучване разкри наличие и на имунопозитивни нервни влакна. Много нервни влакна в подядрата се оказват CGRP-имунопозитивни. Наблюдавахме също някои неврони да са имунопозитивни за този пептид. Тези неврони са овални по форма и спадат към клетки 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 спиналното тригеминално ядро.



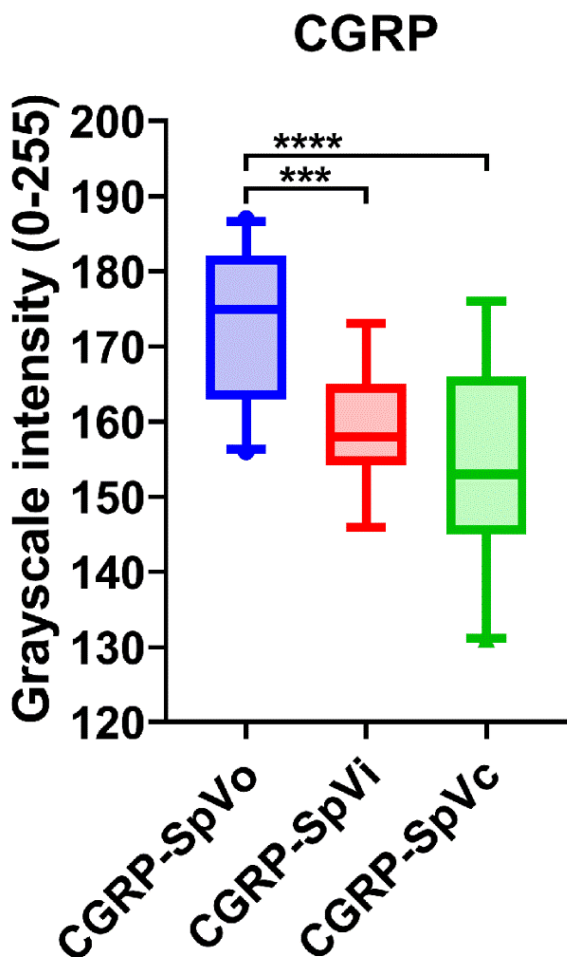
Фигура 4.16. Експресия на субстанция P (SP) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Имунореактивни неврони с различни размери и вариации по форма перикариони са показани със стрелки. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.17. Стълбчеста диаграма, представяща интензитета на оцветяване за субстанция Р (SP) в трите подядра на спиналното тригеминално ядро.



Фигура 4.18. 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 4.19. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за CGRP в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро.

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. 4.19). Интензитетът на оцветяване в интерполарното и каудалното подядро не показва статистически значими различия ($p = 0.9373$).

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 множествово 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

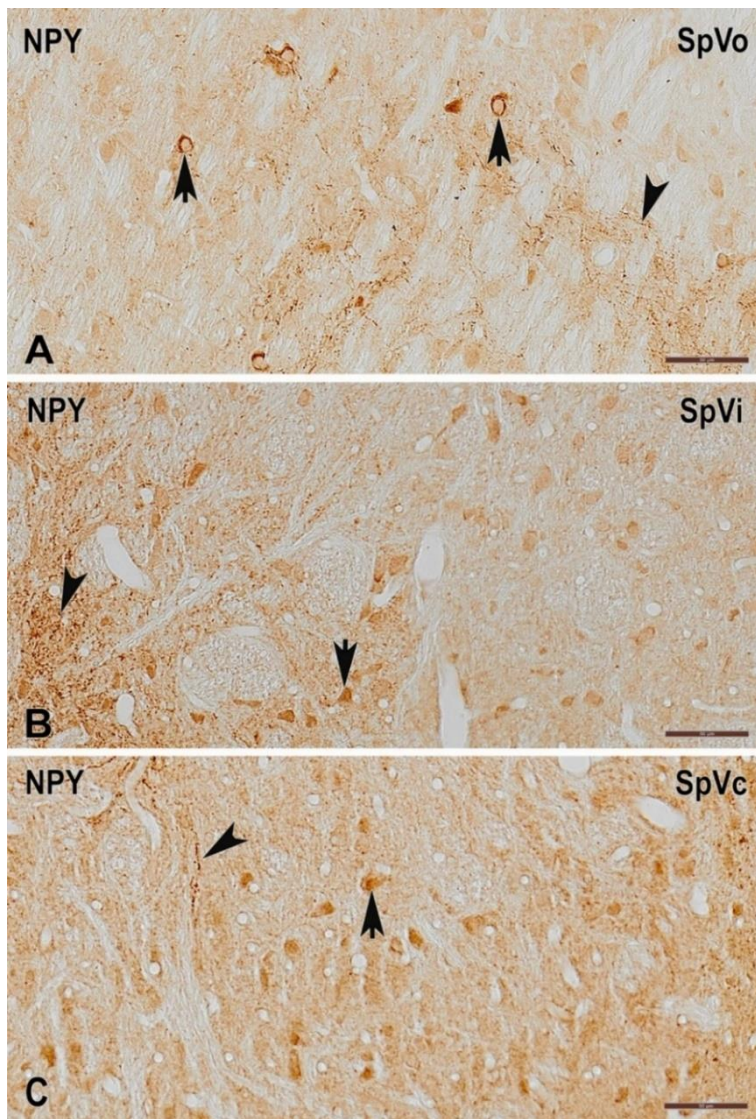
4.2.1.6 Невропептид Y

Светлинномикроскопското изследване на имунооцветените срезове предостави ценна информация, и за наличието и разпределението на невропептид Y (NPY) в структурните компоненти на спиналното тригеминално ядро на плъхове. Нашите резултати потвърждават, че неврони и в трите подядра съдържат NPY (фиг. 4.20).

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 спиналното тригеминално ядро, 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 това ядро, като показва селективно ангажиране на NPY в определени популации от спинални тригеминални неврони.

Топографското разпределение на експресията на NPY по росто-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.

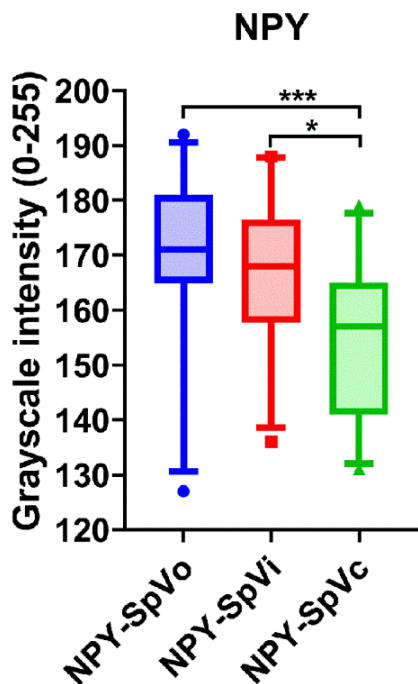
За да сравним интензивността на оцветяването за NPY в трите части на спиналното тригеминално ядро, използвахме непараметричния тест на *Kruskal-Wallis*. В трите тествани подядра на спиналното тригеминално ядро – оралното подядро (NPY-SpVo) (Mdn = 171), интерполарното подядро (NPY-SpVi) (Mdn = 168) и 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 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. 4.21).



Фигура 4.20. Имунохистохимично оцветяване за невропептид Y (NPY) в (A) оралното (SpVo), (B) интерполарното (SpVi) и (C) каудалното (SpVc) подядро на спиналното тригеминално ядро. Наблюдават се множество имунопозитивни за NPY перикариони (стрелка) и нервни влакна (връх на стрелка). Мащабна скала = 50 μ m.

4.2.2. Газови невромодулатори

4.2.2.1 Азотен оксид



ядрото, като по този начин свързва nNOS с Фигура 4.21. Бокс-плот диаграми графично представящи интензитета на оцветяване за NPY в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

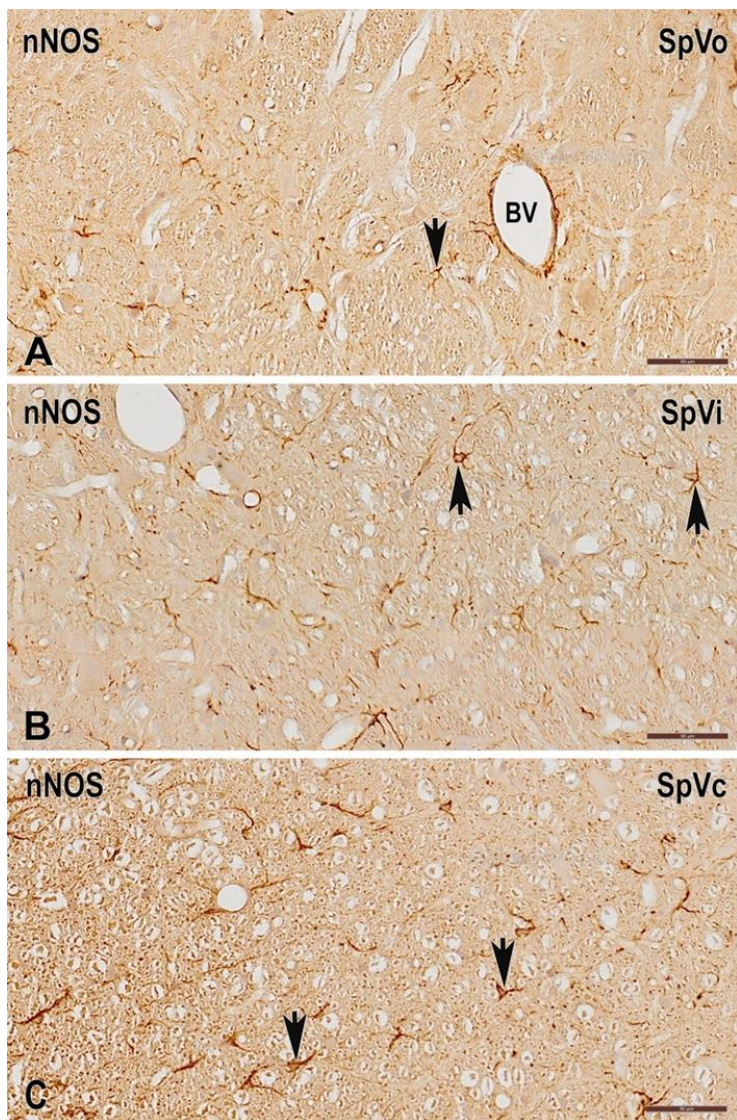
реакция. Голяма част от кръвоносните съдове са обгърнати от имунопозитивни клетки и техните израстъци за nNOS.

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 спиналното тригеминално ядро. Разпределението на реакцията за това невроактивно 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.

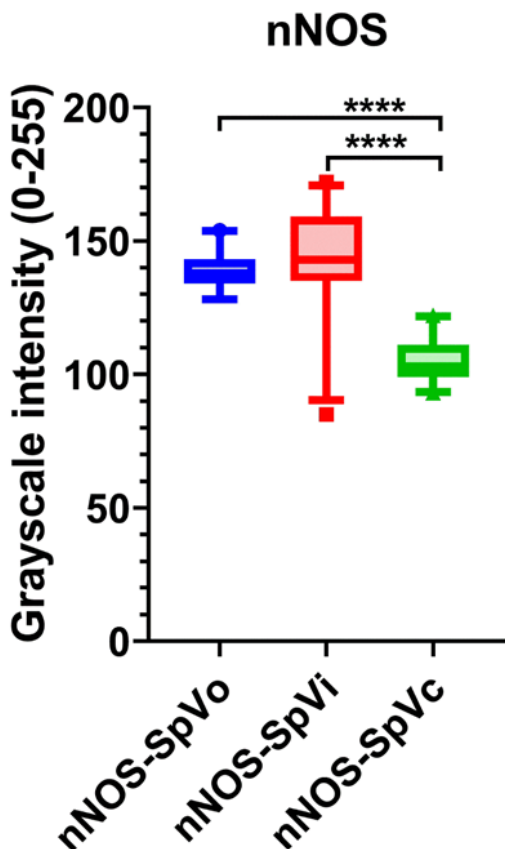
За да разкрием наличието на тази газообразна молекула в спиналното тригеминално ядро на плъх, ние демонстрирахме чрез имунохистохимични методи експресията на невроналната изоформа на синтезиращия ензим, азотен оксид синтаза (nNOS) в ядрото.

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. 4.22).

Установените от нас nNOS-имунореактивни нервни влакна бяха видени да пресичат спиналното тригеминално ядро. Гореспоменатата находка подчертава съществуването на ензима в невронните вериги, отговорни за предаването на сензорни данни през 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



Фигура 4.22. 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 4.23. Бокс-плот диаграми, графично представящи интензитета на оцветяване за nNOS в оралното (SpVo), интерполарното (SpVi) и каудалното (SpVc) подядро на SpV.

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. 4.23). 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.

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 медiana 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 множествово сравнение на *Dunn*, за да изясним допълнително специфичните разлики в експресията на nNOS между

4.2.3. 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 сигнализацията чрез нискоафинитетния (пан) невротрофен рецептор p75NTR, както и чрез високоафинитетните трансмембранни 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.

4.2.3.1 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. 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. 4.24).

В каудалното подядро имунореактивността на NGF се проявява като специфично оцветяване, локализирано предимно в невронните клетъчни тела. Имунопозитивност с висок интензитет 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 структурен дял на спиналното тригеминално ядро.

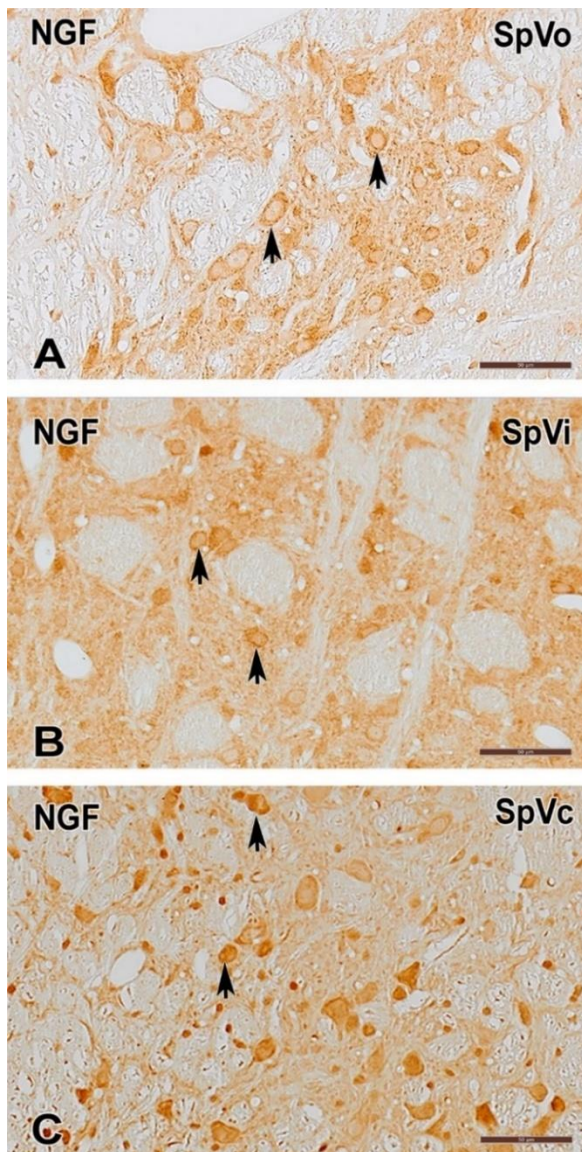
4.2.3.2 Мозъчен невротрофен фактор (BDNF)

В рамките на трите подядра на спиналното тригеминално ядро, BDNF показва характерни модели на имунореактивност. Пространственото разпределение и нивата на експресия на BDNF в анатомичните подразделения на ядрото са ясно демонстрирани в нашите имунохистохимични изследвания (фиг. 4.25).

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 4.24. Експресия на NGF в клетъчните невронални тела (стрелка) в оралното (SpVo) (A), интерполарното (SpVi) (B) и каудалното (SpVc) (C) подядро на спиналното тригеминално ядро. Мащабна скала = 50 μ m.

4.2.3.3 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 спиналното тригеминално ядро 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. 4.26).

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. 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 спиналното тригеминално ядро.

4.2.3.4.2.3.4 Глиален невротрофен фактор

Сред членовете на суперсемейството на трансформиращия растежен фактор- β , глиалият 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, 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. 4.27).

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 спинални тригеминални 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. Установените GDNF-

имуноположителни нервни влакна на субнуклеарния домейн демонстрират възможната ролята на този невротрофин в регулирането на синаптичната връзка и пластичността.

4.2.3.4.2.3.5 Тропомиозин рецепторна киназа-А

Високоафинитетният рецептор за NGF тропомиозин рецепторната киназа А (TrkA), е от съществено значение за модулиране на невронната преживяемост, диференциация и синаптична пластичност в ЦНС и ПНС. Спиналното тригеминално ядро 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, което проявява подчертано оцветяване в невронните перикариони (фиг. 4.28).

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 спиналните тригеминални неврони, 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 високи, отколкото в SpVc и SpVi. И в трите подядра се забелязва, че голяма част от нервните влакна, които прекосяват спиналното тригеминално ядро, остават имунонегативни за TrkA.

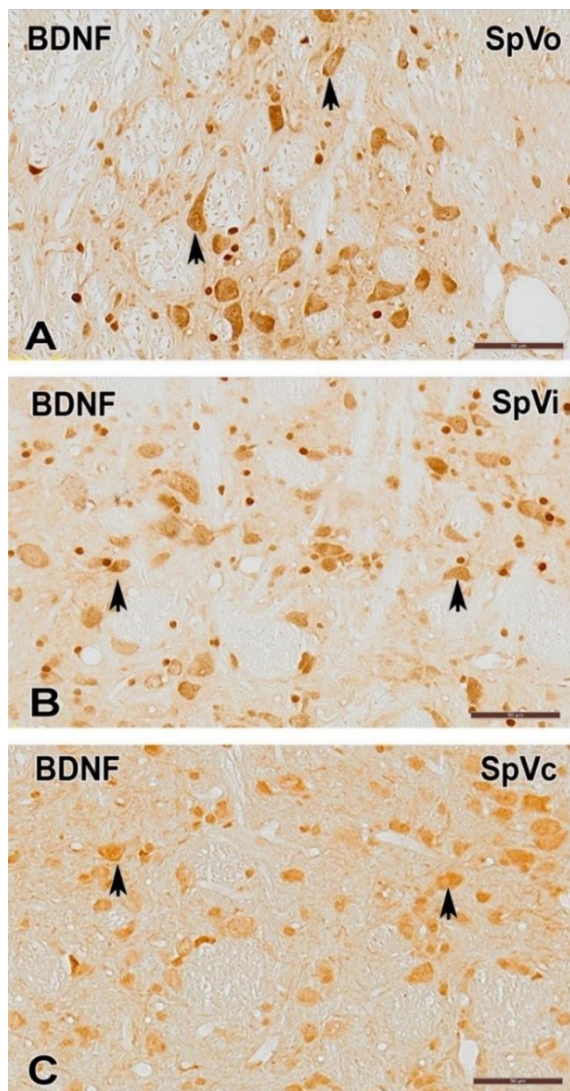
4.2.3.4.2.3.6 Тропомиозин рецепторна киназа-В

С помощта на светлинномикроскопска имунохистохимия е установена експресията на TrkB в структурните подразделения на спиналното тригеминално ядро. Резултатите показват, че трите подядра на спиналното тригеминално ядро изиявяват различни модели на разпределение на TrkB имунореактивност (фиг. 4.29).

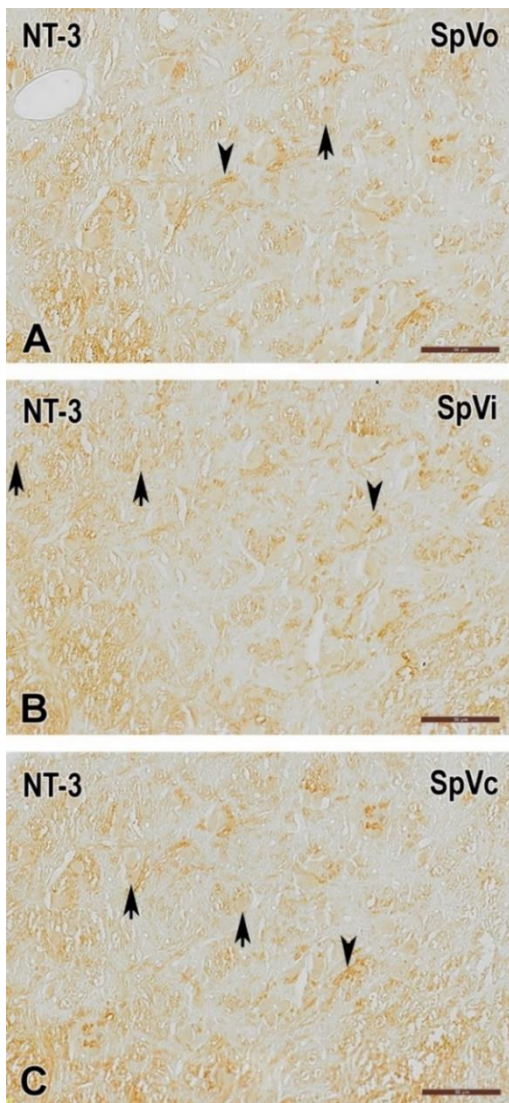
Имунореактивността към TrkB е широко разпространена в каудалното подядро, където тя е силно интензивна в клетъчните тела на спиналните тригеминални неврони. Интересно е обаче, че имунопозитивните клетъчни тела са спорадични в това подядро и те са с различни размери. Силната експресия на TrkB подсказва, че този рецептор играе роля в медирането на сигналните пътища на BDNF, което, от своя страна, повлиява 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 спинални тригеминални неврони.

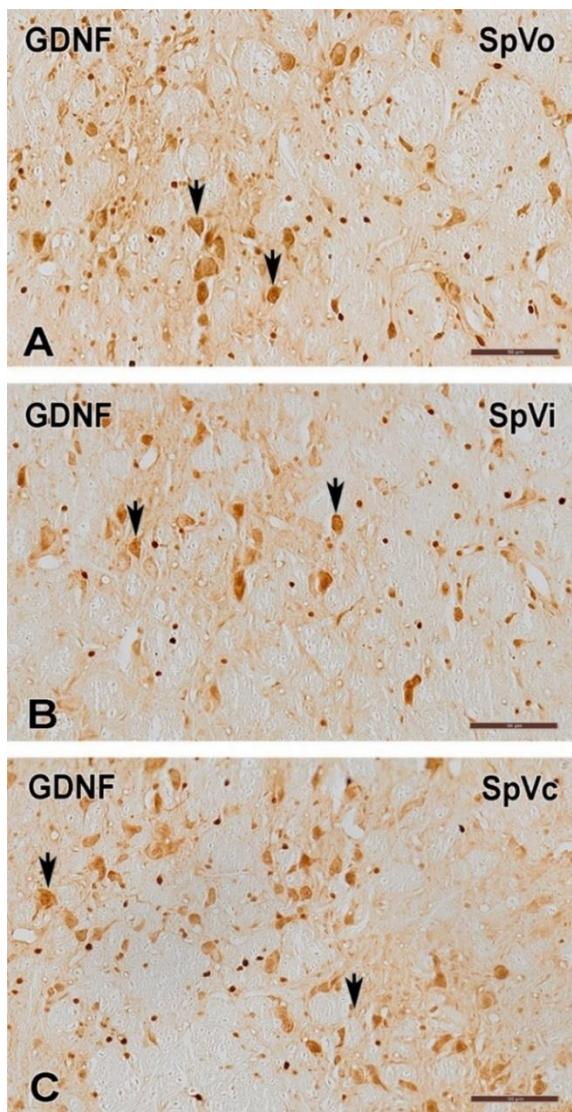
Имунореактивността на TrkB в оралното подядро разкрива характерен профил на експресия с умерен интензитет на оцветяване, който е концентриран предимно в невронните перикариони на малки по размер клетки. Прави впечатление, че нивата на експресия на TrkB в SpVo не са толкова високи, колкото в SpVc и SpVi.



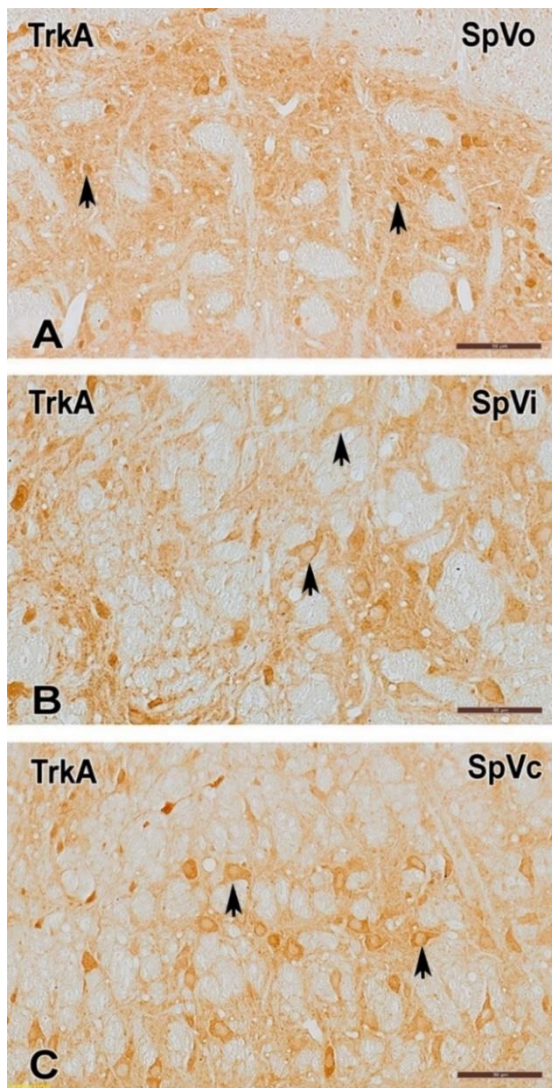
Фигура 4.25. Имуностохимична експресия на BDNF в проксималните дендритни израстъци и перикарионите на невроните (стрелки) в оралното (SpVo) (A), интерполарното (SpVi) (B) и каудалното (SpVc) (C) подядро на спиналното тригеминално ядро. Със стрелки са обозначени имунореактивните неврони в трите подядра. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.26. Имунохистохимична локализация на NT-3 в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на спиналното тригеминално ядро. С връх на стрелка са обозначени NT-3-имунопозитивни влакна, а със стрелка са посочени перикариони със слаба имунореакция. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.27. Имунохистохимична локализация на GDNF в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на спиналното тригеминално ядро. 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 μ m.



Фигура 4.28. Имунохистохимична локализация на TrkA в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на спиналното тригеминално ядро. Със стрелки са отбелязани телата на спиналните тригеминални неврони с положителна имунохистохимична реакция. Перикарионите попадат в групата на неврони със среден и голям размер. Мащабна скала = 50 μ m.

4.2.3.7

4.2.3.7 Тропомиозин рецепторна киназа-C

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 в ядрото (фиг. 4.30).

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 спиналните тригеминални неврони. TrkC-имуноположителните нервни влакна, преминаващи през интерполарното подядро, показват как тази анатомична област регулира синаптичното предаване и пластичността.

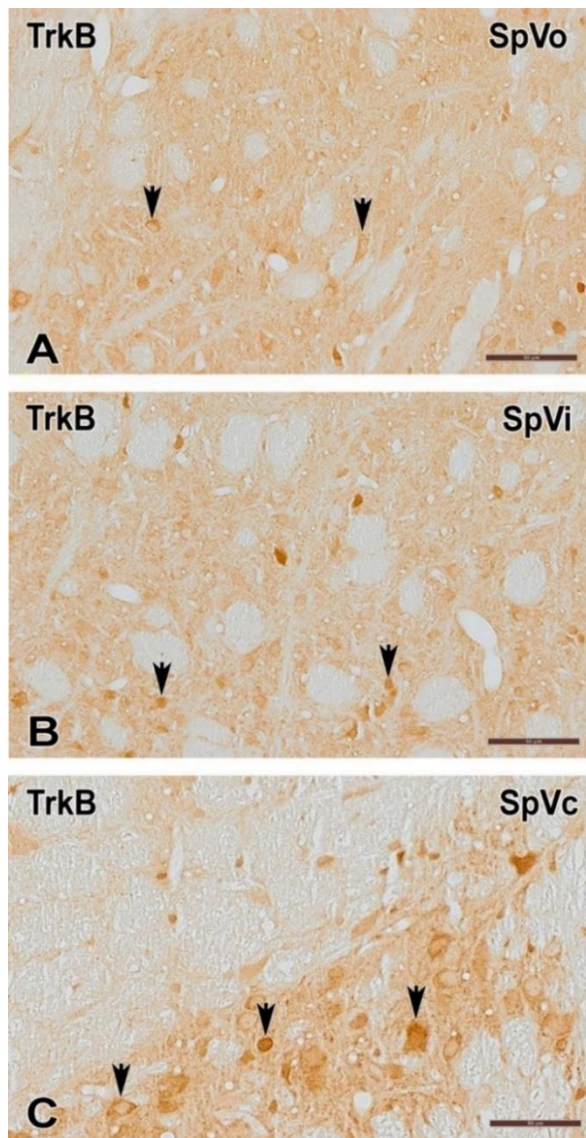
Имунореактивността на TrkC в оралното подядро разкрива профил на експресия със умерено до слаб интензитет на оцветяване, който е концентриран предимно в нервните израстъци. Нивата на експресия на TrkC в SpVo качествено не показват различия, каквито са установени в SpVc и SpVi.

Приликите между експресията на TrkC в трите подядра са представени от наличието само на нервни влакна, които са положителни за реакцията, докато телата на спиналните тригеминални неврони остават негативни.

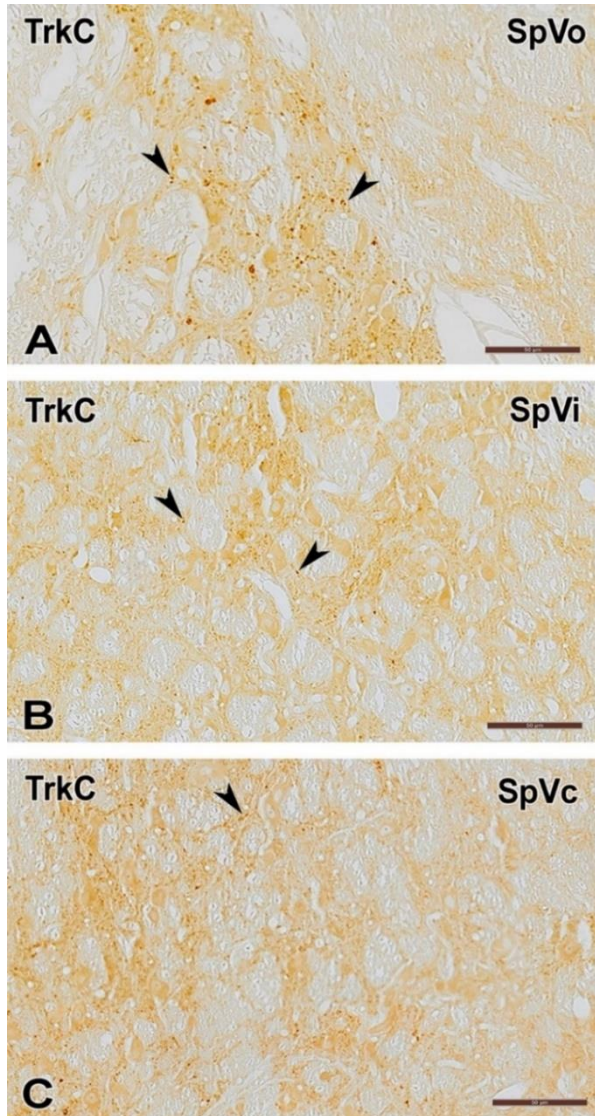
4.2.3.8.4.2.3.8 Глиален рецептор $\alpha 1$

Експресията на глиалния рецептор $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$) в спиналното тригеминално ядро може да се разкрие с помощта на светлинномикроскопска имунохистохимия, която позволява демонстриране на неговото разпределение и възможни функционални ефекти във всяко от трите подядра. Прави впечатление, че имунореактивните спинални тригеминални неврони са с различни размери и форма (фиг. 4.31).

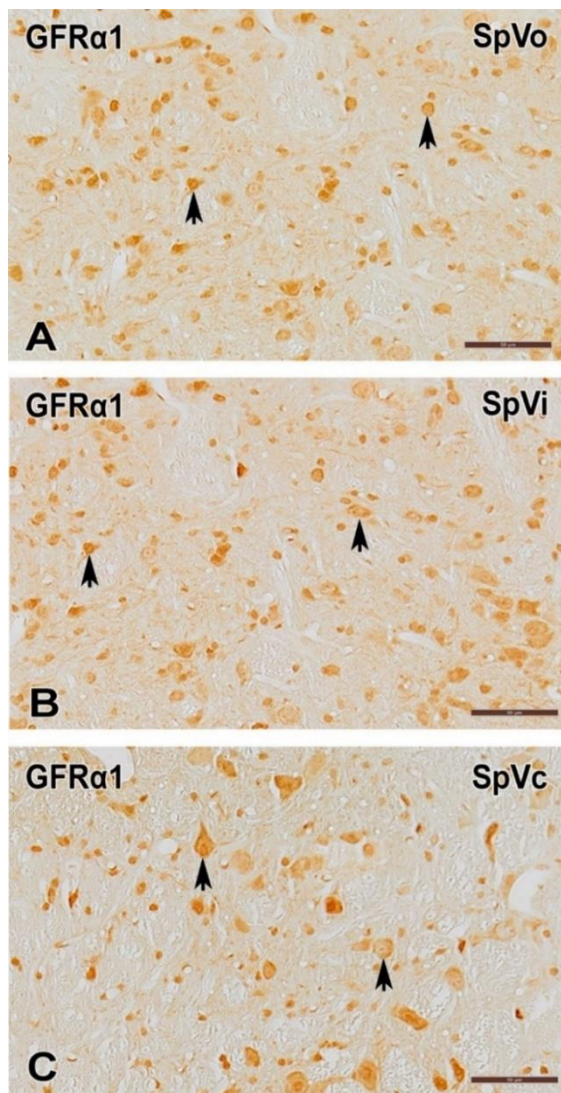
Имунореактивността на GFR $\alpha 1$ показва разпознаваем модел на експресия в каудалното сетивно тригеминално подядро, който се характеризира със силно оцветяване в перикарионите и проксималните участъци на излизащите от тялото нервни израстъци. Силната експресия на GFR $\alpha 1$ подсказва неговата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



Фигура 4.29. Имунохистохимична локализация на TrkB в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на спиналното тригеминално ядро. Имунопозитивните клетки за TrkB са означени със стрелки. Прави впечатление различния интензитет на реакцията и разнообразната външна морфология на имунореактивните неврони. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.30. Имунохистохимична локализация на TrkC в SpVo (A), SpVi (B) и SpVc (C) на спиналното тригеминално ядро. Главите на стрелките показват положителните за реакцията нервни влакна. Прави впечатление липсата на имунобелязани перикариони в ядрото. Мащабна скала = 50 μ m.



Фигура 4.31.. Имунохистохимична локализация на $GFR\alpha 1$ в $SpVo$ (A), $SpVi$ (B) и $SpVc$ (C) на спиналното тригеминално ядро. Със стрелки са обозначени няколко неврони с позитивни перикариони и проксималните участъци на излизащите от тялото нервни израстъци. Мащабна скала = 50 μm .

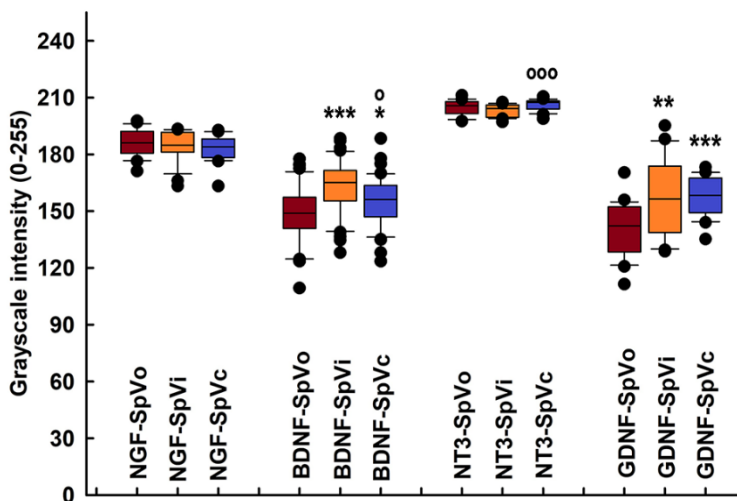
Експресията на GFR α 1 в интерполарното подядро има модел на разпределение, подобен на този, наблюдаван в SpVc, без значителни разлики в интензивността и локализацията на оцветяването. Забележимо силна имунореактивност се наблюдава в телата на спиналните тригеминални неврони, което предполага значителна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

Имунореактивността на GFR α 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 α 1 в сравнение с интензитета на имунооцветяване в SpVc и SpVi.

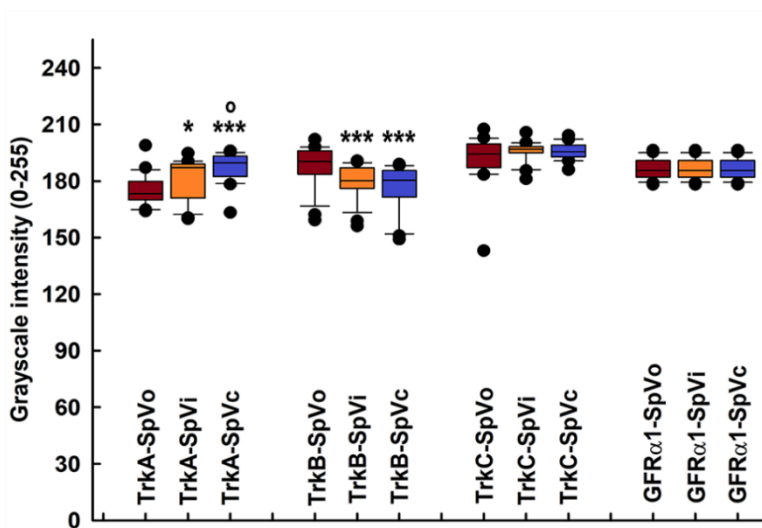
Като резултат от проведените експериментални имунооцветявания ние установихме, че по-голямата част от невроните и поддържащата глия в спиналното тригеминално ядро на полово зрели плъхове са NGF-имунопозитивни. Имунореактивните клетки са разпръснати по цялото протежение на ядрото. При нито една от имунопозитивните клетки не се наблюдава специфично оцветяване в клетъчното ядро. По същия модел 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 сипанлото тригеминално ядро. Данните показват, че NGF е равномерно експресиран от невроните в ядрото, без статистически значима разлика в интензитета на имунооцветяване в тях (фиг. 4.32). 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. 4.33). 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, $or=0.025$) (фиг. 4.33).

За нивата на експресия на BDNF сравнението между трите подядра на спиналното тригеминално ядро разкри, че те имат различни нива на експресия за този невротрофен фактор (фиг. 4.32). Оказва се, че BDNF има най-висока експресия в спиналните тригеминални неврони на SpVo подядро, следван от тази в невроните на SpVc (медиана,



Фигура 4.32. Статистически анализ на експресията на невротрофни фактори в трите части на спиналното тригеминално ядро.



Фигура 4.33. Статистически анализ на експресията на рецепторите за невротрофни фактори в трите части на спиналното тригеминално ядро.

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. 4.32). TrkB като рецептор за BDNF също показва различни нива на експресия в трите подядра, като това в каудалното подядро е най-високо, докато експресията в оралното подядро е най-ниска (фиг. 4.33). 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. 4.33).














































Експресията на NT-3 (фиг. 4.32) 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. 4.33). При това не бе 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. 4.32). 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. 4.33).

4.2.4 Обобщение върху неврохимичната анатомия на спиналното ядро

Получените от нас имунохистохимични резултати от изследваните в това проучване невротрансмитери и/или невромодулатори, както и данните за тестваните невротрофни фактори в спиналното тригеминално 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

V. ОБСЪЖДАНЕ

5.1 Структурна организация на спиналното тригеминално ядро

5.1.1 Подядра на спиналното тригеминално ядро

В първата част на проведеното изследване, ние представяме морфологични данни за невроанатомията на спиналното тригеминално ядро, които, от своя страна, биха служили за полагаането 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 невроните в 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 ядрото 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 проенвормерите на напречни области, известни като енвормери, по протежение на ростокаудалната ос (García-Guillén et al., 2021). Тези енвормери 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; Marin 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 сетивна 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, то 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 (Ouy 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; Cambroner and Puelles, 2000). Разбирането за организацията на тези субединици хвърля светлина върху по-фината организация на тригеминалната сетивна 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 спиналното тригеминално ядро. Като се придържахме към тази утвърдена анатомична категоризация, ние целим да предоставим цялостно изследване и обстоен анализ на морфологичните и функционалните характеристики на спиналните тригеминални подядра, хвърляйки светлина върху техните отличителни роли в невроналните 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 равномерност в структурата е давал тласък да се мисли, че цялото ядро притежава също така равномерност 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.

Горепосоченото описание, въпреки, че е базирано на наблюдения върху материал, различен от този, използван в 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.

5.1.2 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 импрегиране по *Golgi*, хрянова пероксидаза (horseradish peroxidase, HRP), оцветяване по *Nissl* и имуноцитохимия (Gobel, 1975, 1978, 1979; ; Schoenen, 1982; 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 са идентифицирани шест различни типа неврони, включващи пирамидни неврони с шипове, пирамидни неврони без шипове, мултиполарни неврони, характеризирани се с гъсто дендритно дърво, мултиполарни неврони с оскъдно разклоняващи се дендрити, клетки, характеризирани 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 също е проведено детайлно изследване, което показва наличие на добре оцветени стъблести клетки, характеризирани се с обширни дендритни и аксонални арборизации, които се отличават със значителен брой тънки странични разклонения, излизачи 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, мултиполарна или биполарна 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, характеризирани се със сферични дендритни арборизации, биполарни фузиформени или овални неврони с малки ядра, стъбловидни неврони, характеризирани 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 информация за 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, октоподобни, сегментирани, лодкоподобни, пирамидални, мултиполярни, 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 нашето изследване разкри наличие на пирамидни неврони в спиналното тригеминално ядро на плъх, 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 в други животински видове (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.

5.2 Химичен профил на спиналното тригеминално ядро

5.2.1 Невротрансмитери и неuropeптиди в спиналното тригеминално ядро

5.2.1.1 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 антитяло срещу GABA, разкриват, че значителен брой клетки в спиналното тригеминално ядро на плъх са имуноположителни за GABA. Това предполага, че GABA като инхибиторен невротрансмитер, 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 рострална посока тази разлика намалява и в крайна сметка тя става статистически незначителна. Тази пространствена вариация в разпределението на GABA имунооцветяването може да има значение за функционалната организация на спиналното тригеминално ядро. Тя може да подсказва, 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 данните от други експерименти за наличието на GABA в спиналното тригеминално ядро (Ginestal and Matute, 1993). Нещо повече, нашите данни са в унисон с разпределението на GABA 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 GABA в ядрото. Освен това, нашите експерименти дават допълнителна информация за съществуването на GABA-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 GABA хвърля повече светлина върху това доколко е статистически значима разликата в разпределението на този аминокиселинен невротрансмитер по цялото протежение на ядрото у плъх.

Наличието на GABA 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 GABA се повишава в

каудалното субядро на спиналното тригеминално ядро при болкови тестове и второ, това увеличаване на GABA води до поведенчески промени у плъхове, които показват намаляване за усещането на болка (Viggiano et al., 2004). Изказаната хипотеза е, че ноцицептивните стимули достигат до каудалната част на ядрото, където активират GABAергични неврони. Последните, от своя страна, въздействат върху нервни влакна, експресиращи GABA_A рецептори, които влакна достигат до вентро-постериорните таламични ядра (Burton and Craig, 1979). Посочените данни неминуемо показват, че GABA 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 GABAергичните клетки в различните части на спиналното тригеминално ядро.

5.2.1.2 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 (AChE). 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 однородност се запазва въпреки различната топографска организация 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 однородност 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 АСhЕ. 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 АСhЕ може да предполага базална регулация на информационния процесинг, медиран от ацетилхолина, необходими са допълнителни изследвания за изясняване на специфичните роли на този трансмитер и деградиращия му ензим АСhЕ 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 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 общосетивната 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.

5.2.1.3 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 в тригеминалната сетивна система.

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 острите мигренозни атаки (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 и 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.

5.2.1.4 Субстанция Р

Един от най-ранно идентифицираните неuropeптиди, за които е установено, че могат да действат като невротрансмитери в ПНС и ЦНС, е субстанция Р (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 Р в спиналното тригеминално ядро, докладвани от екипа на Hökfelt (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 Р в трите части на ядрото. Фактът, че субстанция Р 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 Р 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 последващи 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.

5.2.1.5 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 важноста 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 вазодилатор може да функционира при предаването на ноцицепция (Brain et al., 1985). Това негово вазоконстриктивно действие се явява като крайтъгълен камък в терапията на мигрената.

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.

5.2.1.6 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 интраекалното 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 модуляцията 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 разностранните 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 плъховете и осигуряват основа за бъдещи проучвания, изследващи функционалните последици от тази регионална вариабилност в експресията на невропептид Y.

5.2.2 Газови невромодулатори

5.2.2.1 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 изследването 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 допринесе 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.

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 невροхимичната 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 невροхимични пътища или регулаторни механизми.

5.2.3. 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 нашето проучване, което кореспондира с нивата на експресия на неговия TrkC рецептор, без установена статистическа разлика в трите подядра.

От друга страна, имунохистохимичните резултати за GDNF показват 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, както е видно от таблица 3. 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 представени в невроните на 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 ѝ 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, по-специално 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 В, независимо дали тя е активирана от точно тези невротрофини (Rajagopal et al., 2004). Нашите резултати са в пълно 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 експресирани в почти всички спинални тригеминални 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 спиналното тригеминално ядро, 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.

5.3 Ограничения на проучването

5.3.1 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 precedent 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 (Zaout & 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.

5.3.2 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 последващо пренасищане на хромогенната реакция, което, от своя страна, може да доведе до разлики в генерираните цифрови изображения, като по този начин повлияе на техния обективен анализ. За да преодолеем този проблем, в хода на реакциите ние едновременно инкубирахме тъканни срезове, взети от трите подядра, за да намалим риска от всякакви грешки, причинени от вариации по време на имунохистохимичната процедура.

Друг методологичен проблем би могъл да бъде свързан с 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.

5.3.3 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 потенциални полови различия в структурата и неврохимичната принадлежност на изследваните неврони не са отчетени. Този аспект е важен, тъй като съществува 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 невропептиди като 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 различия, 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 невроактивни 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 невротрофични фактори като CGRP и азотен оксид, а също и на някои хормони като адипонектин и лептин с определена 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 невротрофични фактори 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 невротрофичността на това ядро.

5.4 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 потенциално 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 в бъдеще провеждане на конкретни експерименти за изследване на следните характеристики на спиналното тригеминално ядро:

5.4.1 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 & Kievall, 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 възнаграждане (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).

Нашите бъдещи конкретни 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.

5.4.2 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. Стереологичните методи могат да се използват при изследването на спиналното тригеминално ядро за количествена оценка на невроните в него, оценка на обема, изчисляване на дължината и плътност на капилярната мрежа, площта на напречното сечение на капилярите, а също и да се направи взаимовръзка между невронните и съдовите параметри. Стереологичният анализ на спиналното тригеминално ядро може да бъде особено ценен при патологични състояния, засягащи тригеминалната система. Промените в броя на спиналните тригеминални неврони, 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.

5.4.3 Проучване на ултраструктурата на спиналното тригеминално ядро у плъх

Бъдещите проучвания, насочени към изясняване на детайлната субклетъчна структура 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 обещаваат да допринесат за по-доброто разбиране на клетъчната и синаптичната организация в това критично ядро на мозъчния ствол.

От една страна, 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. От друга страна, трансмисионната електронна микроскопия (ТЕМ) 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. Освен това, и не на последно място, 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, което ще предостави нова информация и детайлна представа за молекулярния състав и синаптичната локализация на ключови сигнални молекули в рамките на спиналното тригеминално ядро.

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

VI. 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 централни 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 спиналното тригеминално ядро корелира с функционалната му обособеност и подчертава, 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 проучване 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. Настоящото проучване разширява ареала на морфологично изследване, като и 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 разнообразие на 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 утилизираните 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 гореспомнатите 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.

VII. ИЗВОДИ

1. Спиналното тригеминално ядро притежава сложна вътрешна структура, включваща специфично подреждане на неврони, глиялни 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 спинални тригеминални неврони с различна външна морфология на своите перикариони показва структурната комплексност в организацията на трите подядра на спиналното тригеминално ядро.
3. Неврохимичният профил на спиналното тригеминално ядро се характеризира с голямо разнообразие от ендогенни невроактивни лиганди, които включват класически невротрансмитери като гама-аминомаслена киселина, серотонин, неuropeптидите субстанция Р, неuropeпид Y и калцитонин генно-свързан пептид, както и ензимите азотен оксид синтаза и ацетилхолинтрансфераза, 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 спиналното тригеминално ядро 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 спиналното тригеминално ядро 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 спиналните тригеминални неврони и тяхната неврохимична пластичност. Неминуемо идентифицираните невротрофни фактори, невротрансмитери и невромодулатори взаимодействат помежду си за поддържането на локалната среда в подядрата.

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

8.1 Потвърдителни приноси

1. Спиналното тригеминално ядро у плъх е организирано в три рострокаудални 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 спиналните тригеминални неврони у плъх.

8.2 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.

IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ 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.

X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

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.

XI. SUMMARY

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 immunoeexpression 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 immunoeexpression 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 immunoeexpression 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 immunoeexpression levels of two enzymes that are essential for neuronal transmission: acetylcholinesterase (AChE) and neural nitric oxide synthase (nNOS), offering information on their possible functions as well as their distribution. In the spinal trigeminal nucleus, the expression patterns of 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, 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.