

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

кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ТКАЧЕНКО ЮРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 591.185; 616.8-009.7; 616-009.623

**ОСОБЛИВОСТІ КОДУВАННЯ ТЕМПЕРАТУРНОЇ ТА
рН-ЧУТЛИВОСТІ У ПЕРВИННИХ НОЦИЦЕПТОРАХ
МИШЕЙ**

Спеціальність 03.00.02 – біофізика

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Ткаченко Ю. М.

Науковий керівник: Кришталь Олег Олександрович, доктор біологічних наук, академік НАН України

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Ткаченко Ю.М. **Особливості кодування температурної та рН-чутливості у первинних ноцицепторах мишей.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – «Біофізика». – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2026.

У дисертаційній роботі охарактеризовано фармакологічні та біофізичні властивості чутливих закінчень первинних ноцицепторів миші, зокрема особливості кодування температурної та рН-чутливості.

Ноксичні (шкідливі або потенційно шкідливі) стимули активують специфічні рецептори на чутливих закінченнях ноцицепторів, спричиняючи деполяризацію мембрани та генерацію потенціалів дії (ПД), частота яких кодує інтенсивність сигналу. І зміни температури в межах нешкідливого діапазону, і зниження позаклітинного рН можуть модулювати больову чутливість, проте молекулярні механізми цих процесів залишаються недостатньо з'ясованими.

Для досягнення поставленої мети використано експериментальні підходи *ex vivo* та *in vitro*. Електричну активність аферентів сенсорних нейронів реєстрували у препараті «шкіра–нерв» миші *ex vivo*, а трансмембранні струми сенсорних нейронів – методом patch-clamp *in vitro*.

У межах дисертаційної роботи розроблено оригінальний метод позаклітинної реєстрації електричної активності поодиноких нервових волокон підшкірного нерва (n. saphenus) з внутрішньої поверхні дерми препарату «шкіра–нерв» миші за допомогою скляного мікроелектрода. Запропонована методика забезпечує стабільну реєстрацію активності аферентів протягом 8 годин, оптимізує процес швидкої заміни розчину на препараті, спрощує систему перфузії та потребує значно меншого об'єму експериментальних середовищ, що скорочує підготовчий етап експерименту та підвищує його відтворюваність.

Показано, що в межах температур 20–40 °C відповіді ноцицептивних аферентів на АТФ та H^+ характеризуються високою температурною залежністю: $Q_{10} = 3,0 \pm 0,2$ (АТФ) та $Q_{10} = 3,1 \pm 0,25$ (рН 6,7). Водночас підвищення частоти ПД, зумовлене зміщенням мембранного потенціалу у бік деполяризації внаслідок збільшення позаклітинної концентрації K^+ , залишається слабо залежним від температури ($Q_{10} = 1,84 \pm 0,1$), подібно до спонтанної активності в контрольних умовах ($Q_{10} = 1,96 \pm 0,1$). Значення температурного коефіцієнта Q_{10} у межах 20–30 та 30–40 °C залишалися сталими. Отримані результати свідчать про важливу роль АТФ- та H^+ -чутливих іонних каналів у кодуванні інтенсивності нешкідливих теплових стимулів ноцицептивними аферентами.

Показано, що неселективний інгібітор ASIC-каналів і Na^+/H^+ -обмінників NHE 5-(N-етил-N-ізопропіл)амілорид (EIPA, 10 μM), а також селективний інгібітор NHE1 зоніпорид (0,5 μM) посилюють генерацію ПД, індуковану тривалим зниженням позаклітинного рН із 7,4 до 6,1. Це вказує на те, що функціонування Na^+/H^+ -обмінника NHE1 є одним із ключових механізмів активації ноцицептивних аферентів у відповідь на ацидоз.

Антагоніст ASIC-каналів диміназен у концентраціях 10 та 25 μM не впливав на протон-індуковану генерацію ПД у відповідь на зниження рН із 7,4 до 6,1. Збільшення концентрації диміназenu до 100 μM спричиняло статистично достовірне підсилення цієї відповіді, подібне до дії блокаторів NHE, що свідчить про можливий додатковий інгібувальний вплив на NHE. Завдяки хімічній відмінності від класичних інгібіторів (амілорид, EIPA, зоніпорид), диміназен може розглядатися як перспективний структурний мотив для розроблення нових селективних блокаторів NHE. Водночас механізм його дії у модуляції кислотно-індукованої активації ноцицепторів потребує подальшого дослідження.

Показано, що селективний антагоніст TRPV1 AMG-517 пригнічує капсаїцин-індуковане підвищення частоти ПД ноцицептивних аферентів, однак не впливає на зміни ПД у відповідь на зниження рН із 7,4 до 6,1 при 40 °C, а також на зростання ПД, спричинене підвищенням температури в рецептивному полі з 30 до 50 °C. Пригнічення капсаїцин-індукованого збільшення частоти ПД

підтверджує ефективність AMG-517 як селективного антагоніста TRPV1-рецепторів, що дозволяє зробити висновок, що за зазначених умов TRPV1 не є основним сенсором помірного ацидозу ($\text{pH} \geq 6,1$) і не виступає єдиним молекулярним сенсором теплових ноцицептивних стимулів.

Відсутність пригнічення протон-індукованої відповіді після блокади ASIC підтверджує полімодальність сенсорних закінчень та існування додаткових механізмів протон-чутливості у периферичних аферентах.

Таким чином, встановлено, що кодування температурної та кислотної чутливості первинними ноцицепторами має комплексний характер. Окрім класичних сенсорів температури (TRPV1) та pH (ASIC), у кодуванні температурних сигналів беруть участь також пуринорецептори, тоді як у формуванні відповіді на зниження pH натрій-протонний обмінник NHE. Отримані результати розширюють уявлення про механізми периферичного кодування ноцицептивних стимулів і можуть бути використані для пошуку нових мішеней фармакологічної корекції больових станів.

Ключові слова: сенсорні нейрони, ноцицепція, ацидоз, температура, препарат «шкіра–нерв» *ex vivo*, ASIC, TRPV1, NHE.

ABSTRACT

Tkachenko Y.M. **Features of temperature and pH sensitivity coding in primary mouse nociceptors.** – Manuscript. Dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences (PhD equivalent) in specialty 03.00.02 – Biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

This dissertation characterizes the pharmacological and biophysical properties of the sensory endings of primary mouse nociceptors, with particular emphasis on the mechanisms of encoding temperature and pH sensitivity.

Noxious (harmful or potentially harmful) stimuli activate specific receptors at nociceptor sensory endings, causing membrane depolarization and the generation of action potentials (APs), whose frequency encodes signal intensity. Both temperature changes within the non-damaging range and a decrease in extracellular pH can modulate

pain sensitivity; however, the molecular mechanisms underlying these processes remain insufficiently understood.

To achieve the aims of the study, both *ex vivo* and *in vitro* experimental approaches were employed. Electrical activity of sensory neuron afferents was recorded in the mouse *ex vivo* skin–nerve preparation, and transmembrane currents of sensory neurons were studied using the patch-clamp technique *in vitro*.

Within this work, an original method was developed for extracellular recording of electrical activity from single fibers of the subcutaneous saphenous nerve on the dermal side of the mouse skin–nerve preparation using a glass microelectrode. The proposed technique enables stable recordings of afferent activity for up to 8 hours, facilitates rapid solution exchange on the preparation, simplifies the perfusion system, and requires substantially smaller volumes of experimental media, thereby reducing preparation time and improving experimental reproducibility.

It was shown that within the temperature range of 20–40 °C, the responses of nociceptive afferents to ATP and H⁺ exhibit high temperature sensitivity: $Q_{10} = 3.0 \pm 0.2$ (ATP) and $Q_{10} = 3.1 \pm 0.25$ (pH 6.7). In contrast, the increase in AP frequency caused by a shift of the membrane potential toward depolarization following an elevation in extracellular K⁺ concentration remained weakly temperature-dependent ($Q_{10} = 1.84 \pm 0.1$), similar to spontaneous activity under control conditions ($Q_{10} = 1.96 \pm 0.1$). The temperature coefficient Q_{10} remained stable across the ranges of 20–30 and 30–40 °C. These findings indicate an important role of ATP- and H⁺-sensitive ion channels in encoding the intensity of non-damaging thermal stimuli by nociceptive afferents.

It was demonstrated that the non-selective inhibitor of ASIC channels and Na⁺/H⁺ exchangers (NHE), 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA, 10 μM), as well as the selective NHE1 inhibitor zoniporide (0.5 μM), enhance AP generation induced by prolonged extracellular acidification to pH 6.1. This indicates that the function of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 is one of the key mechanisms of nociceptive afferent activation in response to acidosis.

The ASIC channel antagonist diminazene, at concentrations of 10 and 25 μM , did not affect proton-induced AP generation in response to a decrease in pH from 7.4 to 6.1. Increasing the diminazene concentration to 100 μM caused a statistically significant enhancement of this response, similar to the effect of NHE blockers, suggesting a possible additional inhibitory influence on NHE. Owing to its chemical distinction from classical inhibitors (amiloride, EIPA, zoniporide), diminazene may be considered a promising structural scaffold for the development of new selective NHE blockers. At the same time, the mechanism underlying its action in modulating acid-induced nociceptor activation requires further investigation.

It was shown that the selective TRPV1 antagonist AMG-517 suppresses capsaicin-induced increases in AP frequency of nociceptive afferents but does not affect AP changes in response to a decrease in pH from 7.4 to 6.1 at 40 °C or the increase in AP frequency induced by heating the receptive field from 30 to 50 °C. Suppression of the capsaicin-induced increase in AP frequency confirms the effectiveness of AMG-517 as a selective TRPV1 receptor antagonist and indicates that, under the examined conditions, TRPV1 is neither the principal sensor of moderate acidosis ($\text{pH} \geq 6.1$) nor the sole molecular detector of thermal nociceptive stimuli.

The absence of suppression of proton-induced responses following ASIC blockade confirms the polymodality of sensory endings and the existence of additional proton-sensitive mechanisms in peripheral afferents.

Thus, it has been established that the encoding of temperature and acid sensitivity by primary nociceptors has a complex character. In addition to classical sensors of temperature (TRPV1) and pH (ASIC), purinergic receptors also contribute to the encoding of thermal signals, whereas the Na^+/H^+ exchanger NHE plays a role in shaping the response to extracellular acidification. The obtained results broaden our understanding of the mechanisms of peripheral nociceptive signal encoding and may be useful for identifying new targets for pharmacological modulation of pain states.

Keywords: sensory neurons, nociception, acidosis, temperature, skin–nerve preparation *ex vivo*, ASIC, TRPV1, NHE.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ,

в яких висвітлені основні результати роботи:

1. **Tkachenko Y**, Khmyz V, Isaev D, Maximyuk O, Krishtal O. Temperature increase significantly enhances nociceptive responses of C-fibers to ATP, high K(+), and acidic pH in mice. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131643. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131643> (Особистий внесок здобувача: провів експериментальні дослідження, здійснив обробку та аналіз експериментальних даних).
2. **Tkachenko Y**, Khmyz V, Buta A, Isaev D, Maximyuk O, Krishtal O. Acid-sensing ion channel blocker diminazene facilitates proton-induced excitation of afferent nerves in a similar manner that Na(+)/H(+) exchanger blockers do. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131661. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131661> (Особистий внесок здобувача: виконав експериментальні дослідження з використанням методу препарату «шкіра–нерв» *ex vivo*, обробку та аналіз експериментальних даних).
3. **Tkachenko, Y. M.**, Maximyuk, O. P., Cherninskyi, A. O., & Krishtal, O. O. Differential effects of TRPV1 antagonist AMG-517 on activation of nociceptive skin endings. *Fiziol. Zh.* 2025; 71(2), 34–39. <https://doi.org/10.15407/fz71.02.034> (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).
4. **Tkachenko Y**, Maximyuk O, Cherninskyi A, Krishtal O. Electrophysiological methods in nociception research. *Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv* Series: Biology. 2025;100:66–71. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2025.100.66-71> (Особистий внесок здобувача: підготовка початкового варіанту рукопису та візуалізація).
5. **Tkachenko Y**, Cherninskyi A, Maximyuk O. Improved skin-nerve preparation technique for recording from cutaneous afferents. *Neurophysiology.* 2025. <https://doi.org/10.1007/s11062-025-09951-3> (Особистий внесок здобувача: розробив і вдосконалив метод *ex vivo* позаклітинної реєстрації електричної активності аферентних нервів у ізольованому препараті «шкіра–нерв» миші, провів експерименти та аналіз даних, а також написав чернетку рукопису).

Список тез доповідей на наукових конференціях які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. **Ткаченко Ю.М.**, Максимюк О.П., Хмиз В.В., Кришталь О.О. Вплив температури на збудження первинних аферентів ноцицепторів АТФ та рН // VI Конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, Україна, 4-8 червня, 2014.

2. **Y. M. Tkachenko**, A.Z. Buta, V.V. Khmyz, O.O. Krishtal, O. P. Maximyuk Diminazene increases the nociceptive response of primary sensory afferent nerve fibers to acidification in a dose-dependent manner // Abstracts of the Ukrainian conference on Neuroscience dedicated to the 90th birthday of academician Volodymyr Skok, 25-27 July 2022, Kyiv // Fiziol. Zh. 2022; 68(3S): p. 12.

3. **Tkachenko Y.**, Khmyz V., Maximyuk O. The nociceptive responses of mice's polymodal nociceptors of C-fibers to ATP and an acidic pH are highly temperature-dependent. IXth Meeting of Ukraine Biophysics Society, Kyiv, Ukraine, 30 October - 2 November, 2023.

4. **Ю.М. Ткаченко**, В.В. Хмиз, О.В. Єгорова, О.П. Максимюк, Д.С. Ісаєв, О.О. Кришталь. Антагоніст TRPV1 рецептора AMG-517 інгібує виключно капсаїцин-індуковане збудження чутливих закінчень ноцицептивних аферентів шкіри миші. // Фізіол. журн., 2024, Т. 70, № 5, додаток, С. 107-108.

5. **Ю.М. Ткаченко**, О.П. Максимюк, Єгорова О.В., Д.С. Ісаєв, О.О. Кришталь. Методика запису активності аферентних нервових волокон шкіри миші *ex vivo* для дослідження сенсорної чутливості.// Фізіол. журн., 2024, Т. 70, № 5, додаток, С. 129-130.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	7
ЗМІСТ	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	17
Актуальність теми дослідження.	17
Мета та завдання дослідження.	20
Особистий внесок здобувача.	22
Апробація результатів дисертації.....	22
Публікації.....	23
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	24
1.1. Гомеостаз рН та фактори, що спричиняють зниження рН в організмі ссавців	24
1.2. Роль кислоточутливих рецепторів у ноцицепції: механізми виявлення тканинного ацидозу.....	26
1.3. Температурна чутливість периферичних ноцицепторів	28
1.3.1. Сенсори шкідливого підвищення температури родини TRP.....	28
1.3.2. Сенсори нешкідливого тепла родини TRP.....	31
1.3.3. P2X3 рецептори приймають участь у кодуванні тепла у нешкідливому температурному діапазоні.	32
1.4. Чутливість периферичних ноцицепторів до охолодження.....	36
1.5. Вплив локального охолодження на больову чутливість	38
1.6. Сучасні експериментальні моделі у вивченні больової чутливості.	39

1.6.1. Застосування patch-clamp-методу в гетерологічних експресійних системах для дослідження іонних каналів	41
1.6.2. Первинні культури нейронів спинальних гангліїв як модель для електрофізіологічних досліджень ноцицепторів	42
1.6.3. Інтактні сенсорні ганглії <i>ex vivo</i> як модель для електрофізіологічного дослідження нейрон-гліальних взаємодій.....	44
1.6.4. Модель “шкіра–нерв” <i>ex vivo</i> : можливості електрофізіологічного дослідження електричної активності ноцицептивних аферентів	45
1.6.5. Інтегрована <i>ex vivo</i> модель “шкіра–нерв–спинальний ганглії” для реєстрації електричної активності сенсорних нейронів	47
1.6.6. Експериментальні моделі <i>in vivo</i> для дослідження ноцицепції у гризунів	49

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 51

2.1. Методика реєстрації електричної активності поодиноких аферентів у препараті «шкіра–нерв» миші.....	51
2.1.1. Матеріали та обладнання.....	51
2.1.2. Експериментальні тварини	54
2.1.3. Методика виділення препарату шкіра–нерв.....	54
2.1.4. Реєстрація електричної активності окремих сенсорних аферентів	56
2.1.5. Фенотипування сенсорних аферентів за швидкістю проведення	57
2.1.6. Фенотипування сенсорних аферентів за чутливістю до механічних стимулів.....	59
2.1.7. Хімічна стимуляція чутливих закінчень сенсорних аферентів ...	60
2.1.8. Термальна стимуляція чутливих закінчень сенсорних аферентів	62
2.1.9. Аналіз електричної активності сенсорних аферентів.....	63

2.1.10. Розрахунок енергії активації E_a та температурного коефіцієнта Q_{10}	64
---	----

2.2. Удосконалена методика реєстрації електричної активності шкірних аферентів у ізольованому препараті «шкіра–нерв» миші.....	65
2.2.1. Загальний опис методу.....	65
2.2.2. Матеріали і обладнання	66
2.2.3. Підготовка тварини та препарування шкіри з нервом.....	67
2.2.4. Експериментальна камера.....	68
2.2.5. Реєстрація електричної активності одиничних аферентних нервових волокон	69
2.2.1. Хімічна стимуляція нервових закінчень шкіри.....	71
2.3. Реєстрація трансмембранних струмів методом patch-clamp.....	73
2.3.1. Експериментальні тварини	73
2.3.2. Первинні культури сенсорних нейронів як модель для дослідження нативних властивостей протон-чутливих рецепторно-канальних комплексів	73
2.3.3. Отримання первинної культури нейронів спинномозкових гангліїв миші.....	74
2.3.4. Методика культивування клітин лінії HEK293	75
2.3.5. Метод внутрішньоклітинного діалізу.....	76
2.3.6. Метод фіксації потенціалу на мембрані нейрона.....	76
2.3.7. Методика реєстрації трансмембранних струмів	77
2.3.8. Методика реєстрація хемоактивованих трансмембранних струмів у конфігурації "U-трубка.....	78
2.3.9. Реєстрація трансмембранних струмів, викликаних активацією ASIC-рецепторів.....	80

2.3.10. Аналіз даних patch-clamp експериментів	82
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	83
3.1. Залежність спонтанної і викликанної електричної активності нервових закінчень шкіри від зміни температури у межах фізіологічного діапазону	83
3.1.1. Загальна характеристика полімодальних ноцицептивних аферентів шкіри.....	83
3.1.2. Вплив зміни температури на протон-викликане збудження ноцицептивних аферентів шкіри	85
3.1.3. Вплив зміни температури на АТФ-викликане збудження ноцицептивних аферентів шкіри	87
3.1.4. Вплив температури на збудження ноцицептивних аферентів шкіри, індуковане високою концентрацією K^+	90
3.1.5. Q_{10} та енергія активації, розраховані на основі спонтанної та викликанної електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри.....	92
3.2. Вплив селективного антагоніста TRPV1-рецептора AMG-517 на збудження чутливих закінчень ноцицепторів шкіри мишей <i>ex vivo</i> , викликане ацидозом, підвищенням температури та капсаїцином	95
3.2.1. Селективний антагоніст TRPV1-рецептора AMG-517 не впливає на протон-викликане збудження ноцицептивних закінчень шкіри при рН 6,1 і температурі 40 °C	95
3.2.2. Вплив AMG-517 на активацію полімодальних ноцицепторів у відповідь на теплову стимуляцію	97
3.2.3. AMG-517 блокує збудження ноцицепторів, індуковане капсаїцином	99

3.2.4. Дослідження дії селективного антагоніста TRPV1 на АТФ-індуковане збудження полімодальних ноцицептивних закінчень аферентів шкіри при температурах 30 та 40 °C.....	101
3.3. Вплив антагоніста ASIC-рецепторів на протон-індуковану електричну активність полімодальних ноцицепторів шкіри.....	104
3.3.1. Селективний антагоніст ASIC-рецепторів диміназен у концентраціях 10 та 25 μM не впливає на активацію СМН-волокон, індуковану зниженням рН.....	104
3.3.2. Селективний антагоніст ASIC-рецепторів диміназен пригнічує протон-індуковані струми в сомах первинних сенсорних DRG-нейронів миші	106
3.3.3. Диміназен і AMG-517 не впливають на протон-індуковане збудження СМН-волокон.....	107
3.3.4. Диміназен у концентрації 100 μM посилює протон-індуковану електричну активність полімодальних СМН-аферентів шкіри миші.....	109
3.4. Вплив блокаторів протонно-натрієвих антипортерів NHE, EIPA і зоніпориду, на протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.	111
3.4.1. Неселективний блокатор протонно-натрієвих антипортерів NHE, EIPA (10 μM), підвищує протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.....	112
3.4.2. Селективний блокатор першої ізоформи протонно-натрієвого антипортера NHE1, зоніпорид у мікромольних концентраціях, збільшує протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.....	114
3.4.3. Зоніпорид у концентрації 1 μM не впливає на протон-активовані струми в DRG-нейронах мишей і щурів, а також у клітинах HEK293	119
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	121

4.1. Удосконалений підхід до - реєстрації електричної активності шкірних ноцицептивних аферентів	121
4.2. Залежність збудливості ноцицептивних рецепторів від температури	123
4.3. Диференційна дія антагоніста TRPV1 рецепторів AMG-517 на активацію ноцицептивних закінчень шкіри	126
4.4. Роль внутрішньо- та позаклітинного рН у регуляції збудливості первинних ноцицепторів	130
4.4.1. Вплив ацидозу на потенціалзалежні натрієві канали (Na_v)	131
4.4.2. Вплив ацидозу на потенціалзалежні калієві канали (K_v) і канали витоку K^+ (K_2P)	131
4.4.3. Канал TASK2 сенсор позаклітинного рН	132
4.4.4. Вплив ацидозу на потенціалкеровані кальцієві канали (Ca_v) ...	134
4.4.5. Вплив внутрішньоклітинного рН на генерацію та проведення потенціалів дії в ноцицепторах	135
4.4.6. Вплив ацидозу на вивільнення нейромедіаторів та нейропептидів у ноцицепторах	135
4.4.7. Вплив ацидозу на протон-чутливі іонні канали (ASIC)	136
4.4.8. Вплив ацидозу на TRPV1 рецептори	137
4.4.9. TRPA1 - сенсор внутрішньоклітинного рН	138
4.4.10. Na^+/H^+ -антипортер 1 (NHE1)	140
4.4.11. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортери	141
4.4.12. Зниження рН за фізіологічних умов.	141
4.4.13. Зниження рН за патологічних умов	142
4.4.14. Вплив внутрішньоклітинного ацидозу на збудливість первинних ноцицепторів	144

ВИСНОВКИ.....	146
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	149

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ASIC – Acid-Sensing Ionic Channel (протончутливий іоний канал)

CMH – механотеплочутливі С-волокна (mechano-heat sensitive C-fibers)

DRG – Dorsal Root Ganglia (спинальні задньокорешкові ганглії)

EIPA – 5-(N-етил-N-ізопропіл)амілорид

NHE – sodium/hydrogen exchanger (Na^+/H^+ антипортер)

P2X₃ – третій підтип підродина іонотропних P2-пуринорецепторів (ліганд-залежних іонних каналів)

TRPV1 – Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (ванілоїдний рецептор перехідного потенціалу першого типу)

TRPA1 – Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (анкіриновий рецептор транз'єнтного потенціалу першого типу)

ЦНС – центральна нервова система

ПД – потенціал дії

ПНС – периферична нервова система

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Встановлення механізмів контролю больової чутливості та розробка ефективних засобів її зменшення є одним із ключових завдань сучасної біомедицини, що має важливе значення для охорони здоров'я та добробуту населення. Ноксичні стимули (хімічні, механічні та термічні) сприймаються чутливими закінченнями спеціалізованих периферичних первинних сенсорних нейронів, відомих як ноцицептори. Аксони цих волокон походять від псевдоуніполярних нейронів малого діаметра, розташованих у спинномозкових гангліях (DRG). У ссавців значна частина ноцицепторів є полімодальними, оскільки вони можуть одночасно експресувати різні типи іонних каналів та рецепторів (зокрема ASIC, P2X, TRPV1) [1, 2]. Адекватний стимул зумовлює відкриття цих катіон-селективних каналів на периферичних закінченнях ноцицептора, що призводить до деполяризації мембрани. У результаті формується локальний рецепторний потенціал, амплітуда якого пропорційна силі стимулу. Якщо деполяризація досягає порогового рівня, активація потенціалзалежних Na^+ -каналів призводить до генерації ПД. Інтенсивність частоти ПД кодує інтенсивність больового стимулу. ПД регенерується за принципом «все або нічого» та поширюється вздовж аксона до центральної нервової системи, забезпечуючи передачу ноцицептивного сигналу [3, 4].

Оскільки за сталої температури [5, 6], швидкість проведення нервового імпульсу є сталою, а ПД безперервно регенерується під час поширення по нервовому волокну, ПД зберігають постійну тривалість і амплітуду вздовж усього аксона. Єдиними характеристиками, що можуть зазнавати модуляції, є тривалість серії ПД, інтервали між окремими спайками (ПД) та серіями розрядів ПД, а також частотні обмеження, зумовлені рефрактерними властивостями мембрани.

Однією з найбільш ефективних стратегій блокування больового сигналу є його пригнічення безпосередньо в місці виникнення у периферичних сенсорних закінченнях шляхом модуляції або блокади відповідних ноцицептивних рецепторів. Незважаючи на значні досягнення, зокрема ідентифікацію ключових

ноцицептивних рецепторів за допомогою генетичних і електрофізіологічних методів, механізми, які забезпечують трансдукцію (перетворення) змін зовнішнього середовища в нервовий імпульс на чутливих закінченнях сенсорних нейронів, залишаються недостатньо вивченими.

Шкіра ссавців щільно іннервована чутливими закінченнями сенсорних нейронів, які формують рецепторне поле поверхневої чутливості. Ці закінчення є унікальним об'єктом для електрофізіологічного та фармакологічного вивчення молекулярних механізмів первинної перцепції [7, 8]. У зв'язку з цим одним із завдань даного дослідження була розробка методу довготривалої та стабільної реєстрації електричної активності від поодиноких аферентів, які іннервують шкіру, що дає змогу здійснювати контрольовану стимуляцію чутливих нервових закінчень, визначати їхню модальну належність і швидкість проведення, а також досліджувати їхні фармакологічні властивості [9].

Пошкодження тканин і розвиток запального процесу супроводжуються вивільненням аденозинтрифосфату (АТФ) [10], локальним ацидозом [11] і підвищенням температури, що, своєю чергою, призводить до розвитку болю та гіпералгезії. Натомість зниження температури в зоні ураження, як правило, призводить до зменшення інтенсивності больових відчуттів [12, 13]. Температура є чинником, який впливає одночасно на всі біомолекули клітини, зокрема модулює чутливість сенсорних закінчень до аллогенних стимулів. У цьому дослідженні вивчено вплив температури в межах фізіологічно нешкідливого діапазону на електричну активність аферентів шкіри, викликану хімічними подразниками, з метою з'ясування молекулярних і рецепторних механізмів, які беруть участь у термочутливій ноцицепції.

Тканинний ацидоз призводить до стійкої активації первинних ноцицепторів, що є однією з ключових причин виникнення больових відчуттів [14, 15]. Вважається, що в організмі ссавців головну роль у сприйнятті кислотності відіграють протон-чутливі іонні канали ASIC [16]. Водночас інші молекулярні структури, зокрема натрій-протонні обмінники (NHE) [17] і рецептори TRPV1, також беруть участь у реакції на ацидоз. Виявлено, що всі три типи білків

експресуються в ноцицептивних сенсорних нейронах та локалізуються в їхніх периферичних сенсорних закінченнях [18, 19]. Зокрема, інгібітори ASIC-каналів знижують кислотно-індуковану периферичну гіпералгезію і пригнічують запальний біль [12], блокада TRPV1 супроводжується анальгетичним ефектом [20], тоді як фармакологічне пригнічення NHE1 сприяє розвитку ноцицептивної поведінки [21].

Саме тому у межах дисертаційного дослідження проаналізовано вплив хімічних антагоністів основних протон-чутливих трансмембранних іонних механізмів (ASIC, TRPV1, NHE) на збудження ноцицептивних закінчень шкіри в умовах ацидозу. Також досліджено, як температура в межах фізіологічного діапазону впливає на спонтанну та індуковану АТФ або ацидозом активність чутливих нервових закінчень шкіри.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Вона є складовою таких тем: «Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів» (№ державної реєстрації 0107U010843); «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (№ державної реєстрації 0110U004750); «Іонні канали клітинних мембран: функціональна роль у нормі та патології» (№ державної реєстрації 0113U003964); «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (№ державної реєстрації 0113U007273); «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (номер державної реєстрації 0116U004470); «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (номер державної реєстрації 0118U007343) та «Молекулярні механізми неврологічних розладів та можливі шляхи їх корекції» (номер державної реєстрації 0124U001713).

Мета та завдання дослідження. Основною метою дослідження було з'ясувати вплив температури на активацію ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів шкіри під дією аллогенних стимулів з метою визначення рецепторів, що беруть участь у сприйнятті температури в межах фізіологічно нешкідливого діапазону, а також проаналізувати механізми збудження цих закінчень за умов помірного зниження позаклітинного рН.

Для досягнення мети дослідження були поставлені наступні завдання:

1. Оптимізувати методику роботи з препаратом «шкіра–нерв» для забезпечення стабільної довготривалої реєстрації електричної активності нервових аферентів і раціонального використання експериментальних розчинів.
2. Визначити температурну залежність електричної активності шкірних ноцицепторів у відповідь на дію аллогенних чинників (K^+ , АТФ, H^+).
3. Дослідити вплив блокади TRPV1 рецептора на електричну активність ноцицептивних сенсорних закінчень шкіри, зумовлену помірним ацидозом, дією теплових стимулів та капсаїцином.
4. Дослідити вплив блокади рецепторів ASIC на електричну активність ноцицептивних аферентів шкіри, індуковану помірним ацидозом.
5. Дослідити вплив блокади натрій-протонного обмінника (NHE) на електричну активність ноцицептивних аферентів шкіри, індуковану помірним ацидозом.

Об'єкт дослідження – електрична активність сенсорних нейронів.

Предмет дослідження – вплив температури на хімічну активацію ноцицепторних закінчень шкіри, а також ефект блокаторів протон-чутливих іонних каналів і NHE на збудження ноцицепторів шкіри, спричинене ацидозом.

Методи дослідження – реєстрація електричної активності ноцицептивних аферентів у препараті «шкіра–нерв» миші *ex vivo*, реєстрація трансмембранних

струмів сенсорних нейронів *in vitro*.

Наукова новизна одержаних результатів. У межах дисертаційної роботи розроблено унікальний метод позаклітинної реєстрації електричної активності поодиноких нервових волокон підшкірного нерва (n. saphenus) з внутрішньої поверхні дерми препарату «шкіра–нерв» миші *ex vivo* за допомогою скляного мікроелектрода. Запропонована методика забезпечує стабільну реєстрацію електричної активності протягом 8 годин, оптимізує процес швидкої заміни розчину на препараті, спрощує систему перфузії та дає змогу використовувати значно менший об'єм експериментальних середовищ, завдяки чому зменшується кількість підготовчих процедур і скорочується час до початку основної частини експерименту.

У дисертаційній роботі вперше комплексно досліджено вплив температури в межах фізіологічно нешкідливого діапазону на активацію ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів шкіри миші під дією алгогенних стимулів, а також з'ясовано молекулярні механізми їх активації за умов помірного закислення зовнішнього середовища.

Вперше показано, що підвищення температури в діапазоні від 20 до 40 °C значно посилює відповіді ноцицепторів на АТФ ($Q_{10} = 3,1$) та H^+ ($Q_{10} = 3,25$), тоді як відповідь на високу концентрацію K^+ залишається практично незмінною ($Q_{10} = 1,88$ проти 1,9 в контролі). Отримані дані свідчать про важливу роль температурозалежних пуринергічних і протон-чутливих механізмів у кодуванні інтенсивності теплових стимулів субноцицептивного рівня.

Вперше показано, що поєднання 40 °C і рН 6,1 не активує TRPV1-рецептори шкіри.

Вперше показано, що блокатор ASIC-каналів диміназен у концентраціях, достатніх для повної блокади ASIC у сенсорних нейронах миші, не пригнічує генерацію ПД у ноцицептивних аферентах у відповідь на помірний ацидоз. Навпаки, підвищення концентрації диміназenu до 100 μM значно посилює частоту ПД, індуковану зниженням рН. Отримані дані свідчать, що у високих

концентраціях диміназен може діяти як слабкий інгібітор NHE1. Це відкриває перспективи використання диміназену як потенційного прототипу для створення нових антагоністів NHE.

Вперше встановлено, що збудження аферентних нервових закінчень, викликане помірним закисленням середовища, реалізується переважно через активацію антипорту NHE1, а не ASIC-каналів, що підтверджується ефектом специфічного блокатора зоніпориду.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Показано, що кодування температурної та кислотної чутливості первинними ноцицепторами є багатокомпонентним процесом. Окрім класичних сенсорів температури (TRPV1) і рН (ASIC), у ньому беруть участь також пуринергічні рецептори та NHE. Взаємодія пуринергічних і протон-чутливих рецепторів визначає температурну чутливість у межах нешкідливого теплового діапазону, тоді як кислотна чутливість формується за участю як ASIC-каналів, так і NHE1-антипортерів.

Отримані результати поглиблюють розуміння периферичних механізмів больової чутливості та можуть бути використані для розроблення нових підходів до фармакологічної модуляції ноцицепції.

Оптимізована методика реєстрації електричної активності шкірних аферентів *ex vivo*, розроблена у межах дисертаційного дослідження, є надійною експериментальною платформою для вивчення впливу біологічно активних сполук на шкірні сенсорні нервові закінчення та з'ясування механізмів периферичної сенситизації. Розроблений метод дає змогу надійно відтворювати позаклітинні записи електричної активності поодиноких нервових волокон у препараті «шкіра–підшкірний нерв» миші, що робить його зручним для застосування іншими дослідниками.

Особистий внесок здобувача. Усі експериментальні дослідження, обробка й аналіз експериментальних даних, а також їх графічне представлення виконувалися особисто автором роботи. Дисертант брав участь у плануванні експериментів, аналізі результатів, формулюванні висновків і підготовці публікацій разом із науковим керівником — академіком НАН України, д.б.н.

Кришталем О. О., а також к.б.н. Максимюком О. П., к.б.н. Ісаєвим Д. С. і к.б.н. Чернінським А. О., з якими автор має спільні публікації

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на VI Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ 2014), Українській конференції з нейронауки, присвяченої 90-річчю академіка Володимира Скока (Київ 2022), IX Зустрічі Товариства біофізиків України (Київ 2023), Міжнародній конференції з нейронаук та Наукових читаннях, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології (Київ 2024).

Публікації. За результатами роботи опубліковано п'ять статей у фахових наукових журналах та п'ять тез доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділів з результатами досліджень та їх обговорення, а також висновків і списку використаних джерел (192 найменування). Робота викладена на 173 сторінках, проілюстрована 41 рисунком і графіком.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Гомеостаз рН та фактори, що спричиняють зниження рН в організмі ссавців

Практично всі білки, включно з ферментами та йонними каналами, залежать від рН для збереження своєї функції [22]. Білки набувають чутливості до протонів шляхом зміни заряду амінокислот унаслідок протонування або депротонування. Лише деякі амінокислоти, такі як гістидин, аспарагінова кислота, аргінін, лізин і глютамінова кислота, здатні протонуватись за значень рН у діапазоні від 5 до 7,4. Імідазольні групи гістидинових залишків, розташовані на поверхні білкової молекули, зазвичай мають pK_a близько 6,5 (значення рН, при якому половина імідазольних груп протонувана), що робить їх найбільш чутливими до незначних змін рН, хоча ефективне значення pK_a окремого залишку гістидину залежить від його молекулярного оточення. Строгий контроль як позаклітинного, так і внутрішньоклітинного рН є критично важливим для підтримання біохімічних реакцій клітини та гомеостазу тканин [23]. Незважаючи на ефективні механізми контролю рН, різні патологічні стани, зокрема запалення, ушкодження або пухлини щільної структури, супроводжуються розвитком локального ацидозу. У нормальному стані значення рН у тканинах коливаються в межах 7,35–7,45. Проте під час запалення рН у місці ушкодження може знижуватися до значень 6–6,5 [24]. При переломах позаклітинний рН знижується до 6,7–6,9 [25], при внутрішньочеревних інфекціях до значень нижче 7,1 [26], а в різних пухлинах до 6,4–7,0 [27]. Зниження рН у патологічних умовах вважається наслідком накопичення молочної кислоти та вуглекислого газу в уражених тканинах. Натрій-протонні антипортери (NHE) як ключові регулятори внутрішньоклітинного рН і їхній вплив на передачу болю

Внутрішньоклітинний рН (рН_i) є ключовим параметром функціонування клітини, що вимагає жорсткої регуляції [23]. Клітини ссавців постійно мають виводити надлишок протонів, щоб запобігти внутрішньоклітинному ацидозу. Основну роль у цьому процесі відіграють натрій-протонні антипортери (Na⁺/H⁺), які обмінюють позаклітинний Na⁺ на внутрішньоклітинний H⁺ при закисненні клітини. NHE-протеїни поширені як у нейрональних, так і в ненеурональних клітинах. Серед 9 ідентифікованих ізоформ NHE, NHE1 є найбільш поширеною і експресується в нейронах [17, 19]. Інгібітори NHE викликають внутрішньоклітинний ацидоз у дозозалежний спосіб і можуть навіть спричинити загибель клітин [28]. Результати експериментів із реєстрації ПД нервових волокон у препараті «шкіра–нерв» щура показали, що вивільнення іонів H⁺ усередині ноцицептивних нервових закінчень у шкірі за допомогою NPE-захищених протонів (NPE-caged protons; 1 mM), які вивільнялися з хімічного зв'язку шляхом УФ-фотолізу, мало збуджувальний ефект, подібний до такого при застосуванні фосфатно-буферованого або CO₂-насиченого для перфузії (SIF) [29]. За даними досліджень із застосуванням флуоресцентних індикаторів, деполяризація сенсорних нейронів під дією високої концентрації K⁺ або зниження рН позаклітинного середовища супроводжуються зменшенням внутрішньоклітинного рН [30, 31].

Через широке поширення NHE1 у нейронах, включно з ноцицепторами, ймовірно, що цей транспортер може впливати на збудливість нейронів і передачу болю, змінюючи рівень рН усередині клітин. Проте експериментальні дані про вплив блокаторів NHE на активність нейронів, отримані з використанням різних моделей, є дещо суперечливими. Застосування похідних амілориду як неселективного інгібітора сімейства NHE та зоніпориду який є селективним інгібітором NHE дозозалежно підвищувало больову реакцію на формалін у щурів [21]. Водночас експерименти на нейронах DRG показали, що зоніпорид знижує амплітуду сумарних потенціалів дії (compound action potentials, CAP), зареєстрованих у препараті «сідничний нерв – DRG – корінець» щурів [32].

1.2. Роль кислоточутливих рецепторів у ноцицепції: механізми виявлення тканинного ацидозу

Больові стимули (хімічні, механічні та термічні) вперше виявляються закінченнями спеціалізованих периферичних первинних сенсорних нейронів, які називаються ноцицепторами. Ці нервові волокна походять від псевдоуніполярних нейронів малого діаметра, розташованих у DRG. Закінчення первинних сенсорних нейронів виявляють локальні зміни рН і реагують на них деполяризацією, яка вважається початковим пусковим механізмом виникнення болю. Закислення тканин викликає збудження шкірних ноцицепторів без ознак десенсибілізації або адаптації [33, 34]. Підгрупа полімодальних ноцицептивних С-волокон, чутливих до механічного подразнення та болісного тепла (СМН-волокна), має найвищу чутливість до зниження рН. Порогові значення для них були виявлені в діапазоні від рН 6,9 до 6,1, а рівень максимальної генерації ПД при рН 5,2 [14].

Для виявлення змін рН ноцицептори оснащені набором кислоточутливих сенсорів, деякі з яких здатні реагувати на незначні коливання рН, зокрема протон-чутливі йонні канали (acid-sensing ion channels, ASICs), протон-чутливі рецептори, споріднені з G-білками, та двопорові калієві каналів (two-pore domain K^+ channels, K2P). Інші ж, як-от ванілоїдний рецептор перехідного рецепторного потенціалу першого типу (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TRPV1), активуються лише при суттєвому зниженні рН [35]. У багатьох видів ноцицептори є полімодальними, тобто реагують на декілька шкідливих стимулів (наприклад, тепло, тиск, кислоти) завдяки експресії різноманітних рецепторів [36]. Кислоточутливі йонні канали (ASICs) та рецептори TRPV1 вважаються основними сенсорами кислот у ноцицепторах [16]. Рецептори ASIC1a, ASIC1b, ASIC3 та TRPV1 переважно експресуються в DRG-нейронах малого діаметра з високим рівнем коекспресії. Транскрипти ASIC1a виявлені в 20–25% DRG-нейронів; ASIC1b і ASIC3 приблизно в 10% і 30–35% відповідно [18]. Значення рН, за якого досягається 50% максимального рівня активації (pH_{50}), для ASIC1a становить 6,2–6,6; для ASIC1b рН 5,9–6,3; для ASIC3 рН 6,4–6,7 [36]. Сильне

позаклітинне закислення (до $\text{pH} \leq 6,4$) активує весь спектр підтипів ASIC каналів. TRPV1 експресується в 35–40 % DRG-нейронів [18]. TRPV1 є полімодальним йонним каналом, що активується капсаїцином, низкою інших стимулів, а також болісним теплом ($>42^\circ\text{C}$) і протонами [37, 38]. Стійкі струми, опосередковані TRPV1 у відповідь на закислення, мають $\text{pH}_{50} \approx 5,4$. Таким чином, йонні канали TRPV1 і ASIC, що експресуються в DRG-нейронах малого діаметра, є дуже важливими сенсорами позаклітинного ацидозу, які беруть участь у протон-індукованій ноцицепції в межах фізіологічного діапазону pH (нижче 7,3 для ASICs та нижче 6,0 для TRPV1) [39].

TRPV1-рецептор є полімодальним і, окрім зниження pH, також активується підвищенням температури понад 43°C та ванілоїдами, зокрема капсаїцином. Показано, що одночасна дія кількох його активаторів у підпорогових значеннях (зниження позаклітинного pH, підвищення температури та капсаїцин) спричиняє взаємне зниження порога активації TRPV1. Встановлено, що як підвищення температури в межах фізіологічного діапазону, так і застосування капсаїцину у низькій концентрації, недостатній для самостійної активації TRPV1, знижують поріг активації цього рецептора під впливом протонів [40-43].

Висока чутливість ASIC каналів до ацидозу та їхня експресія в первинних сенсорних нейронах вказують на важливу роль цих каналів у кислотно-індукованій ноцицепції [44, 45]. Місцеве введення активаторів ASIC1 та ASIC3 викликає больову поведінку [46, 47], тоді як введення інгібіторів цих каналів чинить анальгезуючу дію [12, 48]. Ці дані свідчать, що ASIC є перспективними мішенями для розробки знеболювальних засобів. Проте відомий блокатор ASIC амілорид демонструє суперечливі ефекти в різних експериментальних моделях [16, 49]. Саме тому в дисертаційному дослідженні було вивчено вплив неамілоридного антагоніста рецепторів ASICs диміназону, а також високоефективного селективного антагоніста рецептора TRPV1 AMG-517 на кислотно-індуковану активацію шкірних ноцицепторів миші *ex vivo*.

1.3. Температурна чутливість периферичних ноцицепторів

Термосенсиори, експресовані в периферичних соматосенсорних нейронах, забезпечують сприйняття широкого діапазону температур навколишнього середовища, який кодується частотою ПД, що виникають у чутливих закінченнях сенсорних нейронів унаслідок активації відповідних термочутливих іонних каналів.

1.3.1. Сенсори шкідливого підвищення температури родини TRP.

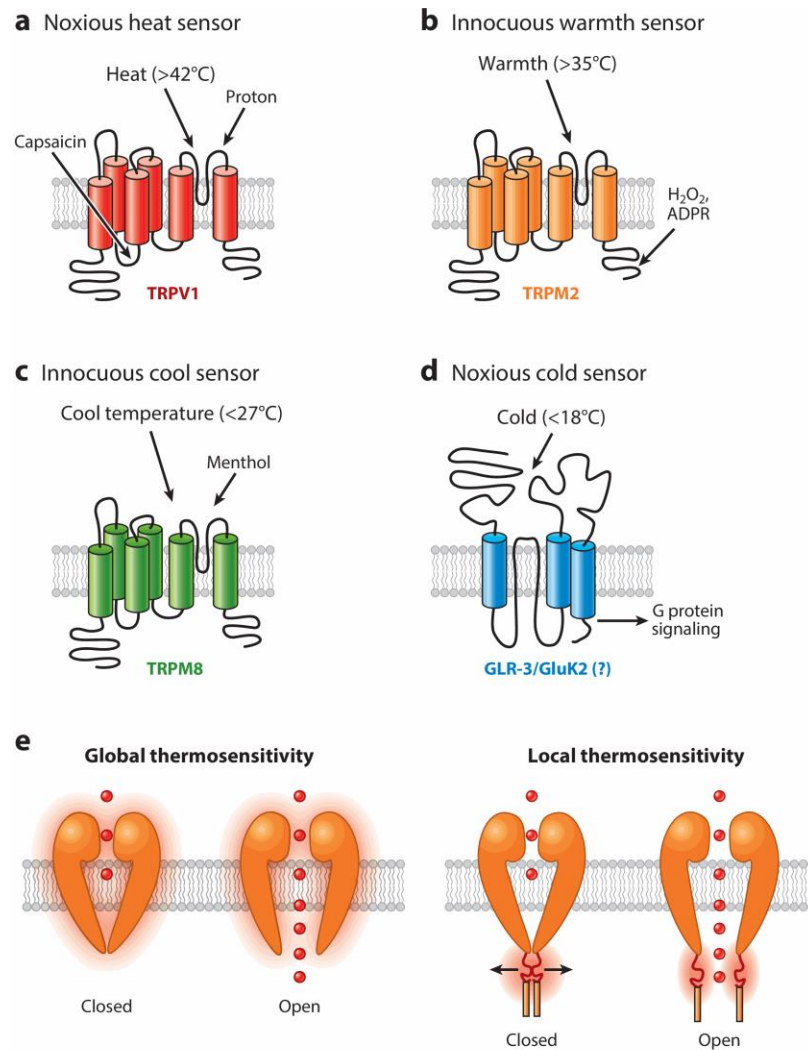
Родина катіонних каналів TRP складається з кількох підродин з ліганд-специфічними властивостями. Рецептори підродини ванілоїдних рецепторів (TRPV) присутні у термочутливих ноцицепторах і відповідають за сенсорну трансдукцію температурних стимулів. Мономери TRPV формують тетрамерні структури із центральною порогою через клітинну мембрану, і ці тетрамери можуть бути гомотетрамерними або гетеротетрамерними залежно від складу чотирьох субодиниць TRPV (рис. 1.1).

Важливим відкриттям в молекулярному механізмі термальної трансдукції було клонування і характеристика температурно активованих TRP іонних каналів. У той час як активність багатьох іонних каналів модулюється температурою, термо-TRP канали відрізняються тим, що температура сама по собі може активувати ці канали [50]. Екстремальні температури, зокрема ноцицептивне тепло та ноцицептивний холод, активують кілька представників сімейства TRP-каналів, експресованих у сенсорних нейронах.

Капсаїцин (8-метил-N-ваніліл-6-нонамід) який міститься у червоному перці (*Capsicum frutescens*), є агоністом TRPV1 рецептора і відіграє ключову роль у його виявленні [37]. TRPV1 експресуються на теплочутливих С-волокнах. Було встановлено, що тепловий поріг активації TRPV1 знаходиться близько 43 °C [37].

Больове відчуття виникає у відповідь на шкідливе тепло при досягненні температурного порогу близько 43–45 °C, що супроводжується гострим різким болем. [51]. Рецептор TRPV1 став ідеальним кандидатом для виявлення шкідливої теплоти. Згодом було клоновано і характеризовано інші теплочутливі іонні канали із родини рецепторів транз'єнтного потенціалу (TRP). Миші з нокаутом TRPV1 характеризуються зниженою чутливістю до шкідливого тепла у тестах гострої теплової ноцицепції та запальної теплової гіпералгезії [52, 53]. Водночас, навіть за відсутності цього рецептора тварини зберігають здатність реагувати на нагрівання. Крім того, у препаратах шкіра–нерв мишей з нокаутом TRPV1 також реєстрували активацію сенсорних аферентів тепловими стимулами [52, 54, 55].

TRPV2 експресуються переважно на теплочутливих A δ -волокнах, де вони активуються при шкідливому підвищенні температури (понад 52 °C) і беруть участь у детекції ноцицептивного тепла. Функціональний аналіз у гетерологічній системі експресії цього трансмембранного каналу у клітинах ссавців і ооцитах *Xenopus* показав, що TRPV2 нечутливий до капсаїцину та має вищий поріг активації від тепла, > 52 °C [56]. Хоча такі високі базові пороги вказують на неактивність за фізіологічних умов, температури, необхідні для стимуляції каналів TRPV, можуть бути значно знижені під час запалення, тобто фізіологічно регулюються.



Xiao R, Xu XZS, 2021
Annu. Rev. Physiol. 83:205–30

Рис. 1.1. Молекулярні термосенсиори, що беруть участь у сприйнятті температури. Скорочення: ADPR — аденозиндифосфатрибоза [46].

Коли TRPV1 і TRPV2 активуються при достатньо високих температурах, їхні канали відкриваються, забезпечуючи вхід іонів кальцію та інших катіонів у нейрон і спричиняючи деполяризацію мембрани. Хоча TRPV1 і TRPV2 мають підвищену проникність для Ca^{2+} , за своєю природою вони є невивірковими катіонними каналами. Деполяризація мембрани, викликана входом катіонів, активує потенціалзалежні натрієві канали, що призводить до генерації ПД. Окрім виявлення больового теплового стимулу, TRPV-рецептори здатні реагувати на широкий спектр хімічних сполук. До лігандів TRPV1 належать, капсаїцин і резиніфератоксин (натуральні продукти), анандамід (ендогенний ліпідний

медіатор), ольваніл (синтетичний аналог капсаїцину) та протони (ацидоз). Чутливість TRPV до капсаїцину і ацидозу ілюструє полімодальну чутливість ноцицепторів, яку спостерігають *in vivo* і може пояснювати, чому такі подразники спільно викликають відчуття пекучого болю [57]. TRPV1 і TRPV2 знаходяться як у центральних і периферійних нервових системах, так і в селезінці та легенях.

1.3.2. Сенсори нешкідливого тепла родини TRP.

Хоча кілька термочутливих каналів родини TRP мають пороги активації в діапазоні теплих температур на культурах клітин *in vitro*, дослідження із блокуванням рецепторів цієї родини свідчать про те що вони не є єдиним сенсорами тепла у фізіологічному діапазоні.

TRPV3 і TRPV4 експресуються не лише в нервовій системі, а й у шкірі, спермі та багатьох внутрішніх органах. Встановлено, що пороги їх активації знаходяться в межах 34–38 °C для TRPV3 та 27–34 °C для TRPV4 [46, 50], що робить ці канали потенційними сенсорами нешкідливих теплових стимулів, які не викликають больового відчуття.

Однак миші з подвійною делецією генів *Trpv3* і *Trpv4* демонстрували поведінку теплового вибору, подібну до тварин дикого типу на тепловому градієнті, а також не мали або мали лише мінімальні зміни у гострій тепловій ноцицепції та запальній тепловій гіпералгезії. Це свідчить про те, що білкові продукти цих генів, а саме канали TRPV3 і TRPV4, не є критично необхідними для базового сприйняття температурних стимулів. Інгібування TRPV1 за допомогою його антагоніста JNJ-17203212 не виявило відмінностей між тваринами із дефіцитом TRPV3 і TRPV4 та їхніми представниками дикого типу [47]. Отримані результати підтримують припущення, що TRPV3 і TRPV4 роблять обмежений і внесок у сприйняття нешкідливих теплових стимулів або шкідливого тепла, навіть у разі блокади TRPV1. Це, своєю чергою, вказує на існування інших значущих механізмів термосенсорики.

TRPM2 має поріг температурної активації близько 35 °C та коефіцієнт температурної чутливості Q_{10} приблизно 15,6 [48]. Завдяки експресії як у периферичній, так і в центральній нервовій системі, TRPM2 бере участь у сприйнятті тепла [58, 59]. Під час тесту температурної переваги було показано, що миші дикого типу уникають температури 38 °C, тоді як миші з нокаутом гена *Trpm2* такої поведінки не виявляють, що свідчить про участь TRPM2 у периферичному сприйнятті тепла. Примітно, що частина нейронів DRG у мишей з нокаутом *Trpm2*^{-/-} все ще активується у відповідь на нагрівання, незважаючи на нечутливість до агоністів каналів TRPV1–4 та TRPM3. Це вказує на можливу наявність інших теплових сенсорів у периферичній нервовій системі [58]. З іншого боку, хоча TRPM2 розглядається як сенсор тепла *in vivo*, у підпопуляції дисоційованих нейронів DRG та трійчастого ганглія (TG) він функціонує як сенсор шкідливого тепла, оскільки його поріг активації зсувається до діапазону понад 45 °C з невідомих причин [60, 61]. Чи бере TRPM2 участь у сприйнятті шкідливого тепла *in vivo*, наразі залишається відкритим питанням.

1.3.3. P2X3 рецептори приймають участь у кодуванні тепла у нешкідливому температурному діапазоні.

АТФ, що вивільняється з ушкоджених або запалених тканин, може взаємодіяти з рецепторами P2X3 – підтипом АТФ-керованих катіонних каналів, які експресуються в первинних аферентних нейронах. Рецептори P2X3 виявлено в підмножині первинних аферентних нейронів із тілами малого діаметра – спеціалізованими ноцицептивними нейронами [62, 63]. Одним із ключових рецепторів для АТФ є іонний канал P2X3, який вибірково експресується в ноцицепторах. P2X3 належить до групи семи катіон-селективних іонних каналів, що відкриваються під дією АТФ. У мишей дикого типу основними трансмембранними сенсорами для АТФ є гомомультимери P2X3 або гетеромультимери P2X2/3. Відсутність функціональної експресії рецептора P2X1 підтверджується тим, що в сенсорних нейронах мишей з нокаутом гена P2X3

(P2X3^{-/-}) агоніст α, β -метил-АТФ не викликав активації [64]. Видалення гена P2X3 призводить до зникнення катіонних струмів, які активуються АТФ і характеризуються швидкою десенситизацією [64]. Незважаючи на це, миші з нокаутом P2X3 демонструють нормальну сенсомоторну функцію, а також збережені поведінкові реакції на шкідливі механічні й теплові стимули. Однак між мишами дикого типу та P2X3^{-/-} було виявлено відмінності у відповідях на теплові стимули.

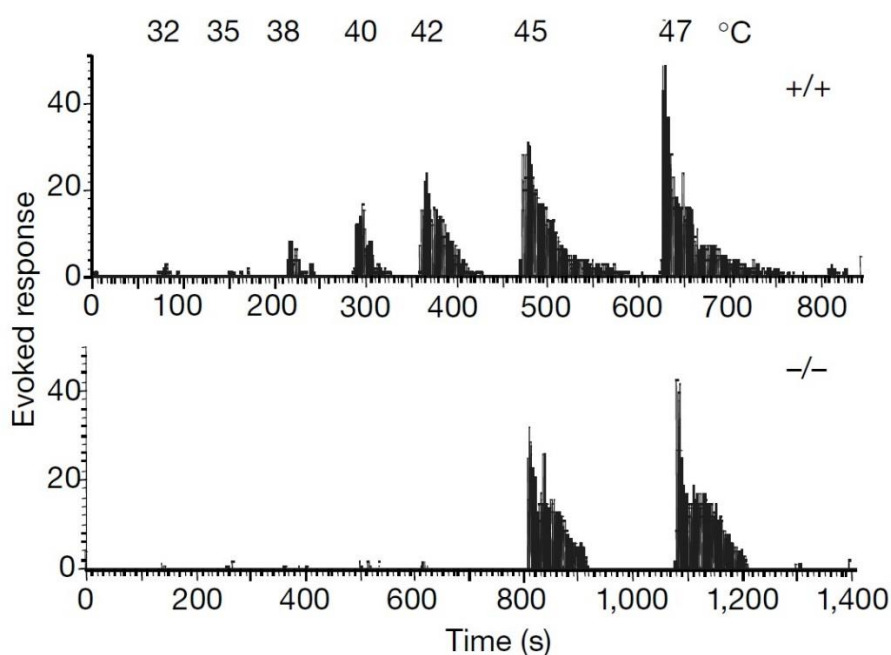


Рис. 1.2. Позаклітинні *in vivo* записи електричної активності конвергентних нейронів дорсального рогу спинного мозку мишей дикого типу (P2X3^{+/+}, зверху) та мишей з нокаутом гена P2X3^{-/-} (знизу) у відповідь на теплові стимули (32–47 °C, 10 с) [64].

Застосування спектра теплових стимулів до підшви лапки мишей дикого типу спричиняло градуйовану нейрональну відповідь у дорсальному розі спинного мозку, тоді як у мутантних тварин спостерігався дефіцит у здатності кодувати інтенсивність нешкідливих теплових стимулів. Це свідчить про те, що у мишей з нокаутом P2X3 порушене кодування інтенсивності неноксичних теплових подразників (рис. 1.2, 1.3).

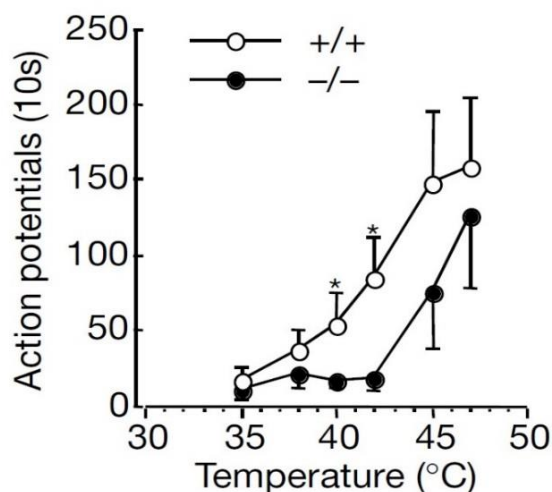


Рис. 1.3. Криві залежності електричної активності конвергентних нейронів дорсального рогу спинного мозку мишей дикого типу та мишей $P2X3^{-/-}$ у відповідь на тепловий стимул [64].

Також гомомерні рецептори $P2X3$ характеризуються швидкою десенсибілізацією: після активації агоністом процес десенсибілізації завершується менш ніж за 500 мс, тоді як відновлення рецепторів після десенсибілізації є вкрай повільним і триває 20–25 хвилин при кімнатній температурі [65]. Дослідження температурної залежності функціональних властивостей $P2X3$ -рецепторів виявило їхню аномальну термочутливість. Зокрема, розвиток десенсибілізації не залежить від температури у діапазоні від 25 до 40 °C, тоді як швидкість відновлення рецепторів після десенсибілізації значно зростає зі збільшенням температури.

На рисунку 1.4 показано, що АТФ-індукований струм у нейронах задніх корінцевих гангліїв при концентрації 10 μM АТФ залишається десенсибілізованим через 5 хв після первинної активації агоністом за температури 25 °C. Нагрівання клітини до 35 °C протягом 1 хв призводить до повного відновлення відповіді [66].

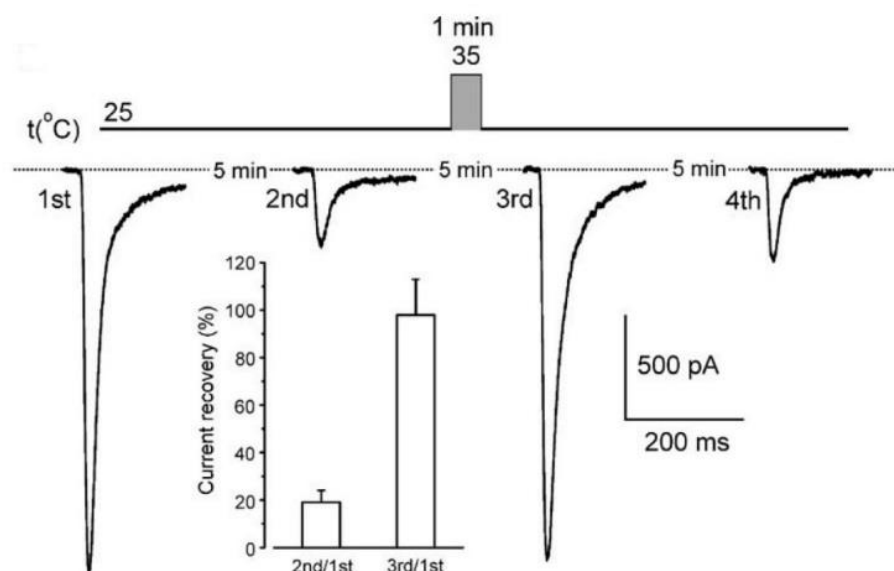


Рис. 1.4. Відновлення рецепторів P2X3 після десенсибілізації [66].

Швидкість відновлення P2X3-рецепторів після десенсибілізації характеризується високим температурним коефіцієнтом ($Q_{10} \approx 10$; рис. 1.5)[66]. Механізм десенсибілізації P2X3-рецепторів пов'язаний із формуванням високоафінного сайту зв'язування (HABS) для АТФ. Із підвищенням температури від 25 до 35 °С чутливість цього сайту до АТФ знижується приблизно у чотири рази. Сам високоафінний сайт також зазнає повільної десенсибілізації, частково втрачаючи здатність зв'язувати АТФ. Проте за температури 35 °С у присутності 3 нМ АТФ відповідь рецепторів повністю відновлюється протягом 10 хвилин, що забезпечує їхню функціональність навіть за концентрацій АТФ до 30 нМ. Таким чином, за умов, близьких до фізіологічної температури, P2X3-рецептори здатні відновлювати свою активність після гальмування через HABS і залишаються функціональними у присутності низьких, але фізіологічно релевантних концентрацій фонового АТФ [66]. Незвичайне поєднання температурної чутливості і нечутливості в різних фазах активації та відновлення P2X3-рецепторів може пояснювати їхню специфічну роль у сенсорній обробці температурних сигналів, що було підтверджено у дослідженнях із використанням нокаутних P2X3 мишей.

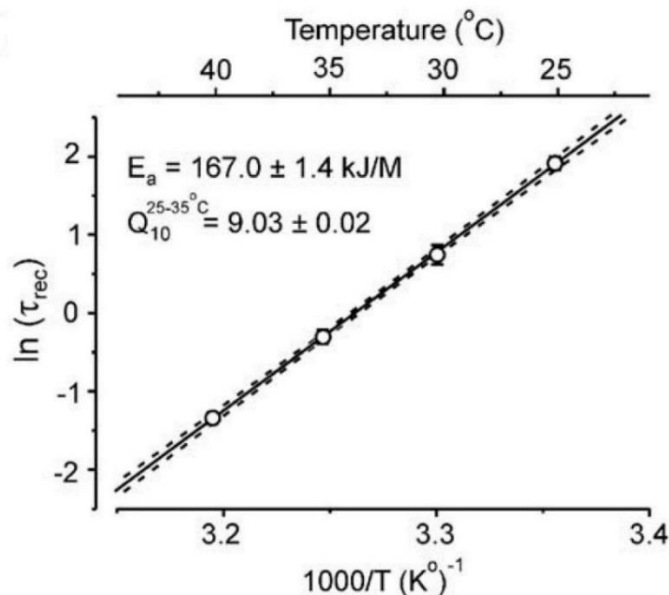


Рис. 1.5. Графік Арреніуса температурної залежності сталої часу відновлення після десенсибілізації (τ_{rec})[66].

Таким чином, рецептор P2X3 не відіграє провідної ролі в механочутливій ноцицепції та гострих больових реакціях, однак бере участь у процесах кодування нешкідливих теплових стимулів, що вказує на його несподівану фізіологічну функцію.

1.4. Чутливість периферичних ноцицепторів до охолодження.

Охолодження полегшує больові відчуття, у той час як сильне охолодження, навпаки, може викликати біль. Активність термочутливих нервових волокон реєстрували за допомогою електрофізіологічних методів. Показано, що холодочутливі і теплочутливі рецептори у різних видів ссавців переважно локалізовані на чутливих закінченнях C-волокон і у меншій мірі на A δ -волокнах [31, 51]. Чутливість до холоду мають також у деяких повільноадаптуючі нервові аференти (slowly adapting, SA)[67]. Подальше зниження температури рецепторного поля до 0 °C активує більшість ноцицептивних аферентних волокон у гризунів [1]. Таким чином, більшість ноцицепторів є холодочутливими і мають

різний поріг активації у відповідь на шкідливе охолодження. До 40 % полімодальних ноцицепторів шкіри людини виявляють чутливість до шкідливого зниження температури до 0 °C [2]. Вважається, що біль від холоду обумовлений активацією саме високопорогових холодочутливих ноцицепторів. Натомість інтенсивність відчуття болю у відповідь на шкідливе нагрівання залежить від активації певної пропорції Аδ- та С-ноцицепторних волокон [51].

Електрофізіологічні записи від нервових волокон шкіри показали, що пропорція теплочутливих Аδ-волокон шкіри гризунів коливається в межах від 0 до 21 %, тоді як частка теплочутливих С-ноцицепторів становить від 30 до 70 % [9]. Електрофізіологічне дослідження малогомілкового нерва людини показало, що близько 45 % механо-чутливих С-волокон є також чутливими до тепла (mechano-heat sensitive C-fibers, CMH)[7].

Ідентифіковані холодно-активовані TRP канали: ментоловчутливий рецептор TRPM8 (раніше відомий як CMR1) і TRPA1 (раніше відомий як ANKTM1). У гетерологічних системах TRPM8 має поріг активації між 25-28 °C, що схоже на діапазон температур, при яких активуються неноцицепторні холодочутливі волокна. TRPA1, з іншого боку, активується холоднішими температурами, близько 17 °C [50]. Небольові холодні подразники, отже, вважаються результатом активації TRPM8 рецепторів, тоді як болісні холодні подразники вважаються обумовленими активацією TRPA1 рецепторів.

На рисунку 1.6 показано основні термочутливі TRP трансмембранні іонні канали. Під кожним каналом наведено їх зареєстровані температурні пороги та температурний діапазон, на який вони реагують під час дослідження в гетерологічних системах. Теоретично ці канали можуть пояснити виявлення всіх типових теплових подразників, від шкідливого холоду до шкідливого тепла.

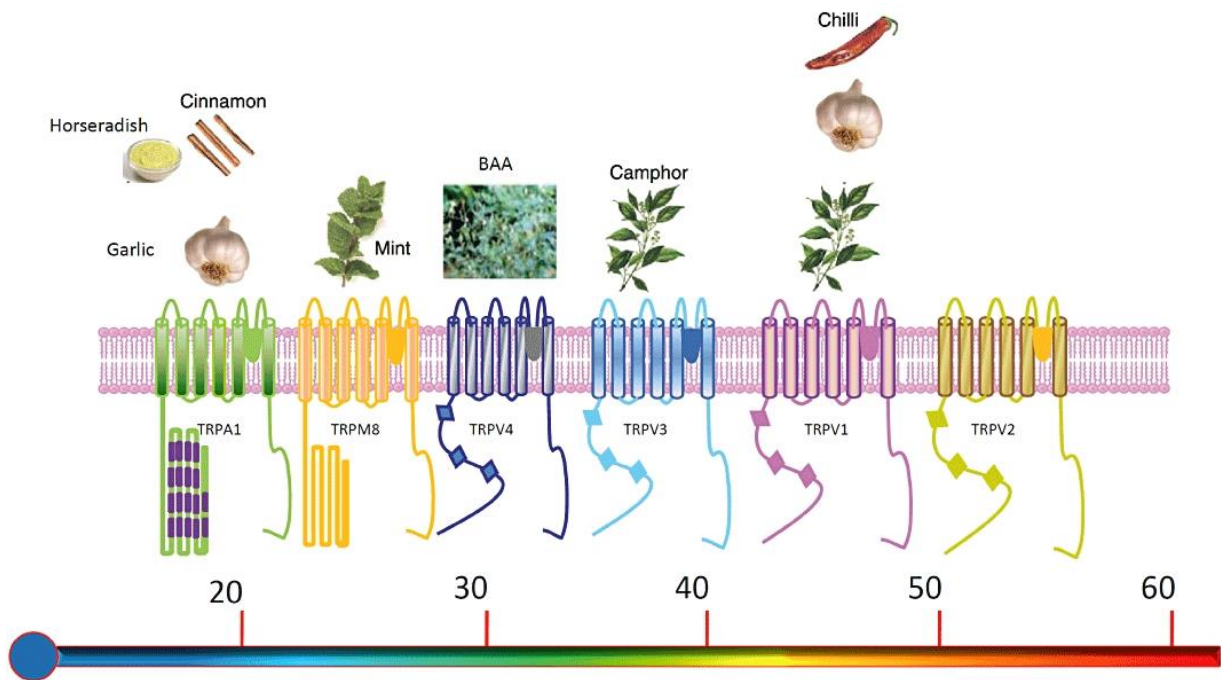


Рис. 1.6. Термочутливі TRP трансмембранні іонні канали [67].

Нещодавно встановлено, що GluK2, глутамат-чутливий рецептор, який зазвичай забезпечує синаптичну передачу у ЦНС, може також виконувати функцію холодочутливого терморецептора у периферичній нервовій системі. Дослідження на мишах із нокаутом GluK2 показали, що такі тварини зберігають нормальну реакцію на теплові та механічні стимули, але мають селективний дефіцит у сприйнятті шкідливого холоду (нижче 18 °C), тоді як реакції на помірно прохолодні температури залишаються незмінними. Ці результати підтверджують ключову роль GluK2 у холодовій ноцицепції та розширюють уявлення про функціональну різноманітність глутаматних рецепторів у сенсорних нейронах [68].

1.5. Вплив локального охолодження на больову чутливість

Охолодження тканин підвищує больовий поріг та знижує нервову активність впливаючи на такі показники як: поріг активації, рефрактерність, часову константу сили-тривалості, реобазу (мінімальну амплітуду електричного струму яка викликає ПД) та швидкість проведення нервового імпульсу [69,

70]. Нагрівання шкіри до субпорогових температур відчуття теплового болю посилює відчуття кислотного болю у людини, тоді як охолодження шкіри призводить має протилежну дію значно полегшуючи больові відчуття [12]. Охолодження широко застосовують для полегшення болю при травмах і опіках, що вказує на вплив температури на передачу нервових ноцицептивних сигналів. Зниження температури шкіри людини до 10 °C зменшує імпульсацію А- і С-волокон у відповідь на механічну стимуляцію їх рецепторних полів [30]. Локальне охолодження пошкоджених тканин також ефективно зменшує біль при лікуванні травм та запалень у медицині, оскільки це дешевий, швидкодіючий, нетоксичний, ефективна процедура яка не несе ризику сенситизації [13, 71]. Холод широко використовувався для полегшення болю з 3500 р. до н.е. і до сьогодні [72], однак наукові докази з клінічних досліджень все ще залишаються фрагментарними [73].

1.6. Сучасні експериментальні моделі у вивченні больової чутливості

Біль визначається як неприємне сенсорне та емоційне переживання, пов'язане з актуальним або потенційним ушкодженням тканин [74]. Початкова фаза сприйняття болю, відома як ноцицепція, включає перетворення шкідливих або потенційно шкідливих стимулів у нервові імпульси на чутливих закінченнях сенсорних нейронів. Сигнал болю, інтенсивність якого пропорційна частоті ПД, передається через спинний мозок до головного мозку, де й формується усвідомлене відчуття болю.

Ефективне знеболення є одним із ключових завдань сучасної медицини, що здебільшого реалізується фармакологічними методами. Тому пошук нових анальгетиків залишається актуальним і надзвичайно важливим напрямом досліджень. Отримання експериментальних даних щодо ефективності анальгетиків не лише сприяє розробленню нових терапевтичних підходів, а й поглиблює розуміння молекулярних механізмів больової чутливості. Хоча за допомогою генетичних і електрофізіологічних методів було ідентифіковано низку

ключових ноцицептивних рецепторів, складна інтеграція механізмів ноцицепції в сенсорних нейронах залишається недостатньо охарактеризованою.

На сьогодні у дослідницьких лабораторіях застосовують широкий спектр експериментальних моделей для вивчення ноцицепції, кожна з яких має власні переваги та певні обмеження. Моделі *in vitro*, зокрема гетерологічні системи експресії та первинні культури клітин, дають змогу детально досліджувати біофізичні та фармакологічні властивості іонних каналів і рецепторів, таких як TRPV1, P2X та ASIC. Такі моделі забезпечують високий рівень контролю над експериментальними параметрами й особливо придатні для високопродуктивного фармакологічного скринінгу з метою пошуку нових анальгетичних сполук. Водночас їхня редуцціоністська природа, тобто спрощення складної біологічної системи до окремих компонентів, виключає важливі міжклітинні взаємодії та складне мікросередовище, характерне для природних тканин [75, 76].

Моделі *ex vivo*, зокрема інтактні ганглії, препарати типу «шкіра–нерв» і «шкіра–нерв–DRG», поєднують переваги підходів *in vitro* та *in vivo*, зберігаючи анатомічні та функціональні взаємозв'язки між нейронами, гліальними клітинами та сполучнотканинними структурами. Такі моделі дозволяють проводити більш фізіологічно релевантні електрофізіологічні записи й забезпечують можливість застосування контрольованих хімічних, термічних або механічних стимулів безпосередньо до сенсорних нервових закінчень. Проте їх використання пов'язане з певними труднощами, зокрема з обмеженою життєздатністю тканин, складністю підтримання цілісності аксонів і технічними обмеженнями доступу до тіл нейронів [77].

Моделі болю *in vivo* на гризунах є найбільш комплексним підходом до дослідження ноцицепції, оскільки вони інтегрують процеси периферичної та центральної нервової систем, а також враховують вплив ендокринних, імунних і судинних факторів. Поведінкові тести, від гострих (тест «гарячої пластини», тест «відсмикування хвоста») до хронічних моделей, таких як формаліновий тест, надають цінну інформацію про реакції цілісного організму на больові стимули. Водночас складність моделей *in vivo* зумовлює появу додаткових змінних,

зокрема неспецифічних ефектів препаратів, стресових реакцій і вродженої схильності тварин до маскування болю, що ускладнює інтерпретацію результатів виключно як прояв анальгетичної дії [78, 79].

Порівняльний аналіз цих підходів підкреслює основний компроміс між рівнем експериментального контролю та фізіологічною релевантністю. Моделі *in vitro* забезпечують високий ступінь деталізації та відтворюваність, тоді як *ex vivo* й *in vivo* системи краще відображають інтегровані реакції цілісних біологічних структур. Отже, опора лише на один метод може призвести до неповних або навіть хибних висновків. Багаторівнева експериментальна стратегія, яка об'єднує дані, отримані на клітинному, тканинному та організмовому рівнях, створює більш надійну основу для розуміння ноцицепції та оцінки анальгетичного потенціалу фармакологічних засобів.

Подальші дослідження мають бути спрямовані на вдосконалення існуючих моделей і розроблення інтегративних підходів, що дозволяють узгоджувати відмінності між експериментальними системами. Технічний прогрес, зокрема вдосконалення методів реєстрації електричної активності та застосування сучасних методів візуалізації, відкриває нові можливості для глибшого розуміння механізмів болю. Зрештою, комплексний міжметодичний підхід є ключовою передумовою успішного перенесення доклінічних результатів у ефективні клінічні стратегії лікування болю.

1.6.1. Застосування patch-clamp-методу в гетерологічних експресійних системах для дослідження іонних каналів

Гетерологічні експресійні системи, такі як клітини HEK293, ооцити *Xenopus laevis* та клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), стали універсальною платформою для дослідження широкого спектра іонних каналів і рецепторів. Вони дають змогу детально аналізувати функціональні властивості окремих білків, моделювати вплив мутацій і порівнювати особливості каналів різного походження, включно з білками людини. Метод patch-clamp є «золотим

стандартом» електрофізіології, що дозволяє реєструвати цілісноклітинні або одиничноканальні струми крізь мембрану через відкриті іонні канали. Використання режиму voltage clamp забезпечує контроль мембранного потенціалу та точне вимірювання параметрів іонних струмів [80]. Найпоширенішою конфігурацією є режим «цілої клітини» (whole-cell patch-clamp), який дозволяє контролювати як внутрішньоклітинне, так і позаклітинне середовище, водночас реєструючи сумарну активність каналів на мембрані окремої клітини.

Метод patch-clamp застосовується як у класичних неавтоматизованих експериментах, що дають змогу вивчати механізми роботи іонних каналів з високою точністю, так і у форматі високопродуктивного скринінгу з використанням автоматизованих систем для пошуку нових фармакологічно активних сполук.

Гетерологічні системи також дозволяють відстежувати зміни концентрації внутрішньоклітинних іонів за допомогою флуоресцентних барвників [81], що також застосовується у високопродуктивному скринінгу хімічних бібліотек. Експресія мембранних білків у ненейрональних клітинах дозволяє вивчати біофізичні та фармакологічні властивості окремих трансмембранних білків у ізоляції, без впливу інших клітинних структур. Така ізоляція підвищує відтворюваність експериментів, але водночас є обмеженням, адже в природних сенсорних нейронах ноцицептивні рецептори та інші мембранні комплекси функціонують у складі інтегрованої системи, яка забезпечує сприйняття, збудження і передачу сенсорної інформації [82].

1.6.2. Первинні культури нейронів спинальних гангліїв як модель для електрофізіологічних досліджень ноцицепторів

Первинні культури нейронів DRG широко застосовуються для дослідження процесів передавання сигналів, динаміки іонних каналів і рецепторів, вивільнення нейромедіаторів, візуалізації внутрішньоклітинних іонів та біохімічних змін на рівні окремих клітин або нейронних мереж. Цей підхід *in vitro* долає низку

обмежень досліджень *in vivo* [83, 84] і водночас зберігає більшість трансмембранних білків, характерних для сенсорних нейронів у природному середовищі. Клітинні культури DRG є цінною моделлю для електрофізіологічних досліджень із використанням методу patch-clamp, який забезпечує реєстрацію іонних струмів через окремі канали. Сенсорні нейрони можна аналізувати як безпосередньо після ізоляції, так і після кількох днів культивування, що надає гнучкості у плануванні експериментів. Хоча вважається, що рецепторно-канальні комплекси на сомі нейрона подібні до тих, що локалізовані на периферичних нервових терміналях, їхня функціональна ідентичність залишається дискусійною. Як і в гетерологічних системах, потоки іонів також можна візуалізувати оптичними методами із застосуванням флуоресцентних барвників.

Попри численні переваги, цей підхід має суттєві обмеження. По-перше, він не дозволяє безпосередньо досліджувати іонні канали та рецептори людини, які можуть відрізнятися за фармакологічними й біофізичними властивостями від аналогів у гризунів. Створення культур DRG-нейронів потребує ензиматичної обробки та механічної дисоціації, унаслідок чого видаляються аксони й супутні гліальні клітини (satellite glial cells, SGC), які у природному середовищі тісно взаємодіють із нейронами [85]. Таке роз'єднання та втрата аксонів змінюють фенотип клітин і їх мембранну збудливість [86]. Втрата міжклітинних взаємодій між нейронами та гліальними клітинами, важливих як у нормальних умовах, так і при патологіях, зокрема за хронічного болю [87], знижує фізіологічну релевантність отриманих культур. Крім того, умови *in vitro* можуть впливати на експресію мембранних білків [88], що ще більше віддаляє такі нейрони від їхніх *in vivo* аналогів.

1.6.3. Інтектні сенсорні ганглії *ex vivo* як модель для електрофізіологічного дослідження нейрон-гліальних взаємодій

Реєстрація електричної активності нейронів у інтактних сенсорних гангліях *ex vivo* дає змогу досліджувати DRG-нейрони в умовах, максимально наближених до природного середовища, зберігаючи зв'язок між тілами нейронів, оточувальними гліальними клітинами та базальною мембраною ганглія, чого неможливо досягти в дисоційованих культурах.

Супутні гліальні клітини повністю оточують сому нейрона [85], утворюючи метаболічний бар'єр, який підтримує життєздатність нейронів і формує мікросередовище для нейро-гліального обміну через вивільнення нейромедіаторів і сигнальних молекул, тим самим модулюючи нейрональну активність [87]. Електрофізіологічні дослідження показали, що нейрони у інтактних DRG *ex vivo* мають вищу реобазу та вхідний опір порівняно з культурами *in vitro*, що свідчить про зміну мембранної збудливості після дисоціації [77, 89]. Крім того, нейрони, оточені гліальними клітинами, демонструють слабшу відповідь на АТФ, глутамат, γ -аміномасляну кислоту (ГАМК) та брадикінін, ніж клітини, позбавлені гліального покриття [90].

Метод має низку переваг. Аксони зберігаються у складі ганглія, і підготовка препарату потребує мінімальної ензиматичної обробки, на відміну від повної дисоціації клітин *in vitro*. Препарати інтактних DRG дорослих щурів залишаються життєздатними протягом 6–8 годин, забезпечуючи стабільний часовий інтервал для електрофізіологічних вимірювань. Екстрацелюлярна реєстрація електричної активності може здійснюватися за допомогою всмоктуючих або металевих електродів, а індивідуальні нейрони та гліальні клітини можуть досліджуватися методом *patch-clamp*. Також можлива хімічна стимуляція клітин ганглія або стимуляція збережених аферентних і еферентних корінців за допомогою всмоктуючих електродів, що ефективно імітує збудження нервових волокон *in vivo*.

Попри переваги, метод має певні обмеження. Метаболічний бар'єр, сформований гліальними клітинами, ускладнює доступ patch-піпетки до сом нейронів і може обмежувати дифузію хімічних агентів. Крім того, під час ізоляції DRG перерізаються дорсальні корінці та спинальні нерви, що порушує цілісність аксонів і може призводити до похибок у реєстрації електричної активності. Підтримання рівномірного потенціалу між сомою та аксоном є складним завданням і може спричиняти артефакти у режимі фіксації напруги. Нарешті, для отримання доступу до нейронів DRG необхідно видалити залишки сполучної тканини з поверхні ганглія за допомогою протеолітичних ферментів, що може ненавмисно змінити властивості клітин або пошкодити поверхневі шари [77].

1.6.4. Модель “шкіра–нерв” *ex vivo*: можливості електрофізіологічного дослідження електричної активності ноцицептивних аферентів

Шкіра є найбільшим сенсорним органом, густо іннервованим нервовими закінченнями, які формують безперервне рецептивне поле, передаючи інформацію про дотик, температуру, свербіж, печіння і біль до центральної нервової системи. Така складна іннервація робить шкіру відмінною моделлю як для електрофізіологічних, так і для фармакологічних досліджень первинного сенсорного сприйняття *in vivo* та *ex vivo*.

Одним із найдавніших електрофізіологічних методів є позаклітинна реєстрація електричної активності аферентних нервових волокон у анестезованих тварин. Цей підхід дає змогу досліджувати нервові волокна в їхньому природному фізіологічному середовищі. Однак його основним обмеженням є складність контрольованого нанесення речовин безпосередньо на рецептивні поля сенсорних закінчень.

На противагу цьому, позаклітинна реєстрація *ex vivo* забезпечує кращий контроль над концентрацією хімічних речовин, що наносяться безпосередньо на рецептивні поля нервових закінчень. Для гризунів розроблено різні методики

електрофізіологічної реєстрації із використанням препаратів «шкіра–нерв», які зазвичай передбачають вирізання ділянки шкіри разом із нервом, що її іннервує. Найпоширенішою моделлю є тильна частина шкіри задньої лапи мишей або щурів, іннервована підшкірним нервом (n. saphenus) [8, 91]. Порівняльні дослідження показали, що характеристики електричної активності аферентних волокон підшкірно-стегнового нерва є подібними при реєстрації як *in vivo*, так і *ex vivo* протягом 12 годин [92]. Ця підшкірна ділянка, яку іннервує n. saphenus, також є типовим місцем ін'єкцій формаліну, що викликає характерну двофазну больову поведінкову відповідь у формаліновому тесті *in vivo* [93]. Важливо, що дві фази больової поведінки у відповідь на ін'єкцію формаліну у гризунів корелюють із двома фазами електричної активності (генерації ПД) ноцицептивних аферентів, зареєстрованої в моделі «шкіра–нерв» *ex vivo* у щурів [94]. Така кореляція дозволяє безпосередньо порівнювати поведінкові прояви та електрофізіологічну активність, зареєстровану *ex vivo*, а також зіставляти їх із даними досліджень сенсорних нейронів *in vivo* та *in vitro*, що сприяє глибшому розумінню механізмів ноцицепції та больової чутливості.

Метод електрофізіологічної реєстрації електричної активності аферентів *ex vivo* має значні переваги над підходами *in vivo*. Він дає змогу стимулювати рецептивні поля сенсорних закінчень контрольованими, кількісно визначеними стимулами різної модальності. Безперервна перфузія шкіри забезпечує точне нанесення речовин у заданих концентраціях та дає змогу швидко змінювати розчини, що особливо корисно у фармакологічних дослідженнях.

Хоча ноцицептивні аксони у шарі кератиноцитів формують вільні нервові закінчення, досі не цілком зрозуміло, наскільки рецепторні властивості сенсорних нейронів, зареєстрованих *in vitro*, відповідають властивостям природних нервових закінчень, інтегрованих у тканинну архітектуру шкіри [95]. Традиційно вважалося, що ці ноцицептивні закінчення функціонують автономно, без спеціалізованих рецепторних клітин. Проте останні дослідження свідчать, що кератиноцити можуть активно брати участь у передаванні та модуляції ноцицептивних сигналів [96].

Реєстрація електричної активності окремих аферентних нервових волокон у препараті «шкіра–нерв» *ex vivo* є потужним інструментом для дослідження властивостей сенсорних нервових закінчень, механізмів периферичної чутливості та ефективності анальгетичних засобів, спрямованих на ноцицептивні терміналі. Хоча ця техніка дозволяє реєструвати ПД, що поширюються вздовж нервових волокон, вона не дає змоги безпосередньо вимірювати електрохімічні градієнти чи мембранні потенціали у точках генерації ПД на периферичних нервових закінченнях у шкірі. Таким чином, природні периферичні ноцицептивні закінчення залишаються недоступними для прямого дослідження методом patch-clamp.

1.6.5. Інтегрована *ex vivo* модель “шкіра–нерв–спинальний ганглій” для реєстрації електричної активності сенсорних нейронів

Модель препарату миші «шкіра–нерв–спинальний ганглій» *ex vivo* є високоточним інструментом, який поєднує переваги методів patch-clamp та позаклітинної реєстрації електричної активності сенсорних нейронів, відкриваючи унікальні можливості для електрофізіологічного моніторингу електричної активності нейронів DRG в умовах, що максимально зберігають природні зв'язки.

У цьому препараті зберігаються інтактна шкіра, іннервуючий її нерв та прикріплений DRG, що дозволяє стимулювати рецептивні поля сенсорних нейронів у шкірі та одночасно реєструвати їх електрофізіологічні відповіді. Така подвійна реєстрація дає змогу глибоко досліджувати інтеграцію сенсорних сигналів на рівні DRG, поєднуючи інформацію про внутрішні електричні властивості нейронів (метод patch-clamp) із загальною аферентною активністю, зареєстрованою позаклітинно [97].

Однією з головних переваг цього підходу є збереження природного мікросередовища сенсорних нейронів. На відміну від дисоційованих культур,

препарат *ex vivo* зберігає анатомічні та функціональні зв'язки між нейронами, гліальними клітинами та сполучною тканиною, що має вирішальне значення для розуміння інтегративних властивостей інтактних нейронів DRG. Ця модель дозволяє досліджувати складні взаємодії, які беруть участь у сенсорній обробці, зокрема модуляцію збудливості нейронів з боку гліальних клітин та компонентів позаклітинного матриксу. Коли препарат «шкіра–нерв–спинальний ганглії» поєднується із сегментами спинного мозку *ex vivo*, зберігається повний сенсорний шлях, від периферичного сенсорного входу до центральної обробки сигналу. (рис. 1.7). Така інтегрована модель особливо цінна для вивчення передачі аферентних сигналів до спинного мозку та аналізу змін у цій передачі за патологічних умов, зокрема після травм спинного мозку. Наприклад, цей препарат використовували для характеристики змін електричної активності аферентів сенсорних нейронів та синаптичної передачі після травми, що дало змогу краще зрозуміти механізми формування болю та сенсорних порушень [98]. Попри численні переваги й статус однієї з найінформативніших моделей для дослідження ноцицепції, препарат «шкіра–нерв–DRG» зі спинним мозком *ex vivo* є технічно складним у виконанні. Процедури препарування та підтримання цілісності тканин вимагають високої точності, щоб уникнути порушення функціональних зв'язків сенсорного шляху.

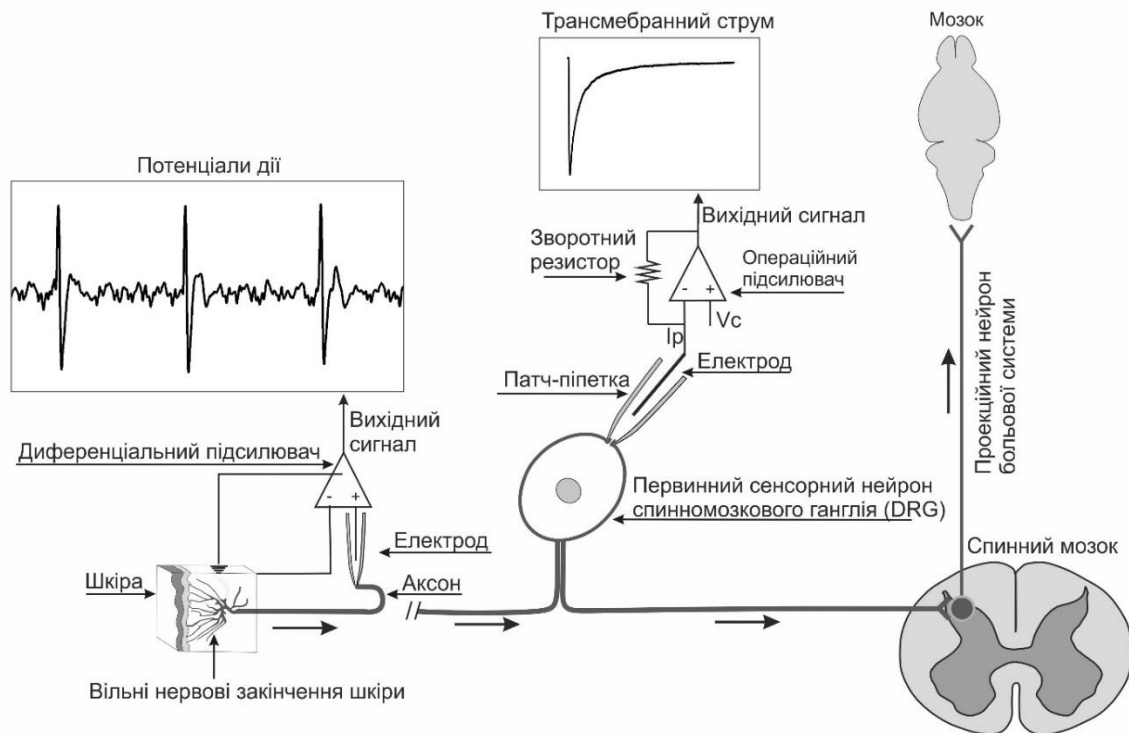


Рис. 1.7. Спрощена схема експериментальної моделі препарат «шкіра–нерв–спинальний ганглії» *ex vivo* [99].

1.6.6. Експериментальні моделі *in vivo* для дослідження ноцицепції у гризунів

Експериментальні моделі для оцінки анальгетичної дії базуються на поведінкових тестах, що вимірюють реакції тварин на ноцицептивні стимули. Серед них найпоширенішими є тести гострого болю, які застосовуються для визначення порогів реакції експериментальних тварин на інтенсивні механічні або теплові подразники. До стандартних методів належать тест “гарячої пластини” та його аналог, тест “відсмикування хвоста”, які використовуються для оцінки термічної ноцицепції [79], а також тест порога відсмикування лапи, що вимірює чутливість до механічної стимуляції [100].

Окрім моделей гострого болю, широко застосовуються моделі, що імітують тривале периферичне пошкодження або запалення, зокрема формаліновий тест [94] та набряк лапи, індукований карагенаном, для дослідження тривалих ноцицептивних і запальних реакцій [78].

Попри високу інформативність, інтерпретація даних поведінкових тестів має низку труднощів. Зокрема, часто складно визначити, чи анальгетичний засіб впливає переважно на периферичні ноцицептори, чи на центральні ноцицептивні шляхи. Також буває важко відрізнити справжню анальгетичну дію від седативного ефекту.

Гризуни, основні модельні об'єкти у дослідженнях болю, характеризуються складною соціальною поведінкою, що включає емоційну заразливість та навчання через спостереження страху [101]. Як типові жертви в природі, вони схильні маскувати прояви болю, що додатково ускладнює оцінку ноцицепції. Для мінімізації впливу цих чинників важливо забезпечити повну адаптацію тварин до експериментального середовища та звести до мінімуму присутність експериментатора під час тестування [102].

Додатковою проблемою є локальне введення фармакологічних агентів. Наприклад, підшкірні ін'єкції, хоча й ефективні для доставки речовин у певну ділянку шкіри, можуть спричиняти локальне пошкодження тканин, що впливає на чутливість ноцицепторів [33]. Ще одним ускладнюючим чинником є вазоактивні властивості багатьох фармакологічних агентів, таких як брадикінін, гістамін і ацетилхолін. При введенні цих речовин, особливо артеріальним шляхом у цільову ділянку, вони можуть викликати вазоконстрикцію (звуження просвіту судин) або вазодилатацію (розширення судин). Такі зміни локального кровотоку впливають на розподіл і концентрацію активної речовини, що може спотворювати інтерпретацію спостережуваного анальгетичного ефекту.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методика реєстрації електричної активності поодиноких аферентів у препараті «шкіра–нерв» миші

Для дослідження функціональної активності периферичних сенсорних нейронів використовували стандартний метод електрофізіологічної реєстрації від поодиноких аферентних волокон у препараті «шкіра–нерв» миші (*ex vivo*) [8, 91] із невеликою модифікацією. На відміну від класичної методики, де реєстрацію електричної активності здійснюють за допомогою дротового електрода у відділенні камери, заповненому мінеральною олією, у цьому дослідженні застосовували скляний всмоктувальний електрод. При цьому обидва відділення експериментальної камери перфузували насиченим киснем розчином Кребса–Гензелейта (див. розділ 2.1.1).

Даний метод дає змогу безпосередньо вимірювати електричну активність окремих нервових волокон у відповідь на контрольовані механічні, температурні або хімічні стимули, які застосовуються до іннервованої ділянки шкіри. Під час експерименту реєстрували ПД аферентів сенсорних нейронів, визначали їхні пороги активації (мінімальну силу подразника, достатню для виникнення ПД), частоту імпульсації ПД, латентний період відповіді, швидкість проведення нервових імпульсів по аферентних волокнах, а також локалізацію рецепторного поля. На основі швидкості проведення аферентні волокна класифікували як А β -, А δ - або С-типи. Методика також дозволяє оцінювати зміни збудливості сенсорних волокон під впливом фармакологічних агентів, температурних або зміни рН, що дає змогу аналізувати механізми периферичної ноцицепції.

2.1.1. Матеріали та обладнання

- Уретан для анестезії (U2500, Sigma)

- Оксигенований (насичений киснем) фізіологічний розчин для перфузії: модифікований розчин Кребса Гензелейта у складі (в мМ/л): NaCl 118, KCl 5,4, NaH_2PO_4 1,0, MgSO_4 1,2, CaCl_2 1,9, NaHCO_3 25,0, глюкоза 11,1; насичений газовою сумішшю 95% O_2 і 5% CO_2 , pH 7,4.
- Концентровані розчини речовин для тестування
- Газовий балон з редуктором тиску, наповнений сумішшю 95% O_2 – 5% CO_2
- Перистальтичний роликовий насос
- Набір ножиць для препарування (великі та малі)
- Чашка Петрі, вистелена силіконом Sylgard або парафіном для препарування
- Мікрохірургічні ножиці
- Пінцети з тонкими кінчиками
- Електролітично загострені сталеві голки з ручками для мікроманіпуляцій з нервами
- Скляна паличка з оплавленим гладким кінчиком для механічної стимуляції із діаметром ≈ 2 мм.
- Лабораторний стереомікроскоп для препарування ($6\times$ – $40\times$)
- Індивідуально виготовлена двокамерна ванна з оргскла, для перфузії препарату «шкіра–нерв» і запису електричної активності нервових аферентів. Конструкція складалася з двох відділень:
 - Перше відділення — ванна для органу (ділянки шкіри): розміри 35×30 мм, глибина до 8 мм. Дно покривалося медичним парафіном або силіконом Sylgard для фіксації препарату.
 - Друге відділення — для нервової частини: розміри 20×25 мм, глибина до 8 мм. Дно мало вбудоване дзеркало для покращеної візуалізації нервових волокон під час їх відокремлення від нерва (n. saphenus). Обидва відділення були розділені перегородкою товщиною 0,5 мм з центральним отвором діаметром 1 мм, через який пропускався нерв. Така конструкція давала змогу розділяти нерв на окремі волокна та реєструвати їхню електричну активність незалежно від основного органного відділення.

- Скляне кільце (внутрішній діаметр — 6 мм; об'єм — 0,3 мл)
- Тонкі електролітично загострені голки: виготовлені з твердої нержавіючої сталі для фіксації тканин [103]
- Калібровані волоскові філаменти фон Фрея (von Frey) (Stoelting)
- Електрофізіологічний стимулятор: аналоговий стимулятор-ізолятор моделі 2200 (A-M Systems, США) або аналог
- Моно- або біполярний сталевий електрод з зовнішньою ізоляцією для електричної стимуляції
- Референтний електрод Ag/AgCl
- Пристрій для витягування мікропіпеток: модель P-97 (Sutter Instruments Co., США) або аналог
- Тримач для мікроелектрода, під'єднаний до шприца для створення негативного тиску
- Всмоктувальний електрод [104]: Скляні електроди виготовляють із боросилікатних капілярів (зовнішній діаметр — 1,5 мм; внутрішній — 0,86 мм). Мікроелектроди формують у приладі для витягування піпеток, після чого їхні кінчики полірують на мікрокузні шляхом контрольованого нагрівання нагрівального елемента (резистивного дроту) до досягнення діаметра 10–20 мкм. Менший, добре відшліфований наконечник покращує герметичність контакту з нервовим волокном і підвищує амплітуду сигналу, однак є більш схильним до закупорювання тканинними залишками. Натомість наконечник з більшим діаметром може одночасно охоплювати кілька волокон, але зазвичай забезпечує нижчу точність сигналу від окремих нервових аферентів (рис. 2.7В).
- Мікроманіпулятор для всмоктувального електрода
- Електрофізіологічний диференціальний підсилювач: модель 3000 (A-M Systems, Inc., США)
- Аналого-цифровий перетворювач (ADC): Digidata 1200 або сумісний, з одним каналом ADC для реєстрації активності нервових волокон і одним

каналом DAC для електричної стимуляції рецептивного поля (Axon Instruments, США)

- Антивібраційний стіл
- Персональний комп'ютер для реєстрації даних і керування експериментом
- Програмне забезпечення для електрофізіологічних записів: WinEDR v3.9.1 і WinWCP v4.5.4 або сумісне

2.1.2. Експериментальні тварини

У експериментах із препаратом шкіра–нерв *ex vivo* використовували дорослих мишей лінії BALB/c [105] віком 6–7 тижнів і масою 22–30 г. Щоб уникнути можливих статевоспецифічних ефектів [106], у всіх експериментах використовували лише самців. Тварин розводили у віварії Інституту фізіології імені О.О. Богомольця, де їх утримували при 12-годинному циклі світло-темрява з вільним доступом до їжі та води. Усі експерименти проводили відповідно до вимог Комітету з етики поводження з тваринами Інституту фізіології імені О.О. Богомольця. Загалом у дослідженні було використано 94 миші.

2.1.3. Методика виділення препарату шкіра–нерв

Безпосередньо перед препаруванням тварин евтаназували шляхом внутрішньочеревного введення летальної дози уретану (4 г/кг), розчиненого у фізіологічному розчині. Уретан забезпечує хірургічну глибину наркозу за мінімального впливу на нейротрансмісію, зокрема в периферичній нервовій системі, водночас зберігаючи низку рефлексорних реакцій. Це робить його оптимальним анестетиком для дослідження периферичної нервової активності [107].

Після евтаназії відсікали ділянку волосяної шкіри верхньої частини стопи разом із підшкірним нервом (n. saphenus), який забезпечує її іннервацію. Шкіру обережно розтягували та закріплювали дермою догори у ванні для органа, призначеній для перфузії та стимуляції рецептивних полів чутливих закінчень

аферентних волокон. Кінець нерва акуратно проводили через отвір в окрему камеру, призначену для розділення нерва на окремі філаменти та реєстрації електричної активності поодиноких аферентних нервових волокон. Обидва компартменти експериментальної камери, відділення для тканини (шкіри з нервом) та відділення для реєстрації електричної активності аферентів, де розташовувався кінець нерва, перфузували окремо модифікованим розчином Кребса–Хенселейта зі швидкістю потоку 8 мл/хв і 3 мл/хв відповідно. Температуру у ванні для органа (шкіри) та у реєстраційній камері підтримували на рівні $30 \pm 0,1$ °C (рис. 2.1).

Таким чином, препарат «шкіра–нерв» миші *ex vivo* являє собою ділянку шкіри, вирізану з верхньої частини стопи задньої лапи разом із нервовою гілкою яка його інервує (n. saphenus). Препарат постійно перфузується фізіологічним розчином, насиченим киснем, що дозволяє підтримувати його життєздатність, контролювати умови зовнішнього середовища та здійснювати контрольовану хімічну, температурну й механічну стимуляцію рецепторних полів сенсорних аферентів.

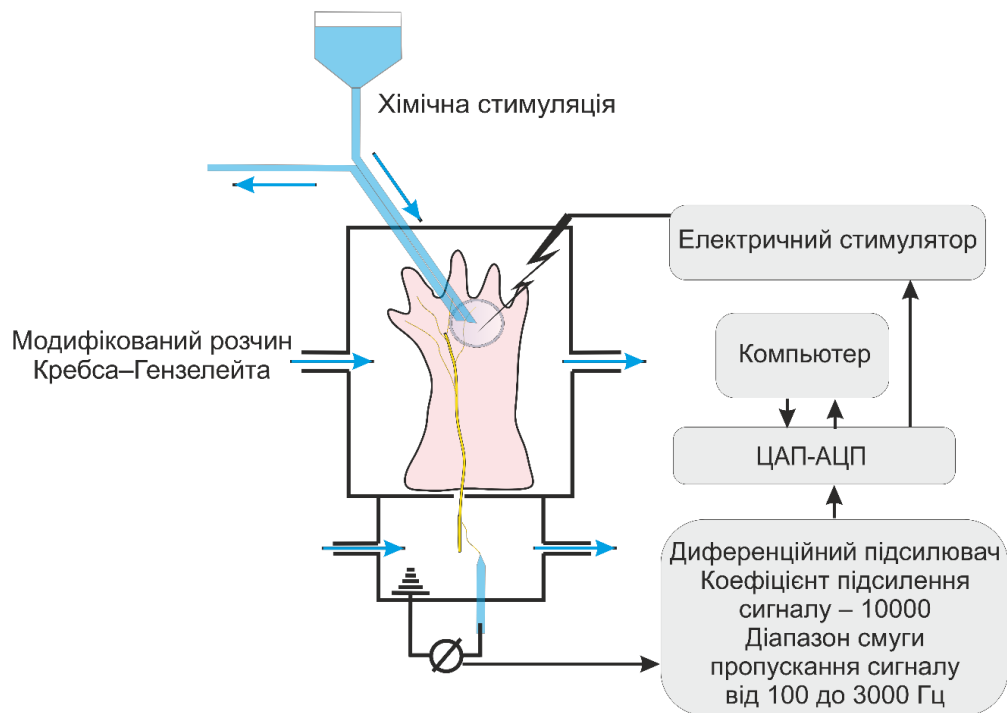


Рис. 2.1. Спрощена схема експерименту *ex vivo*.

2.1.4. Реєстрація електричної активності окремих сенсорних аферентів

Позаклітинна реєстрація електричної активності окремих нервових волокон є найменш інвазивною серед електрофізіологічних методів. За допомогою пари електродів, реєструвального та еталонного, вимірюють різницю потенціалів між певною точкою вздовж нервового філамента (пучка із декількох аксонів) і заземленим позаклітинним середовищем.

Електричну активність сенсорних аферентів реєстрували за допомогою скляного всмоктувального мікроелектрода (suction electrode). Скляні мікроелектроди виготовляли за допомогою витягувача мікропіпеток Flaming-Brown (модель P-97, Sutter Instrument Co., США). Позаклітинно зареєстровані ПД поодиноких нервових волокон мають амплітуду в діапазоні мікрвольт (приблизно 1000 μV для А β -волокон і близько 50 μV для С-волокон [8]), тому потребують загального підсилення приблизно у 10^4 разів (≈ 10 К). Реєстрований сигнал підсилювали за допомогою підсилювача моделі 3000 (A-M Systems, Inc., Carlsborg, WA, США) та фільтрували з використанням аналогового смугового фільтра (нижня межа частоти 0,1 кГц; верхня 1–3 кГц).

Після фільтрації сигнал подавали на аналогово-цифровий перетворювач Digidata 1200 (Axon Instruments, США) для запису на персональний комп'ютер. Інтервал дискретизації становив 0,05 мс (частота дискретизації — 20 кГц), що дозволяє точно відтворювати форму ПД, тривалість яких зазвичай не перевищує 1 мс. Підсилені сигнали контролювали в реальному часі на моніторі комп'ютера та зберігали з використанням програмного забезпечення WinEDR V3.9.1 і WinWCP V4.5.4 (Dr. John Dempster, University of Strathclyde, UK).

2.1.5. Фенотипування сенсорних аферентів за швидкістю проведення

Під час проведення нервового імпульсу (ПД) у нервових волокнах поширюється ланцюг послідовних змін проникності мембрани для іонів, що відображається як серія локальних змін мембранного потенціалу (деполяризація – реполяризація). Ці процеси потребують певного часу для відкриття та закриття потенціал-залежних трансмембранних Na^+ - і K^+ -каналів, а також для дифузії іонів через мембрану, тому поширення ПД має обмежену швидкість. Швидкість проведення нервового імпульсу визначається низкою фізіологічних і біофізичних чинників, серед яких основними є:

- діаметр аксона (зі збільшенням діаметра зменшується внутрішній опір і підвищується швидкість поширення сигналу);
- ступінь мієлінізації, що забезпечує сальтаторне («стрибкоподібне») проведення ПД між вузлами Ранв'є;
- температура, від якої залежить кінетика активації та інактивації Na^+ - і K^+ -залежних іонних каналів.

Експериментальне визначення швидкості проведення базується на вимірюванні часу затримки між моментом активації чутливого закінчення сенсорного нейрона електричним імпульсом, поданим через стимулюючий електрод, розташований у межах його рецептивного поля, та реєстрацією ПД на реєструючому електроді. Знаючи відстань між стимулюючим і реєструючим електродами (тобто шлях, який проходить ПД), та час його проходження, обчислюють швидкість проведення нервового волокна. Тест на визначення швидкості проведення нервового волокна використовують для ідентифікації типу нервового волокна за рівнем його мієлінізації, який прямо залежить від швидкості проведення ($A\alpha$, $A\beta$, $A\delta$, C). А також для локалізації рецептивного поля, оцінки кількості нервових волокон, що потрапляють на реєструючий електрод, та запису форми ПД з метою їх подальшої ідентифікації за формою ПД на записах електричної активності тих самих нервових аферентів.

Для електричної стимуляції використовували тонкий сталевий електрод із зовнішньою ізоляцією, під'єднаний до аналогового стимулятора А-М Systems, модель 2200. Стимуляцію здійснювали прямокутними електричними імпульсами (тривалість 0,1 мс, амплітуда 2–5 В), які подавали в центр рецептивного поля. Щоб забезпечити стабільність і відтворюваність відповіді, інтервал між послідовними стимулами становив понад 5 с. Генерацію стимулів і одночасний запис електричної активності аферентів виконували за допомогою програмного забезпечення WinWCP (версія 4.5.4).

Швидкість проведення нервових волокон (м/с) розраховували за формулою, що враховує латентний період між початком електричного стимулу на рецептивному полі чутливого закінчення та появою викликаного ПД на реєструючому електроді, а також відстань, яку проходив імпульс за цей час (рис. 2.2). Волокна зі швидкістю понад 10 м/с класифікували як сильно мієлінізовані А β , а з інтервалом швидкостей 1,2–10 м/с — як тонко мієлінізовані А δ . Порогове значення 1,2 м/с використовували для відмежування мієлінізованих волокон від немієлінізованих [8, 92].

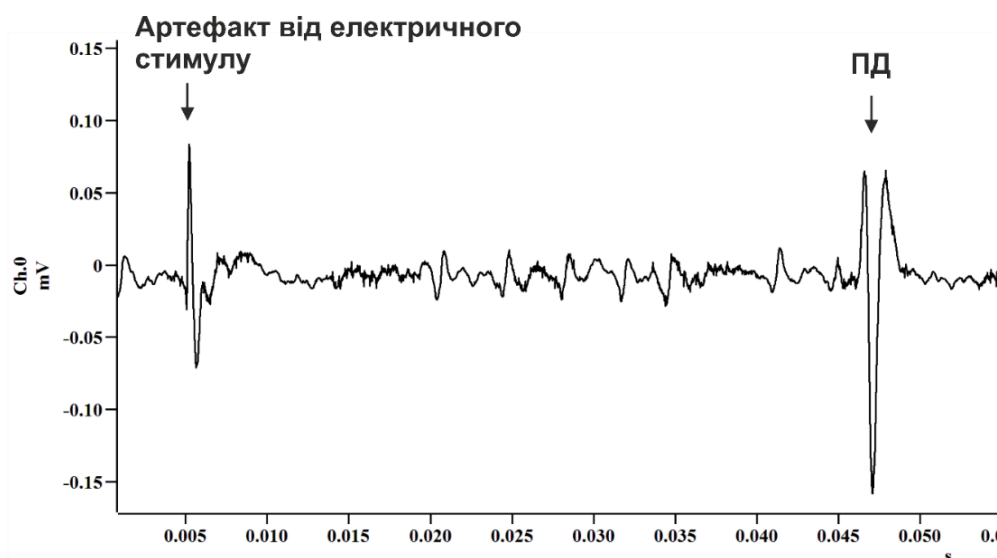


Рис. 2.2. Приклад запису ПД у відповідь на електричний стимул.

Позаклітинну активність реєстрували лише від тих окремих нервових волокон, які можна було чітко ідентифікувати за амплітудою та формою ПД. Дослідження обмежували субпопуляцією механо- та теплочутливих ноцицепторів

типу СМН, оскільки ці полімодальні С-волокна є найбільш чутливими до зниження рН [14]. Інші типи волокон, зокрема А-волокна з більшою швидкістю проведення, до аналізу не включали. Волокна типу СМН, які не проявляли відповіді на хімічну стимуляцію, також виключали з подальшого дослідження.

2.1.6. Фенотипування сенсорних аферентів за чутливістю до механічних стимулів

Рецептивні поля первинних аферентних волокон визначали спочатку шляхом механічної стимуляції за допомогою скляної палички із оплавленим кінчиком, яка створювала механічний тиск приблизно до 500 мН, цього достатньо для активації понад 90% шкірних аферентів (рис. 2.3) [92].

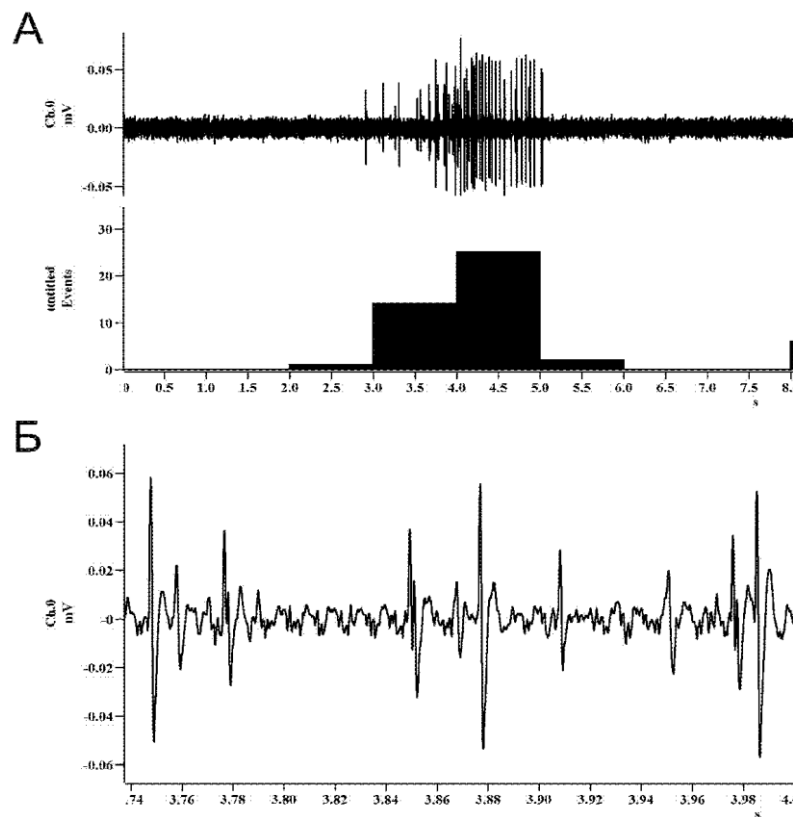


Рис. 2.3. Приклад запису ПД сенсорних аферентів у відповідь на механічну стимуляцію їх рецептивного поля. (А) Верхній канал (mV) група ПД; нижній канал гістограма сумарної активності (кількість ПД за 1 секунду). (Б) Фрагмент запису тривалістю 0,25 с з добре видимими окремими імпульсами.

Механічну чутливість, поріг активації та швидкість адаптації рецептивного поля аферентів оцінювали за допомогою набору відкаліброваних волоскових філаментів фон Фрея. Під час тестування філамент прикладали перпендикулярно до найбільш чутливої ділянки рецептивного поля. Визначення механічного порогу здійснювали шляхом 5-секундної стимуляції, починаючи з мінімального тиску, поступово його збільшуючи до досягнення стабільної відповіді. Механочутливі волокна, що реагували на силу менше ніж 10 мН, класифікували як низькопорогові механорецептори, а ті, що активувалися при силі понад 10 мН — як високопорогові механорецептори. Додатково тип волокна уточнювали за швидкістю адаптації до механічного стимулу, використовуючи філамент фон Фрея із попередньо визначеною силою, прикладеним на 10 секунд [108]. Для уникнення ефектів сенситизації або десенситизації між послідовними стимулами дотримувалися інтервалу не менше 60 секунд.

2.1.7. Хімічна стимуляція чутливих закінчень сенсорних аферентів

Для підвищення швидкості заміни розчину під час хімічної або температурної стимуляції та тестування препаратів рецептивне поле ізолювали від навколишнього середовища за допомогою малого скляного кільця (див. розділ 2.1.1). Кільце перфузували окремо зі швидкістю 4 мл/хв, що забезпечувало швидку заміну розчину для перфузії. Для хімічного подразнення протік переключали на відповідний стимулювальний розчин.

Для стимуляції розчином із рН 6,1 рецептивне поле нервового волокна перфузували тим самим модифікованим розчином Кребса–Хенселейта, який постійно насичували 100% CO₂ (див розділ 2.1.1 і рис. 2.4)[14].

Для стимуляції розчином із рН 6,7 рецептивне поле нервового волокна перфузували розчином із низьким вмістом бікарбонату такого складу (мМ/л): NaCl 142, KCl 5,4, NaH₂PO₄ 1,0, MgSO₄ 1,2, CaCl₂ 1,9, NaHCO₃ 1,0, декстроза

11,1. Значення рН розчину доводили до 6,7 шляхом насичення газовою сумішшю (95% O₂ та 5% CO₂) [109].

K⁺ використовували у концентрації 10,8 мМ/л для активації нервових аферентів, а для підтримання сталої осмолярності модифікованого бікарбонатного буфера Кребса–Хенселейта концентрацію Na⁺ відповідно зменшували на 5,4 мМ/л, тобто Na⁺ замінювали на K⁺ в еквімолярній кількості.

Для стимуляції чутливих закінчень аферентів за допомогою АТФ або капсаїцину відповідні речовини додавали до розчину для перфузії у необхідній концентрації.

Експериментальна серія складалася з трьох послідовних хімічних стимуляцій. Першу та останню стимуляції використовували як контрольну та тестову на відновлення відповідно. Температуру буферних розчинів у скляному кільці контролювали та підтримували на необхідному рівні залежно від умов експерименту.

Усі хімічні речовини були придбані в компанії Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Тауфкірхен, Німеччина).

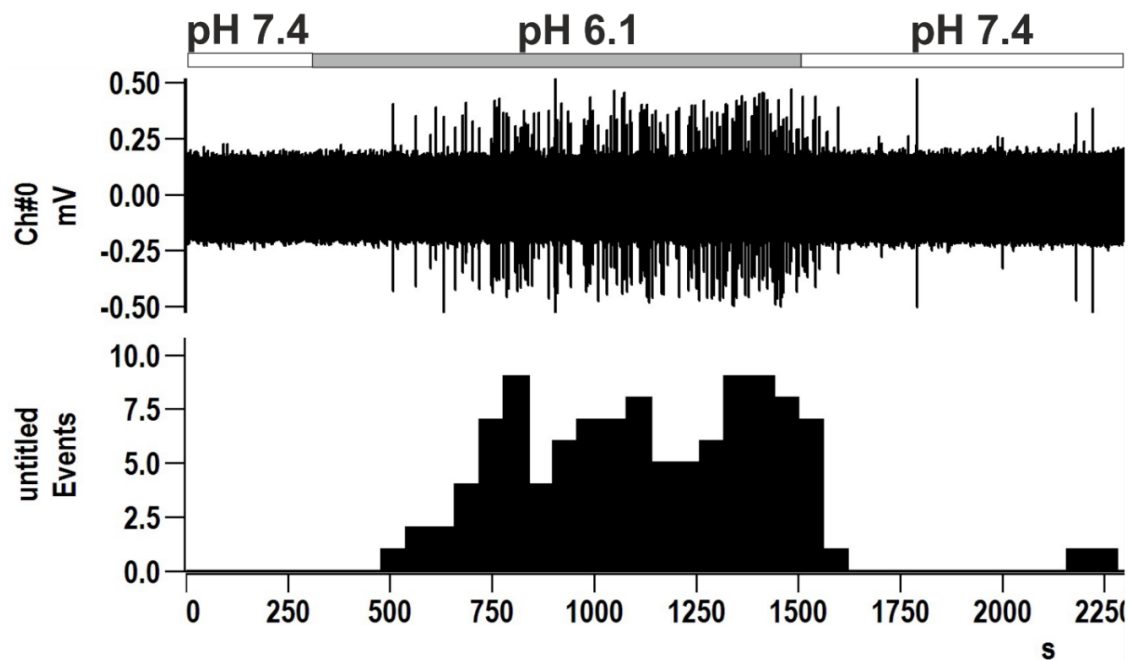


Рис. 2.4. У верхній частині: запис електричної активності нервового аферента під час зміни рН у його рецептивному полі; у нижній частині: гістограма суми ПД за 1 хвилину.

2.1.8. Термальна стимуляція чутливих закінчень сенсорних аферентів

Термальну стимуляцію рецептивного поля здійснювали шляхом перфузії препарату розчином заданої температури. Температурний контроль реалізували за допомогою спеціально сконструйованого термостата, що складався з елемента Пельтьє та точно відкаліброваного термодатчика. Ця система дозволяла змінювати температуру розчину в діапазоні від 15 °C до 49 °C, чого було достатньо для експериментальних цілей. Після теплової стимуляції перфузію було переключено назад на основний резервуар із температурою потоку 30 °C, щоб повернути тканину до базових умов. Тривалість підвищення температури залежала від експериментального протоколу й коливалася від 60 секунд до 90 хвилин (рис. 2.8В).

2.1.9. Аналіз електричної активності сенсорних аферентів

Для початкового аналізу даних записи електричної активності від окремих нервових волокон аналізували постфактум з використанням функції розпізнавання шаблонів (template-matching) у програмному забезпеченні Spike2 (CED, Cambridge, Велика Британія). Цей підхід дозволяв надійно ідентифікувати та розрізняти ПД, що походили від окремих нервових волокон.

Програмне забезпечення Spike2 (Cambridge Electronic Design, CED) забезпечує безперервний запис сигналів із декількох каналів безпосередньо на комп'ютерний носій. Система Spike2 дає змогу проводити як зіставлення шаблонів форм ПД (template matching), так і аналіз головних компонент (Principal Component Analysis, PCA) для розпізнавання окремих спайків (ПД).

В режимі off-line первинне виявлення спайків здійснюється на основі перетину заданого порогу амплітуди, після чого відбувається класифікація спайків із використанням алгоритму зіставлення з шаблоном (template matching), який включає етапи некерованого навчання та дискримінації.

Результати відображаються у вигляді часо-частотного графіка (time–frequency plot), що демонструє активність окремих нервових волокон, і можуть бути перевірені шляхом порівняння форми ПД з відповідями на електричну стимуляцію. Артефакти, спричинені зовнішніми електричними полями, надійно відфільтровуються.

У записах, що містять активність більш ніж одного нервового аферента, їхні спайки успішно розрізняються з низьким рівнем помилок [110].

Отримані результати аналізу, зокрема частоту ПД від окремого нервового аферента за певний період часу, можуть бути експортовані у вигляді текстового файлу (наприклад, у форматі, сумісному з Microsoft Excel) для подальшої статистичної обробки. На рисунку 2.5 наведено типовий приклад офлайн-аналізу у програмі Spike2.

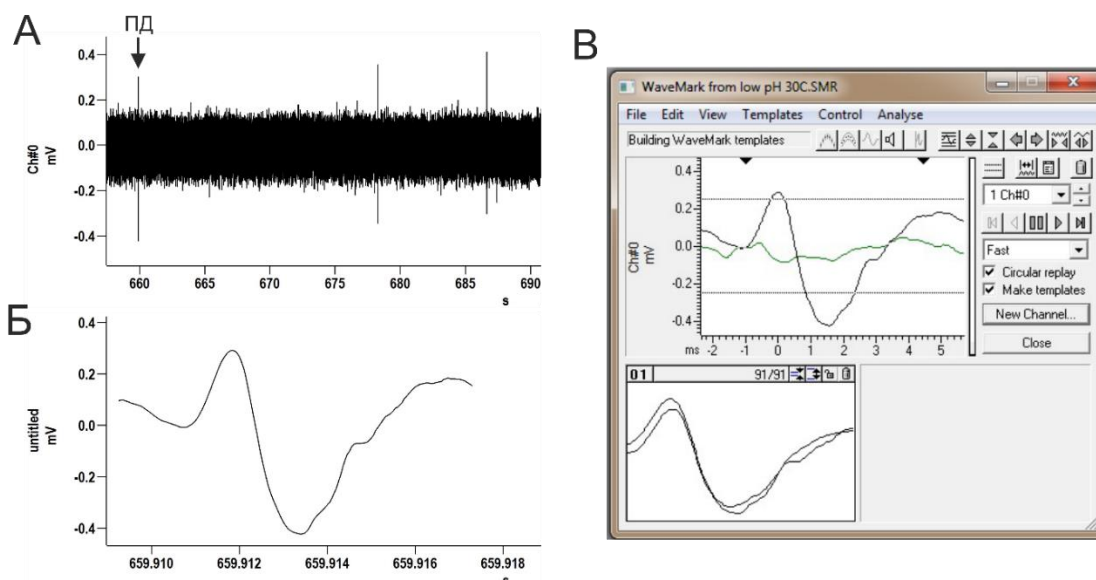


Рис. 2.5. (А) Запис електричної активності нервового аферента тривалістю 30 с. (Б) Фрагмент запису тривалістю 10 мс із ідентифікованим ПД. (В) Функціональне вікно інструменту WaveMark із класифікованими формами хвиль ПД.

Для статистичного аналізу результатів дослідження застосовували програмне забезпечення Origin Pro 8.5 (Origin Lab. Corp., Northampton, MA, США). Всі експериментальні дані наведені як середнє $\pm$ стандартна помилка середнього (SEM). Для визначення значущості відмінностей електричної активності нервових волокон використовували однофакторний дисперсійний аналіз для повторних вимірювань (one-way analysis of variance for repeated measures (RM ANOVA)) із пост-хок критерієм Бонферроні (Bonferroni post-hoc test). Рівень статистичної значущості встановлювали на рівні 0,05, якщо не зазначено інше.

2.1.10. Розрахунок енергії активації E_a та температурного коефіцієнта Q_{10}

Енергію активації E_a розраховували на основі частоти потенціалів дії (f) за заданої температури T (K) з використанням графіка Арреніуса $\ln(f)$ від $1/T$. Температурний коефіцієнт Q_{10} обчислювали за рівнянням:

$$Q_{10} = \frac{10E_a}{e^{RT(T+10)}} \quad (2.1)$$

де $R = 8,3114 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ — універсальна газова стала.

Температурний коефіцієнт Q_{10} для швидкості проведення розраховували за рівнянням:

$$Q_{10} = \left(\frac{X_2}{X_1} \right)^{10/(T_2 - T_1)} \quad (2.2)$$

2.2. Удосконалена методика реєстрації електричної активності шкірних аферентів у ізолюваному препараті «шкіра–нерв» миші

2.2.1. Загальний опис методу

З метою підвищення ефективності експериментальних досліджень периферичного болю в дисертаційній роботі було удосконалено методику *ex vivo* для реєстрації електричної активності окремих аферентних нервових волокон у ізолюваному препараті “шкіра–нерв” миші [8], зберігаючи при цьому всі основні можливості вихідної техніки. Оновлений протокол [9] і оригінальна методика дає змогу здійснювати контрольовану стимуляцію сенсорних нервових закінчень, функціональну класифікацію за типом відповіді та швидкістю проведення, а також фармакологічну оцінку.

Ключова модифікація полягає у використанні скляного електрода для реєстрації сигналів з окремих гілок підшкірного нерва (*n. saphenus*) без відокремлення його основного стовбура. Такий підхід спрощує препарування, полегшує локалізацію рецептивних полів, скорочує тривалість маніпуляцій із

тканиною та зменшує площу шкіри, яку необхідно вилучити для препарату. Для підтримки фармакологічного тестування ми інтегрували систему перфузії та доставки сполук, засновану на поверхневому натягу, що забезпечує швидку зміну розчину в рецептивному полі. Розчин утримується між виходом канюлі та поверхнею шкіри завдяки силам поверхневого натягу, що забезпечує швидку зміну перфузату в межах рецептивного поля і підвищує ефективність доставки активних речовин.

Цей методичний підхід забезпечує надійну платформу для вивчення дії тестованих сполук на сенсорні нервові закінчення шкіри та для з'ясування внутрішніх механізмів периферичної чутливості. Далі надано детальний покроковий опис протоколу разом із переліком необхідних матеріалів та обладнання для полегшення відтворення методики в інших лабораторіях.

2.2.2. Матеріали і обладнання

Частина обладнання, використаного для експериментів із реєстрації електричної активності аферентних волокон препарату «шкіра–нерв» миші *ex vivo* у ході виконання дисертаційного дослідження, збігається з обладнанням, необхідним для новітньої методики реєстрації електричної активності аферентних волокон препарату «шкіра–нерв», розробленої в межах цієї дисертаційної роботи. Опис відповідного обладнання вже наведено в розділі 2.1.1. Методики відрізняються системою перфузії препарату, а також конструкцією камери для перфузії препарату та реєстрації електричної активності нервових аферентів. Далі наведено перелік обладнання, необхідного лише для новітньої методики:

- Оксигенований фізіологічний розчин для перфузії: модифікований розчин Кребса–Гензелейта Гензелейта (див. розділ 2.1.1). Також можуть використовуватися штучна спинномозкова рідина (aCSF) [111, 112] або синтетична інтерстиціальна рідина (SIF) [113].

- Однокамерна індивідуально виготовлена органна ванна з оргскла (30 × 25 мм, глибина до 5 мм) з дном, покритим медичним парафіном або силіконом Sylgard (рис. 2.6, 2.7А).
- Канюля для подачі розчину для перфузії прикліплена до маніпулятора для точного розміщення кінчика канюлі над препаратом «шкіро-нерв».

2.2.3. Підготовка тварини та препарування шкіри з нервом

Анестезію тварин проводили шляхом внутрішньочеревного введення уретану (2 г/кг), розчиненого у фізіологічному розчині. Хірургічні маніпуляції розпочинали лише після підтвердження відсутності рефлексу відсмикування задньої лапи у відповідь на легке заціпування підошви лапи пінцетом. Задню лапу фіксували у чашці Петрі та безперервно перфузували охолодженим розчином Кребса–Гензелейта (~4 °C) протягом усього препарування. Уздовж шкіри задньої лапи виконували подовжній розріз, починаючи від пальців, через латеральну поверхню до гомілковостопного суглоба, охоплюючи останній дорсально. Волосисту частину шкіри з тильної поверхні лапи акуратно відокремлювали від підлеглих м'язів і сухожиль, після чого переносили до експериментальної камери, перфузованої тим самим охолодженим розчином Кребса–Гензелейта. У процесі перенесення ретельно видаляли залишки сполучної тканини та фрагменти сухожиль.

Безпосередньо після препарування тварину евтаназували шляхом внутрішньочеревного введення летальної дози уретану. Якщо дослідник має навички швидкого препарування шкіри (приблизно за 15 хв у холодному розчині), евтаназію можна здійснити безпосередньо перед препаруванням для кращого збереження цілісності тканини.

2.2.4. Експериментальна камера

Ізольований препарат шкіри з нервом поміщали в експериментальну камеру, обладнану заземлювальним електродом Ag/AgCl. Безперервну перфузію розчином Кребса–Гензелейта, насиченим газовою сумішшю 95% O₂ та 5% CO₂ (рН 7,4), підтримували зі швидкістю приблизно 2 мл/хв за рахунок сили тяжіння. Шкіру орієнтували дермою догори та обережно фіксували. Випускний отвір перфузійної канюлі розташовували на відстані 2–3 мм над центром шкіри, щоб уникнути прямого удару крапель, який міг би заважати маніпуляціям з нервом або спричиняти артефакти під час електрофізіологічного запису. Завдяки поверхневому натягу розчин утримувався між кінчиком канюлі та поверхнею шкіри, забезпечуючи стабільну і рівномірну течію над тканиною. Температуру перфузійної рідини поблизу шкіри підтримували на рівні 30 °C за допомогою термостата з мініатюрним датчиком температури, розташованим поруч з виходом канюлі. Надлишок перфузійного розчину безперервно видаляли з камери за допомогою перистальтичного насоса.

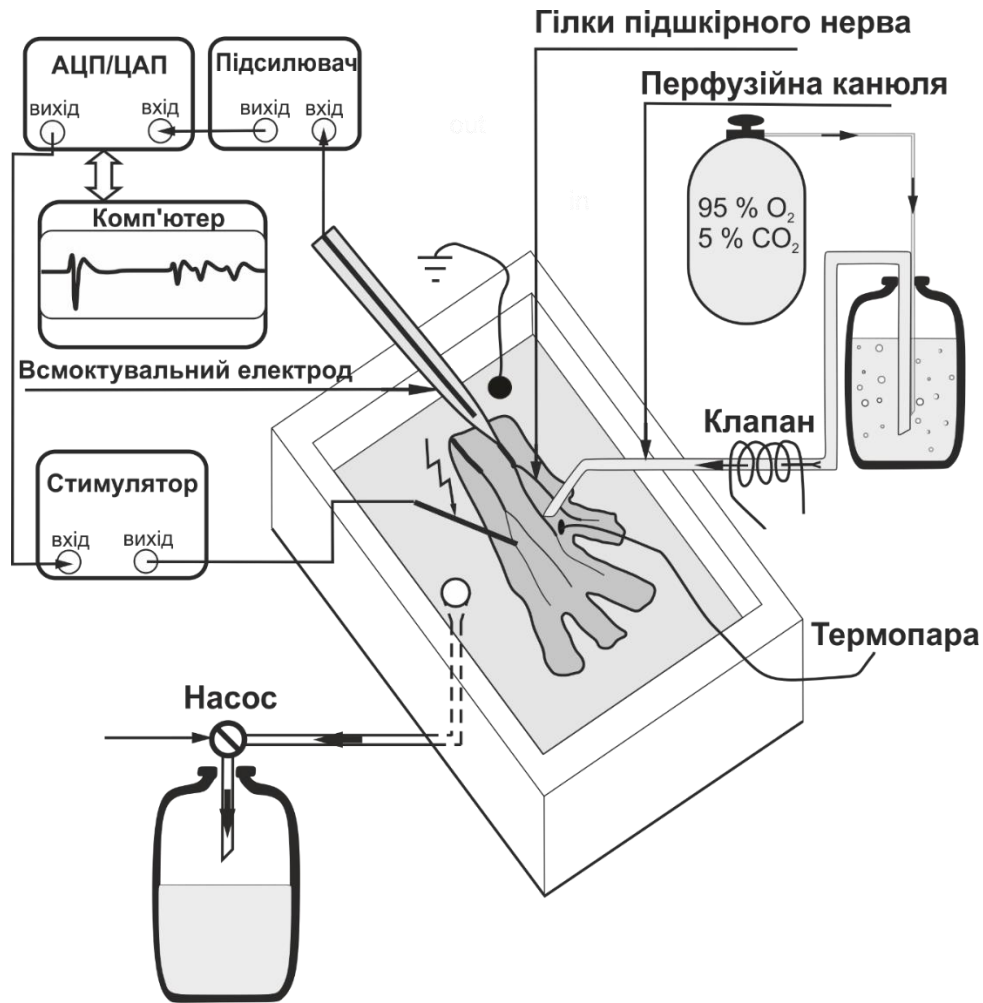


Рис. 2.6. Спрощена експериментальна схема ілюструє процес ідентифікації рецептивних полів нервових волокон за допомогою електричної, механічної та термічної стимуляції.

2.2.5. Реєстрація електричної активності одиничних аферентних нервових волокон

Під мікроскопічним контролем за допомогою тонкого мікрохірургічного пінцета та електролітично загострених голок обережно ізолювали проксимальний кінець підшкірної гілки нерва на довжину приблизно 2 мм для подальших маніпуляцій. За потреби нерв обрізали, щоб уникнути механічних пошкоджень, які могли виникнути під час попереднього препарування товстішими ножицями.

Під оголений кінець нерва підкладали невеликий квадрат світловідбивної плівки ($\sim 2 \times 2$ мм), що слугував опорною платформою для візуалізації під час

точних маніпуляцій. Зовнішні оболонки нерва, включаючи периневрій та епіневрій, обережно відсували від зрізаного краю нерва за допомогою електролітично загострених голок, оголюючи підлеглі нервові волокна. Із зрізу нерва вивільняли окремі тонкі нервові волокна для позаклітинної реєстрації електричної активності окремих аферентних волокон.

Всередину всмоктувального електрода вводили перфузійний розчин і розміщували його в експериментальній камері за допомогою мікроманіпулятора (рис. 2.7Б). Заземлювальний електрод розташовували у експериментальній камері поблизу реєструючого. Щоб забезпечити стабільний щільний контакт між ізольованим нервовим волокном і кінчиком електрода, використовували слабкий негативний тиск, створений за допомогою шприца, що сприяв надійній фіксації волокон на електроді. На рисунку 2.7В представлено мікрофотографію ділянки експериментальної камери: на контрастному відбивному фоні візуалізуються відокремлені нервові волокна гілки підшкірного нерва зі знятою оболонкою, частина яких всмоктана в наконечник піпетки всмоктувального електрода. Зареєстрований сигнал підсилювали за допомогою малошумного підсилювача та фільтрували в діапазоні смуги пропускання (нижня межа: 0,1 кГц; верхня межа: 1–3 кГц). Нервову активність оцифровували за допомогою аналого-цифрового перетворювача, після чого отримані дані зберігали та аналізували на персональному комп'ютері.

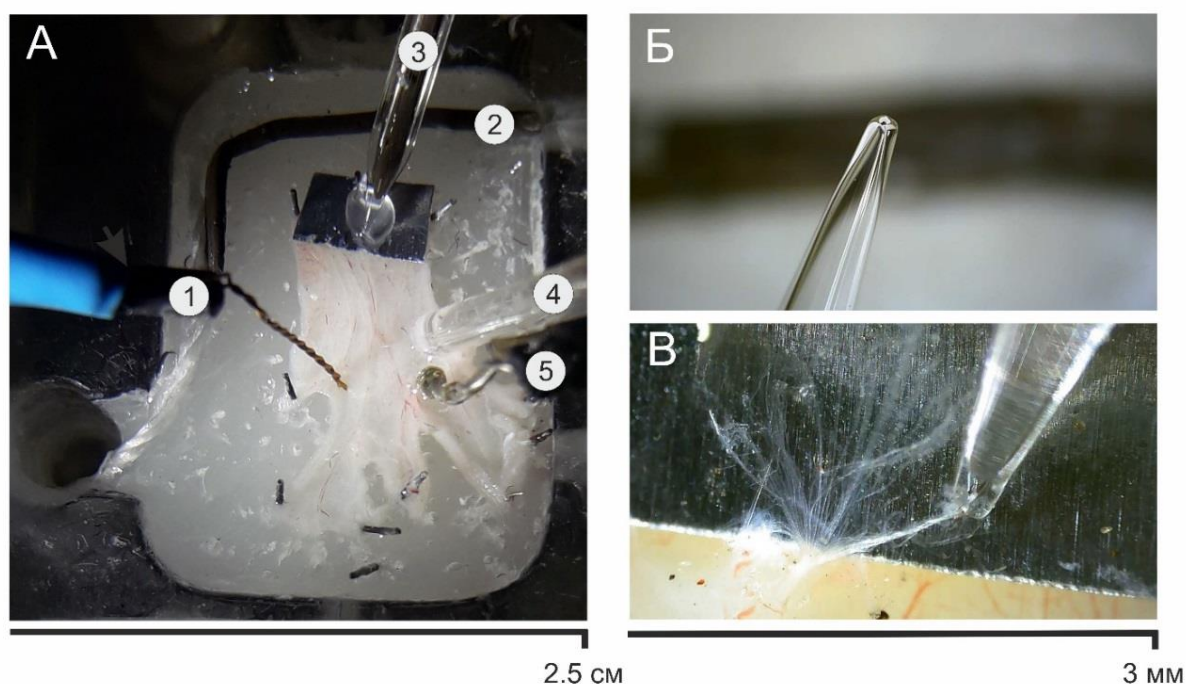


Рис. 2.7. Вигляд експериментальної камери та реєстраційного електрода. (А) Вид зверху на камеру для препарату "шкіра–нерв" миші. Цифри 1–5 позначають обладнання, необхідне для реєстрації, стимуляції та перфузії: (1) сталевий біполярний електрод із зовнішньою ізоляцією, розміщений у центрі рецептивного поля шкірних нервових закінчень; (2) заземлюючий електрод; (3) всмоктувальний електрод; (4) вихідний наконечник канюлі для подачі розчину; (5) термopapa. (Б) Мікрофотографія скляного наконечника піпетки всмоктувального електрода. (В) Мікрофотографія наконечника електрода із нервовими філаментами [9].

2.2.1. Хімічна стимуляція нервових закінчень шкіри

Для хімічної стимуляції основний потік перфузійного розчину швидко переключали на розчин, що містив відповідну хімічну сполуку, зокрема аденозинтрифосфат (АТФ) у концентрації 200 мкМ або розчин із зниженим значенням рН [91].

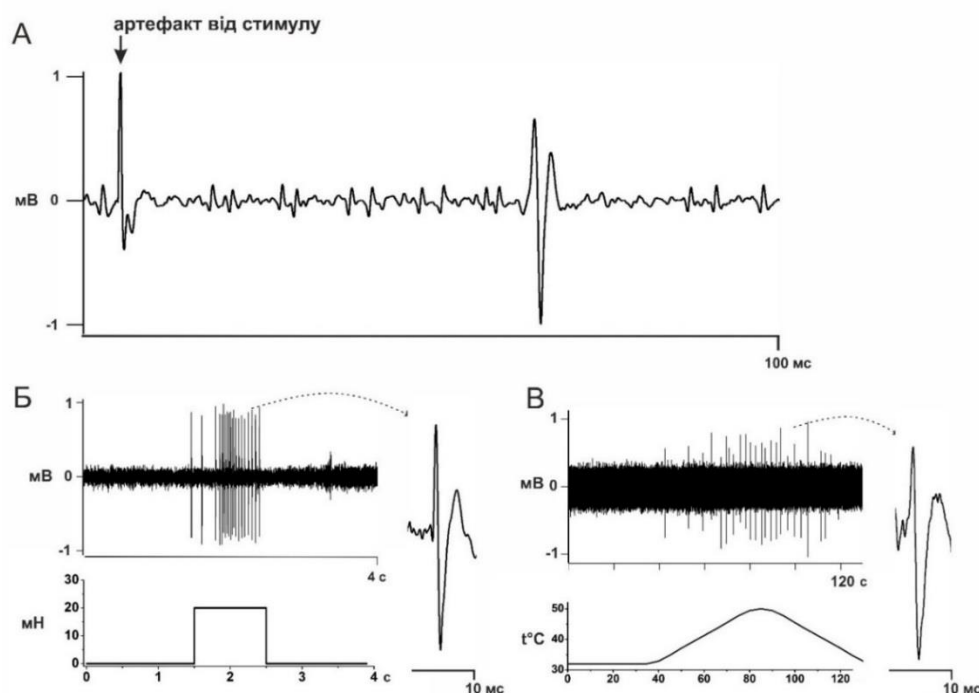


Рис. 2.8. Типові записи, отримані від поодинокого полімодального С-волокна. (А) Приклад запису ПД С-волокна, викликаного електричною стимуляцією, – тест на швидкість проведення. Відстань між електродами – 22 мм, латентний період – 55 мс, швидкість проведення – 0,4 м/с. (Б) Відповідь на механічну стимуляцію. (В) Відповіді на підвищення температури з 30 до 50 °С. Стрілки на рисунках (Б), та (В) вказують на приклади форм ПД, що поширюються по аферентному волокну [9].

Інші етапи експериментальної процедури, такі як фенотипування сенсорних аферентів за швидкістю проведення (розділ 2.1.5: рис. 2.8А), фенотипування за чутливістю до механічних стимулів (розділ 2.1.6) та аналіз електричної активності (розділ 2.1.9), виконувалися відповідно до стандартної методики реєстрації електричної активності сенсорних аферентів у препараті «шкіра–нерв» миші *ex vivo*, застосованої в цьому дисертаційному дослідженні.

2.3. Реєстрація трансмембранних струмів методом patch-clamp

2.3.1. Експериментальні тварини

Для отримання первинної культури нейронів дорзальних гангліїв (ДГ) використовували самців мишей лінії BALB/c [105] віком 8–12 діб і самців щурів лінії Wistar [114] віком 8–12 діб. Тварин розводили у віварії Інституту фізіології імені О.О. Богомольця, де їх утримували при 12-годинному циклі світло-темрява з вільним доступом до їжі та води. Усі експерименти проводили відповідно до вимог Комітету з етики поводження з тваринами Інституту фізіології імені О.О. Богомольця.

2.3.2. Первинні культури сенсорних нейронів як модель для дослідження нативних властивостей протон-чутливих рецепторно-канальних комплексів

Соми сенсорних нейронів широко використовуються у дослідженнях, присвячених вивченню властивостей нейротрансмітерних рецепторів, а також специфічних сенсорних рецепторів та іонних каналів, чутливих до тепла (TRPV1) [37] і хімічних агентів (наприклад, кислотно-чутливі іонні канали ASIC, TRPV1 [18] та P2X-рецептори [115]). Таке експериментальне наближення ґрунтується на припущенні, що рецепторні білки, експресовані в сомі нейронів, відображають той самий набір рецепторів, який представлений на їх периферичних нервових закінченнях. Таким чином, нейрони дорзального корінцевого ганглія є прийнятною та перспективною моделлю для дослідження нативних властивостей протон-чутливих рецепторно-канальних комплексів.

Ізольовані сенсорні нейрони є одним із найпоширеніших об'єктів нейрофізіологічних досліджень у вигляді первинних культур. Основною перевагою використання культур нейронів є можливість точного контролю умов

їх існування, зокрема складу середовища, що визначає функціональний стан клітин та їх фенотип в умовах *in vivo*. Такий контроль дає змогу проводити фізіологічні та фармакологічні дослідження електричних властивостей нейронів і механізмів міжклітинної передачі сигналів. Первинна культура сенсорних нейронів має низку специфічних переваг, серед яких здатність клітин відновлювати білковий склад плазматичної мембрани після ензиматичної обробки в однакових умовах для всієї популяції клітин. Використання ізольованих нейронів усуває необхідність урахування біологічних і фізіологічних особливостей навколишніх тканин, що значно полегшує аналіз отриманих даних. Нейрональні клітини, такі як НЕК293, із експресованими мембранними білками є ще простішою експериментальною системою порівняно з ізольованими нейронами, оскільки дають змогу досліджувати біофізичні та фармакологічні властивості окремих трансмембранних білків в ізоляції без впливу інших клітинних структур.

2.3.3. Отримання первинної культура нейронів спинномозкових гангліїв миші

Методика отримання первинних культур сенсорних нейронів у мишей та щурів була ідентичною. Після декапітації тварини спинномозковий канал розтинали з дорзальної сторони, очищали від залишків спинного мозку та розкривали з боків для полегшення доступу до міжхребцевих просторів, де розташовані ганглії. За допомогою тонких пінцетів видаляли грудні та поперекові ДГ і переносили їх у розчин MEM (minimum essential medium Eagle, Sigma, США), що містив 4 мг/мл трипсину та 2 мг/мл колагенази. Інкубацію проводили протягом 25 хв при температурі 35 °C [116, 117]. Протягом ферментативної обробки розчин постійно насичували газовою сумішшю (95 % O₂ + 5 % CO₂), підтримуючи сталий рівень рН = 7,4. Після завершення ферментативної обробки нервові ганглії промивали.

Далі для отримання суспензії ізольованих нейронів нервові ганглії механічно дисоціювали а допомогою піпеток Пастера з різним діаметром отвору у 1 мл MEM, що містив 10 мМ/л HEPES–NaOH (pH 7,4). Отриману суспензію (200–300 мкл) наносили в центр чашки Петрі та витримували 5–10 хв для прикріплення клітин до дна. Після цього додавали 2–3 мл живильного середовища, що містило 90 % DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma, США), 0,3 % пеніциліну, 10 мкг/мл інсуліну та 10 % термо-інактивованої фетальної телячої сироватки (Gibco BRL, Німеччина). Клітинні культури утримували в інкубаторі при температурі 37 °С та зволоженій газовій суміші, що містила 5 % CO₂. Для електрофізіологічних досліджень використовували нейрони після 5–48 годин культивування.

2.3.4. Методика культивування клітин лінії HEK293

Клітини лінії HEK293 (трансформовані клітини людської ембріональної нирки) культивували у середовищі DMEM (Gibco BRL, США), що містило 10% ембріональної сироватки крові теляти, 2 мМ/л L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину. Культивування здійснювали при 37 °С у зволоженій атмосфері, насиченій 5% CO₂.

Моношар клітин досягав щільності 80–90% через 3–4 дні після висівання, після чого проводили пересадку. Для цього поживне середовище видаляли, клітини один раз омивали стерильним розчином PBS (без Ca²⁺ і Mg²⁺), після чого додавали 1–2 мл розчину трипсин-ЕДТА та інкубували 2–3 хв до відокремлення клітин від дна чашки. Реакцію зупиняли додаванням повноцінного культурального середовища (5–10 мл), після чого клітинну суспензію обережно ресуспендували для отримання однорідного розчину.

Отриману суспензію висівали у малі чашки Петрі (діаметром 3,5 см), у які попередньо додавали 2–3 мл культурального середовища. Такий підхід забезпечував рівномірний розподіл клітин по поверхні, що є необхідним для

реєстрації електрофізіологічних сигналів з поодиноких клітин. У дослідженнях використовували клітини 2–4-денного терміну культивування.

2.3.5. Метод внутрішньоклітинного діалізу

Для реєстрації трансмембранних іонних струмів культивованих нейронів дорсальних гангліїв був застосований метод внутрішньоклітинного діалізу [118, 119], який передбачає застосування скляних мікропіпеток. Мікропіпетки виготовляли із боросилікатних капілярів діаметром 1,5 мм за допомогою витяжного пристрою Р-97 (Sutter Instruments Co., США). Діаметр кінчика мікропіпетки становив 3–5 мкм, а опір — близько 2–4 МОм [120].

Піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином такого складу (у мМ/л): °Tris-Cl, 120 KF; рН 7,3. Використання фториду калію забезпечувало механічну стабільність мембрани та мінімізувало вплив внутрішньоклітинних метаболічних процесів на функціонування рецепторно-іонофорних комплексів [121]. Позаклітинний розчин (розчин Рінгера) мав такий склад (у мМ/л): 130 NaCl, 2 CaCl₂, 5 KCl, 2 MgCl₂, 20 N-(2-гідроксиетил)піперазин-N'-2-етансульфонової кислоти (HEPES); рН 7,4.

2.3.6. Метод фіксації потенціалу на мембрані нейрона

Фіксацію потенціалу на мембрані перфузованих нейронів проводили шляхом створення різниці потенціалів між двома хлор-срібними електродами, розташованими у позаклітинному та внутрішньоклітинному розчинах. Підтримуваний мембранний потенціал і деполяризуючий імпульс подавали за допомогою внутрішньоклітинного електрода. Обидва електроди були під'єднані до перетворювача «струм–напруга» та підсилювача трансмембранних струмів ЕРС-8 (НЕКА Elektronik Dr. Schulze GmbH, Німеччина). Після прориву мембрани встановлювався безпосередній електричний контакт із внутрішньою (цитоплазматичною) стороною мембрани. Опір цього контакту (послідовний опір) визначався геометрією кінчика піпетки та площею зруйнованої ділянки мембрани.

У проведених експериментах він становив 2–3 МОм, а похибка підтримуваного потенціалу залежно від величини струму через мембрану не перевищувала 3–5 мВ. Невелике значення послідовного опору забезпечувало надійну стабілізацію потенціалу на мембрані нейрона. Дослідження виконували виключно на культивованих нейронах дорзального ганглія з діаметром тіла клітини 18–28 мкм. Діаметр визначали як середнє арифметичне найдовшої та найкоротшої осей, виміряних за допомогою окулярного мікрометра. Після ферментативної обробки, механічної дисоціації та культивування тіла нейронів не мали залишків аксона. Геометрична форма клітин була близькою до сферичної, оскільки перед реєстрацією клітини від'єднували від дна чашки Петрі.

2.3.7. Методика реєстрації трансмембранних струмів

Ізольовані нейрони розміщували у чашці Петрі, заповненій позаклітинним розчином Рінгера, встановленій на предметному столику мікроскопа. За допомогою мікроманіпулятора під мікроскопічним контролем піпетку, в якій підтримувався потенціал 0 мВ, наближали до вибраного нейрона. Для запобігання потраплянню фрагментів ушкоджених клітин у піпетку під час наближення в ній підтримували постійний слабкий позитивний тиск. Після досягнення необхідної відстані між піпеткою та клітиною (що визначалося прогинанням мембрани або незначним відхиленням нейрона під дією потоку розчину) тиск у піпетці знімали. За необхідності короткочасно прикладали слабкий негативний тиск для утворення щільного контакту між поверхнею клітини та стінками піпетки. Далі ділянку мембрани, що знаходилась усередині піпетки, руйнували коротким імпульсом негативного тиску. Після прориву мембрани у відповідь на деполяризаційний зсув потенціалу від -100 до -10 мВ реєстрували потенціалкерзовані іонні струми: сумарний вхідний натрієвий та вихідний калієвий. Після встановлення цілісного електричного контакту опір витоку становив близько 100–200 МОм, однак упродовж 1–10 хв після початку перфузії клітини внутрішньоклітинним розчином він поступово зростав до 0,5–1 ГОм. Підсилений сигнал відцифровувався з

частотою 10–20 кГц. Реєстрацію ліганд-керованих струмів розпочинали лише після досягнення стабільності параметрів струму витоку та потенціалкерованих іонних струмів.

2.3.8. Методика реєстрація хемоактивованих трансмембранних струмів у конфігурації ”U-трубка

Даний метод завдяки швидкій зміні зовнішньоклітинного розчину дозволяє швидко та надійно видаляти відмивати речовину з поверхні клітинної мембрани [66]. Важливою перевагою методу є можливість досягнення стаціонарного рівня дії прикладеної сполуки та реєстрації швидких перехідних процесів у мембрані досліджуваного нейрона. Такий підхід забезпечує одержання точних стаціонарних і кінетичних характеристик хемоактивованих мембранних іонних струмів.

Схему експериментальної установки для швидкої аплікації позаклітинних розчинів подано на рисунку 2.9. Піпетку з перфузованим нейроном за допомогою мікроманіпулятора розміщували в отворі U-подібно зігнутої скляної трубки діаметром 1,8 мм, зануреної у позаклітинний розчин. Інший кінець трубки через електромагнітний клапан з’єднували з джерелом негативного гідростатичного тиску (20–30 см водяного стовпа). У такій конфігурації система «піпетка–трубка» могла перебувати у повітрі без втрати електричного контакту та змін характеристик іонних струмів.

Вихідну камеру з ізольованими нейронами замінювали пластмасовим диском із невеликими заглибленнями (об’ємом близько 450 мкл), які попередньо заповнювали розчинами для аплікації. Перед аплікацією відповідне заглиблення диска розташовували під системою «піпетка–трубка», після чого диск підіймали так, щоб отвір трубки повністю занурився у розчин для аплікації. Програмно кероване відкривання електромагнітного клапана забезпечувало швидку зміну розчину в коліні U-подібної трубки.

Тривалість аплікації речовини зазвичай становила 4–5 с і обмежувалася часом, необхідним для переміщення системи «піпетка–трубка» в інше

заглиблення з іншим розчином. Реєстрацію хемоактивованих струмів здійснювали синхронно з моментом відкривання клапана, що забезпечувало точне визначення часу початку дії агоніста.

Викликані струми зумовлювалися зв'язуванням молекул агоніста з рецепторною ділянкою рецептор-іонофорного комплексу, що спричинювало конформаційні зміни білка й відкривання іонного каналу. Рецептор-іонофорний комплекс (receptor–ionophore complex) — це функціональна структура клітинної мембрани, яка поєднує рецептор білкової природи та іонний канал (іонофор), що безпосередньо відкривається у відповідь на зв'язування ліганду. Такий механізм забезпечує перетворення хімічного сигналу на електричний.

Застосування у наших експериментах пристрою «*Jumping Table*» (Pharma Robot, Київ) дозволяло змінювати позаклітинні розчини протягом 10–15 мс, а також швидко й надійно аплікувати серію розчинів різного складу на одну й ту саму клітину без значних витрат часу.

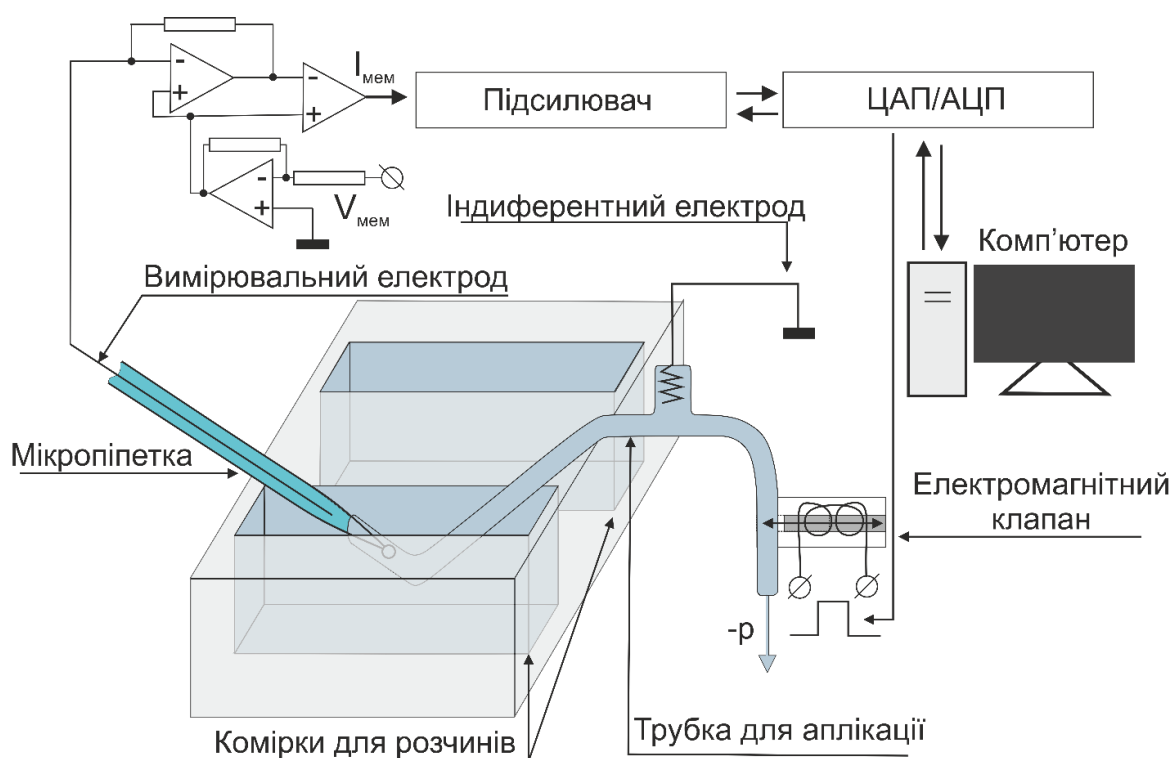


Рис. 2.9. Принципова схема експериментальної установки для реєстрації трансмембранних струмів.

2.3.9. Реєстрація трансмембранних струмів, викликаних активацією ASIC-рецепторів

Внутрішньоклітинний (піпетковий) розчин мав такий склад (у мМ/л): 20 Tris-Cl, 120 CsF; pH 7,3. Потенціал утримання становив -60 мВ.

Для реєстрації струмів, опосередкованих активацією ASIC-рецепторів у досліджуваних клітинах, використовували кондиціонуючий (розчин Рінгера) складу (у мМ/л): 130 NaCl, 2 CaCl₂, 5 KCl, 2 MgCl₂, 20 HEPES; pH 7,5 (22–25 °C), встановлений за допомогою NaOH. У цьому розчині перебували клітини під час реєстрації базової мембранної провідності перед активацією ASIC-рецепторів.

Для їх збудження застосовували активаційний розчин аналогічного складу, за винятком буфера HEPES, який замінювали на MES (20 мМ/л); pH розчину встановлювали на рівні 6,0 за допомогою NaOH. Перехід від кондиціонуючого до активаційного розчину спричинював активацію кислоточутливих іонних каналів

(ASICs) та збільшення трансмембранного струму, амплітуду якого визначали відносно базового рівня.

Амплітуда струмів, опосередкованих ASIC1a, варіювала від 400 пА до 1,5 нА. Ці струми швидко десенситизувалися протягом 10–15 с і були чутливими до 100 мкМ амілориду (рис. 2.10), що підтверджує їх походження від активації рН-чутливих іонних каналів [122]. Експерименти проводили при кімнатній температурі (21 ± 2 °C). Усі хімічні реагенти, використані під час дослідів, були придбані в компанії Sigma (США).

Результати RT-PCR аналізу загальної РНК, виділеної з клітин лінії HEK293, свідчать, що ці клітини ендогенно експресують лише ген hASIC1a, який кодує однойменну субодиницю рецепторів [122]. Таким чином, зареєстровані струми зумовлені активацією гомомерних людських ASIC1a рецептор-каналних комплексів.

Реєстрацію протон-індукованих струмів, опосередкованих активацією ASIC-рецепторів у сенсорних нейронах DRG мишей і щурів, проводили за тією ж методикою, що й у клітинах лінії HEK293 із експресованими ASIC1a. Періодичне прикладання активаційного розчину до клітин (з інтервалом 3 хв) дозволяло досягти стаціонарного значення ASIC-струму (I_0). Надалі, за тих самих умов, досліджували струми у присутності тестованої речовини та визначали нове стаціонарне значення (I). Досліджувану речовину додавали в обидва розчини, кондиціонуючий та активаційний, у заданих концентраціях. Оцінюваними параметрами ASIC-струму були амплітуда в максимумі та кінетичні характеристики викликаної відповіді (у разі, якщо речовина помітно впливала на динаміку струму). Для порівняння ефекту розраховували відсоткове співвідношення амплітуди струму у присутності речовини (I) до контрольного значення (I_0).

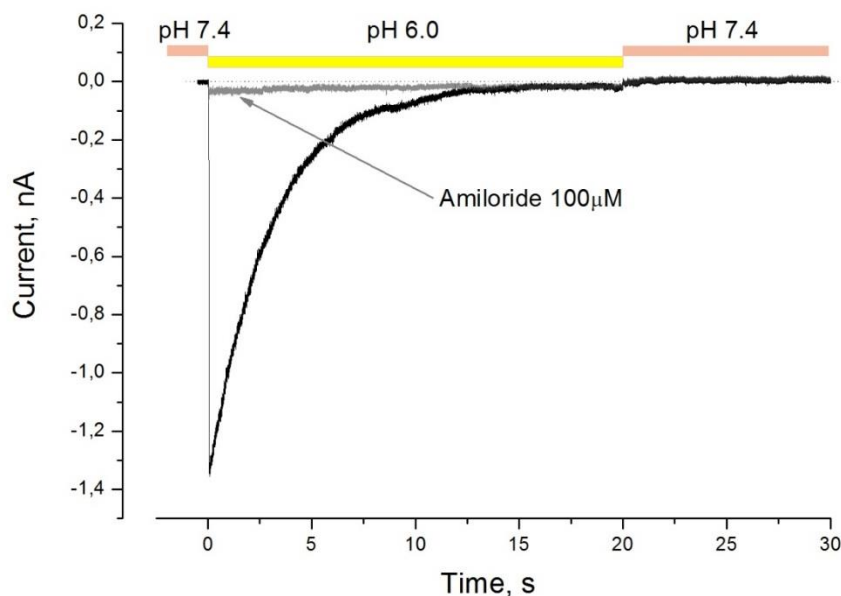


Рис. 2.10. Динаміка розвитку струму, опосередкованого активацією hASIC1a рецептор-канальних комплексів у клітинах лінії HEK293 (чорна лінія). Сірим позначено залишковий струм у присутності 100 μM амілориду в позаклітинному розчині.

2.3.10. Аналіз даних patch-clamp експериментів

Для початкового аналізу даних patch-clamp експериментів використовували програму PatchMaster v.2×69 (НЕКА, Німеччина). Для статистичної обробки результатів застосовували програмне забезпечення Origin Pro 8.5 (Origin Lab. Corp., Northampton, MA, США). Всі експериментальні дані наведені як середнє $\pm$ стандартна помилка середнього (SEM). Для порівняння амплітуд струмів використовували парний t-тест Стюдента. Рівень статистичної значущості встановлювали на рівні 0,05, якщо не зазначено інше.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Залежність спонтанної і викликанної електричної активності нервових закінчень шкіри від зміни температури у межах фізіологічного діапазону

3.1.1. Загальна характеристика полімодальних ноцицептивних аферентів шкіри

У дослідженні було вивчено 71 полімодальне ноцицептивне аферентне волокно типу СМН, що іннервує волосисту поверхню шкіри стопи. Протестовані СМН-волокна мали швидкість проведення імпульсів менше 1,2 м/с при температурі 30 °С (див. розділ «Матеріали та методи»).

Мета цього дослідження полягала у вивченні впливу температури у межах фізіологічних значень на електричну активність ноцицептивних аферентів у шкірі мишей. Досліджено вплив аллогенних факторів, підвищеного рівня АТФ, K^+ та H^+ , на генерацію ПД полімодальними СМН-волокнами підшкірного нерва (n. saphenous) при трьох різних температурах у фізіологічному діапазоні, 20, 30 та 40 °С. Підвищення температури з 30 до 40 °С за нормальних контрольних умов призводило до статистично значущого збільшення спонтанної базальної активності (генерації ПД) досліджуваних нервових волокон з 0.1 ± 0.01 імп/с (Гц) при 30 °С до 0.22 ± 0.02 імп/с при 40 °С ($n = 71$, $p < 0.001$; однофакторний дисперсійний аналіз для повторних вимірів із пост-хок тестом Бонферроні). Зниження температури до 20 °С спричиняло протилежний ефект: спонтанна активність ноцицептивних аферентів зменшувалася до 0.06 ± 0.01 імп/с ($p = 0.18$; рис. 3.8А).

Підвищення температури також призводило до статистично значущого збільшення швидкості проведення нервових волокон. Швидкість проведення у

немієлінізованих С-волокон становила $0,68 \pm 0,07$ м/с при $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ і зростала при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $0,95 \pm 0,11$ м/с ($p < 0,001$; $n = 71$; однофакторний дисперсійний аналіз для повторних вимірювань із пост-хок тестом Бонферроні). Зниження температури з $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ спричиняло протилежний ефект: швидкість проведення зменшувалася до $0,49 \pm 0,05$ м/с ($p = 0,02$; $n = 71$; рис. 3.1Б). Різниця у швидкості проведення нервових аферентів між $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ була також статистично достовірною ($p < 0.001$; $n = 71$).

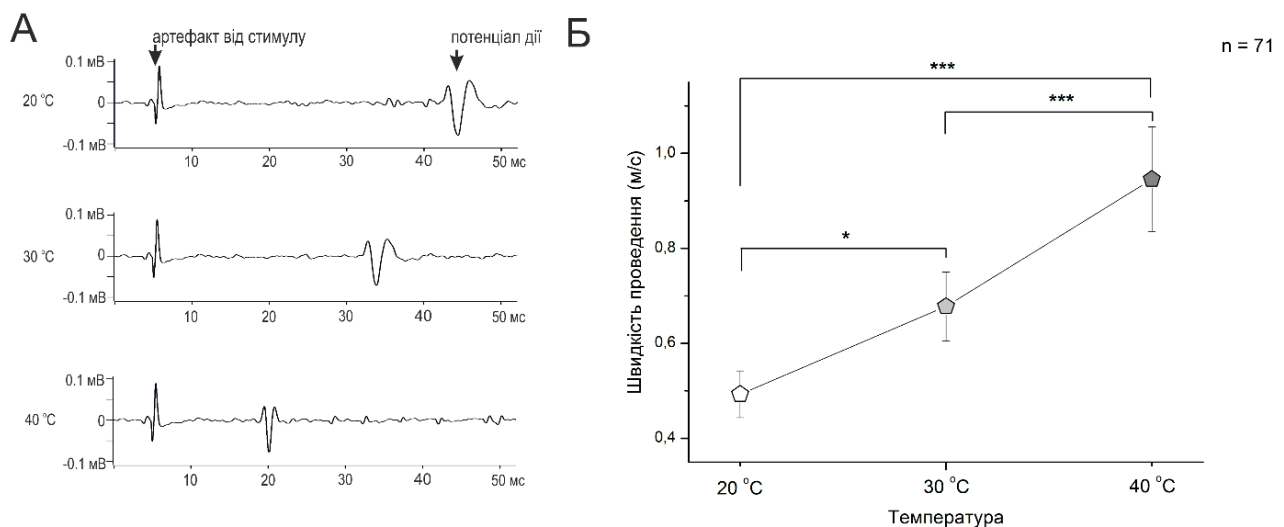


Рис. 3.1. А. Швидкість проведення потенціалу дії по поодинокому С-волокну за температури 20, 30 і 40 °C. Стрілками позначено артефакт електричної стимуляції та потенціал дії; вісь x — часова затримка (мс); вісь y — амплітуда напруги (мВ). Б. Залежність швидкості проведення нервових імпульсів (потенціалів дії) по С-волоконках від температури ($n = 71$).

На рисунку 3.1А показано репрезентативний запис електричної активності поодинокого С-волокну у відповідь на електричну стимуляцію при 20, 30 та 40 °C. На записі видно зміну швидкості проведення імпульсу та форми ПД відповідно до зміни температури у межах фізіологічних значень. Підвищення температури призводить до достовірного зростання швидкості проведення, а зниження температури має протилежний ефект (рис. 3.2Б).

3.1.2. Вплив зміни температури на протон-викликане збудження ноцицептивних аферентів шкіри

У цій експериментальній групі було досліджено 33 полімодальних механотермочутливих волокна шкіри (СМН). Для стимуляції рецептивних полів чутливих закінчень ноцицептивних аферентів іонами H^+ проводили послідовну суперфузію буферним розчином із низьким вмістом бікарбонату з рН 6,7 при температурах 20, 30 та 40 °С протягом 20 хв. Контрольну активність реєстрували при рН 7,4 протягом 20 хв до та після аплікації розчину з пониженим рН при заданій температурі. Зазначений протокол використовували для оцінки температурної залежності кислотно-індукованої активності полімодальних ноцицепторів.

Полімодальні волокна типу СМН демонстрували спорадичну та нерегулярну базальну активність за контрольних умов при температурі 30 °С і рН 7,4, із середньою частотою ПД 0.1 ± 0.02 імп/с (рис. 3.2). Перфузія рецептивних полів розчином з рН 6,7 призводило до підвищення частоти генерації ПД шкірними нервовими аферентами до $0,27 \pm 0,06$ імп/с ($n = 29$; $p = 0,334$) та підвищення імпульсації ПД у 69,7 % (23/33) полімодальних ноцицептивних СМН-аферентів.

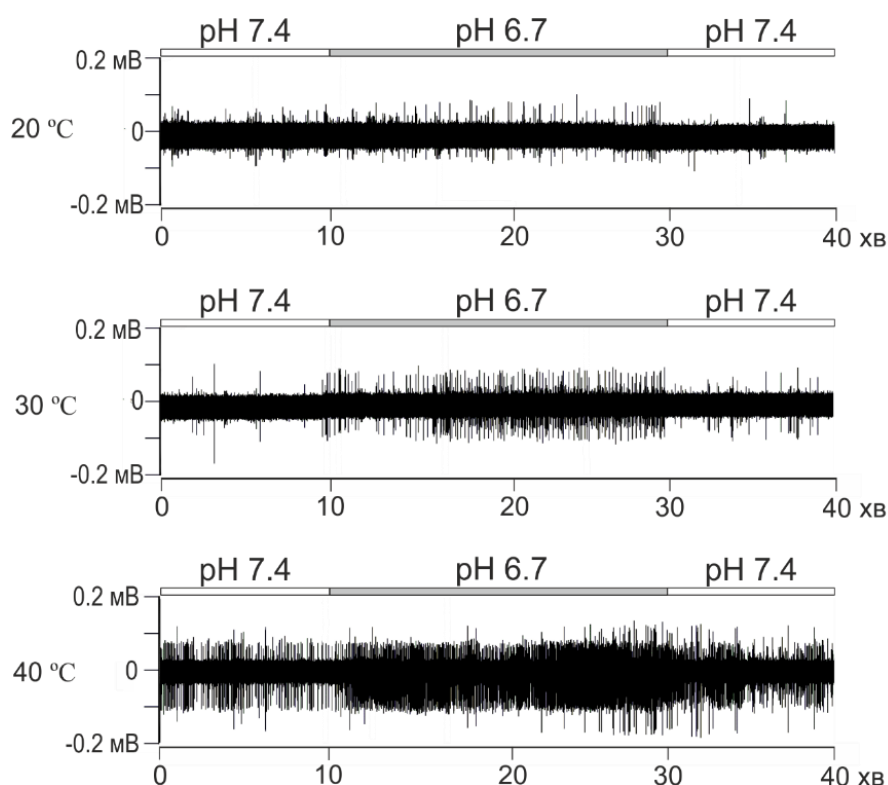


Рис. 3.2. Приклад записів електричної активності полімодальних СМН-аферентів шкіри одних і тих самих нервових волокон у складі одного нервового філамента у відповідь на хімічну стимуляцію розчином з рН 6,7 протягом 20 хв при температурах 20, 30 та 40 °С.

При перфузії сенсорних нервових закінчень шкіри стандартним розчином з рН 7.4 при 40 °С частота імпульсації ПД нервовими волокнами зросла до 0.24 ± 0.04 імп/с. Аплікація розчину із рН 6.7 при 40 °С на чутливі нервові закінчення шкіри спричинило достовірне збільшення частоти імпульсів (ПД) у первинних аферентах до 0.65 ± 0.12 імп/с ($n = 29$, $p < 0,001$) і активувало 87.9% (29/33) аферентних аферентів. При зниженні температури до 20 °С полімодальні волокна типу СМН демонстрували низьку спорадичну та нерегулярну базальну електричну активність за контрольних умов (рН 7,4), із середньою частотою ПД $0,07 \pm 0,018$ імп/с. Суперфузія розчином з рН 6.7 при 20 °С не змінювала середню частоту імпульсів аферентних волокон (0.065 ± 0.01 $n = 29$; $p = 1$).

На рисунку 3.3А представлено оглядову статистику залежності спонтанної та протон-індукованої зміни частоти ПД полімодальних ноцицептивних

аферентних нервових волокон типу СМН у препараті «шкіра–нерв» миші *ex vivo* за температури 20, 30 і 40 °С. Частоту нервової імпульсації усереднено в інтервалах по 1 хвилині.

Частота імпульсації ПД шкірними аферентами під час перфузії їх рецепторних полів розчином із низьким рН була достовірно вищою за температури 40 °С порівняно з 30 °С ($p = 0,0005$) та 20 °С ($p < 0,001$; рис. 3.3Б). Частота як спонтанної, так і протон-індукованої імпульсації під час перфузії розчином з рН 6,7 зростала зі збільшенням температури, досягаючи мінімальних значень при 20 °С та максимальних при 40 °С.

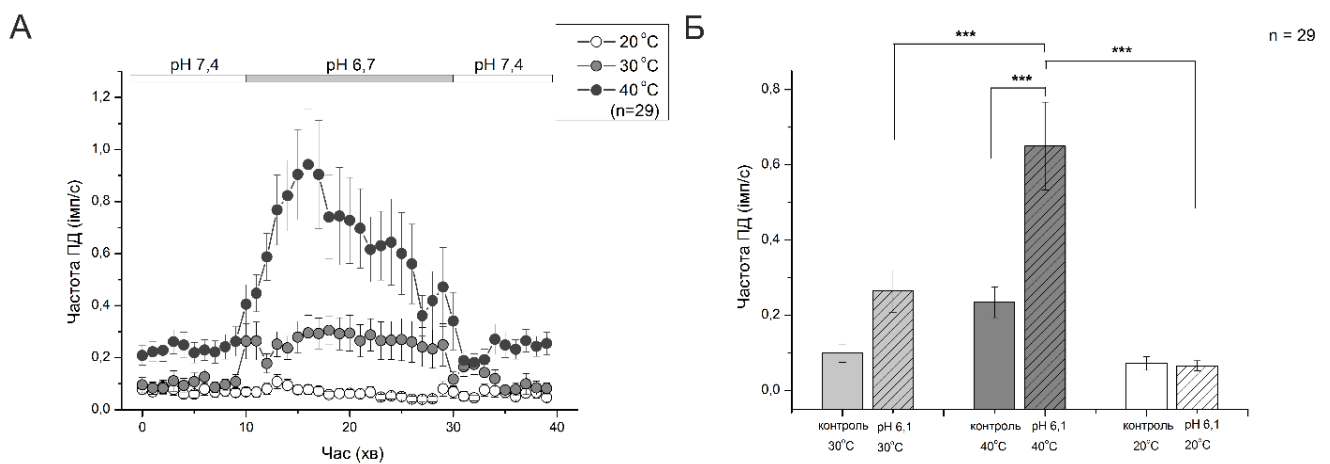


Рис. 3.3. А. Залежність спонтанної та протон-індукованої електричної активності СМН-аферентів від температури. Б. Діаграма залежності спонтанної та протон-індукованої активності СМН-аферентів від температури (** $p < 0,001$).

Таким чином, частота нервової імпульсації під час перфузії розчином з рН 6,7 була найвищою при 40 °С і найнижчою при 20 °С. Підвищення температури також супроводжувалося зростанням чутливості нервових волокон до помірного зниження рН до 6,7.

3.1.3. Вплив зміни температури на АТФ-викликане збудження ноцицептивних аферентів шкіри

Даній цій експериментальній групі досліджено електричну активність 15 СМН аферентів шкіри. Рецептивні поля сенсорних закінчень стимулювали

послідовною довготривалою перфузією стандартним насиченим розчином Кребса–Генсelayта з АТФ 200 μM протягом 30 хв із інтервалом у 60 хв при трьох різних температурах (20, 30 та 40 $^{\circ}\text{C}$). Кількість С-аферентів, активованих АТФ, а також їхня електрична активність, як під час аплікації АТФ, так і за контрольних умов, демонстрували достовірну залежність від температури (рис. 3.4).

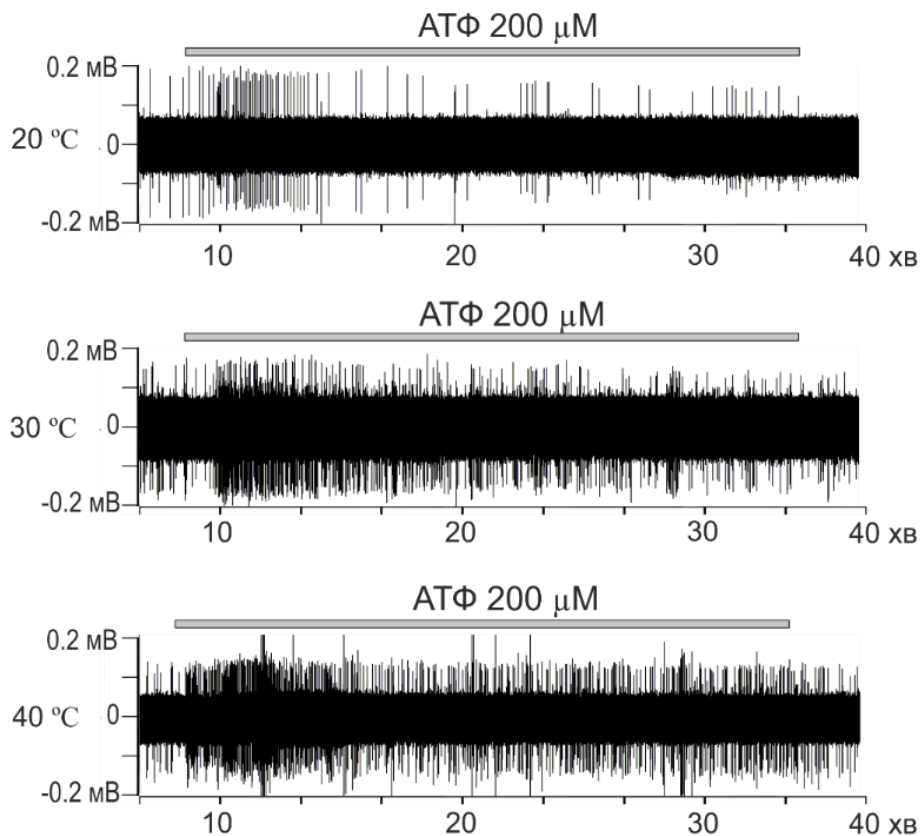


Рис. 3.4. Приклад оригінального запису електричної активності тих самих полімодальних СМН-аферентів шкіри у відповідь на хімічну стимуляцію розчином АТФ (200 μM) протягом 30 хв при 20, 30 та 40 $^{\circ}\text{C}$. Ділянки записів спонтанної активності (по 25 хв до та після аплікації АТФ) не наведено.

На рисунку 3.5А показано результати статистичного узагальнення даних щодо залежності спонтанної та АТФ-викликані імпульсації чутливих закінчень аферентних полімодальних СМН-волокон шкіри від температури у фізіологічному діапазоні (20, 30 і 40 $^{\circ}\text{C}$). Частота імпульсації ПД усереднена за 2-хвилинні інтервали.

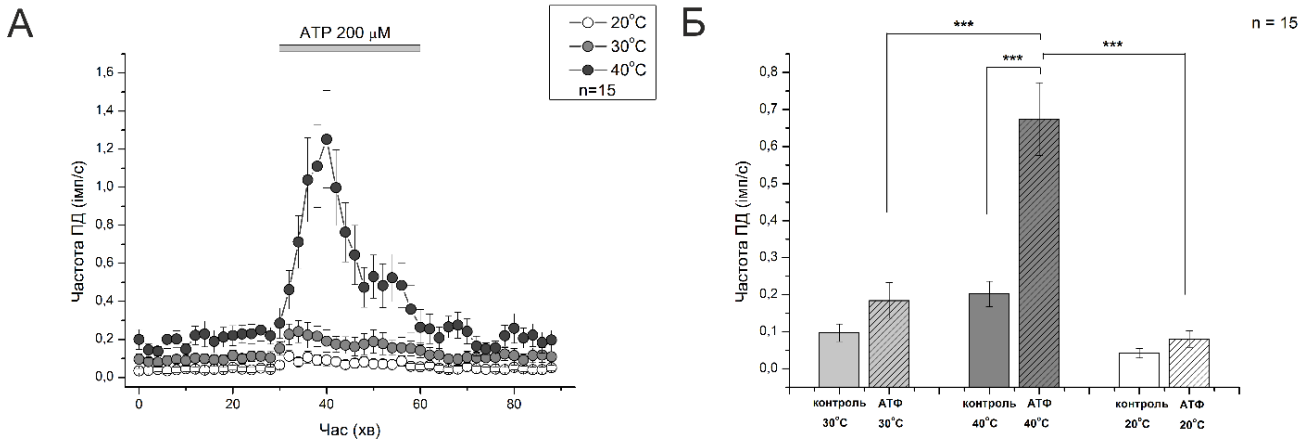


Рис. 3.5. А. Графік залежності спонтанної та АТФ-викликані електричної активності полімодальних СМН-волокон від температури (20, 30 і 40 °С). Б. Діаграма залежності спонтанної і АТФ-викликані електричної активності СМН-аферентів від температури (*** $p < 0,001$).

За контрольних умов при 30 °С СМН-аференти мали спонтанну базальну активність $0,10 \pm 0,02$ імп/с. Перфузія рецептивних полів розчином АТФ активувала 73,3 % (12 із 15) нервових волокон і зумовлювала статистично несуттєве підвищення середньої частоти імпульсації до $0,18 \pm 0,05$ імп/с ($n = 15$; $p = 1$; рис. 3.5Б). При 40 °С АТФ активував 100 % (15 із 15) нервових волокон і підвищував частоту ПД із $0,20 \pm 0,03$ імп/с за контрольних умов до $0,67 \pm 0,11$ імп/с під час аплікації АТФ ($n = 15$; $p < 0,001$). Частота ПД нервових аферентів шкіри під час перфузії рецептивних полів розчином АТФ (200 μМ) при 40 °С була достовірно вищою порівняно з частотою ПД при 30 °С ($p < 0,001$) і 20 °С ($p < 0,001$). При 20 °С АТФ активував 53 % (8 із 15) нервових волокон і спричиняв статистично несуттєве збільшення частоти імпульсації з $0,04 \pm 0,01$ імп/с за контрольних умов до $0,08 \pm 0,02$ імп/с під час аплікації АТФ ($n = 15$; $p = 1$).

Отже, підвищення температури у фізіологічних межах (від 20 до 40 °С) підвищує чутливість ноцицептивних аферентів до АТФ та посилює АТФ-індуковану нервову імпульсацію.

На графіку, представленою на рисунку 3.8В, показано залежність кількості полімодальних аферентних нервових волокон, активованих АТФ або за умов рН 6,7, від температури. Підвищення температури з 20 до 40 °С призводило до

збільшення кількості С-волокон, активованих зниженням до рН 6,7 або АТФ 200 μ М. Для порівняння як контрольну речовину-активатор застосовували КСІ у концентрації 10,8 мМ/л, який активував 100 % волокон за всіх досліджених значень температури.

3.1.4. Вплив температури на збудження ноцицептивних аферентів шкіри, індуковане високою концентрацією K^+

У даній серії експериментів досліджено 23 нервові волокна типу СМН. Підвищення концентрації іонів калію у безпосередній близькості до нервового закінчення спричинює деполяризацію та активацію волокон, що асоціюється із розвитком тривалого больового відчуття [123, 124]. Аплікація розчину Кребса–Генселейта з підвищеним вмістом калію (10,8 мМ/л K^+), що удвічі перевищує контрольну концентрацію (5,4 мМ/л K^+), на рецептивне поле аферентних закінчень спричиняла активацію всіх досліджуваних аферентів шкіри (100 %, 23/23) за всіх протестованих температур (рис. 3.6).

За контрольних умов при концентрації K^+ 5.4 мМ/л у розчині для перфузії при температурі 30 °С спостерігалася спонтанна базальна активність $0,09 \pm 0,02$ імп/с (рис. 3.7А). Аплікація розчину з підвищеним вмістом K^+ (10,8 мМ/л) викликала статистично достовірне підвищення частоти ПД до $0,42 \pm 0,07$ імп/с ($n = 23$; $p = 0,0002$; рис. 3.7Б). Підвищення температури розчину для перфузії до 40 °С супроводжувалося зростанням базальної активності аферентів до $0,20 \pm 0,04$ імп/с. Аплікація розчину з 10,8 мМ/л K^+ при цій температурі спричиняла подальше збільшення частоти ПД до $0,79 \pm 0,13$ імп/с ($p < 0,001$ порівняно з контролем).

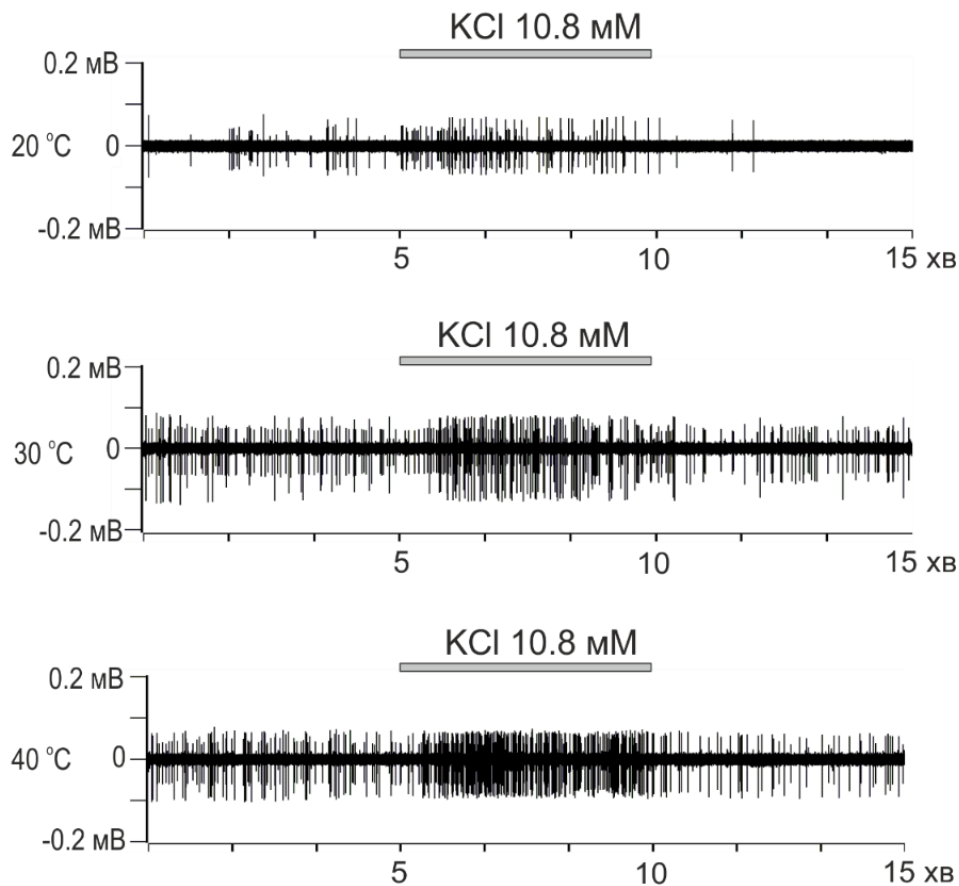


Рис. 3.6. Приклад запису спонтанної та K^+ -індукованої електричної активності С-волокон при 20, 30 та 40 °C.

Зниження температури до 20 °C супроводжувалося менш вираженою відповіддю: суперфузія розчином із високим вмістом калію підвищувала частоту імпульсації первинних аферентів із $0,06 \pm 0,01$ до $0,23 \pm 0,04$ імп/с ($n = 23$; $p = 0,195$).

Частота нервової імпульсації ноцицептивних аферентів шкіри у відповідь на стимуляцію їх чутливих закінчень розчином із високим вмістом K^+ при 40 °C була максимальною і достовірно вищою, ніж при 30 °C ($p < 0,001$) та 20 °C, при якій частота ПД мала мінімальне значення ($p < 0,001$; рис. 3.7Б). Таким чином, K^+ -індуковане збудження аферентів шкіри демонструє достовірну температурну залежність.

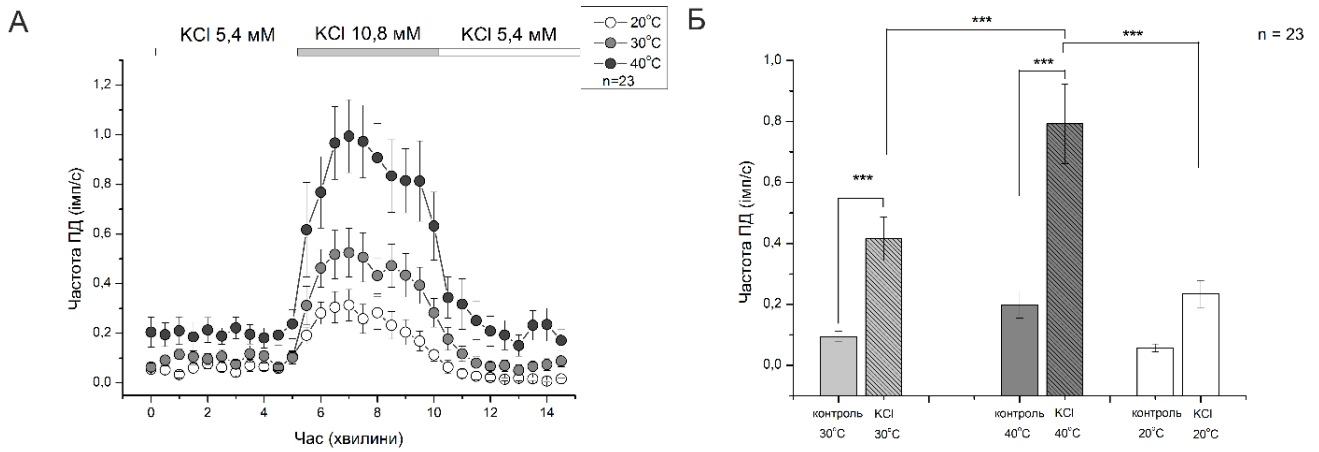


Рис. 3.7. А. Графік залежності частоти ПД (усередненої за 20-секундні інтервали) спонтанної та K^+ -індукованої електричної активності полімодальних СМН-волокон шкіри при температурах 20, 30 і 40 °С. Б. Діаграма залежності спонтанної і K^+ -викликанної електричної активності СМН-аферентів від температури (***) $p < 0,001$).

Таким чином, зростання температури викликало зростання як частоти ПД спонтанної активності, так і зростання частоти ПД у відповідь на подразнення H^+ , АТФ, K^+ . На рисунку 3.8Б показано величину зростання частоти ПД нервових волокон у відповідь на хімічне подразнення порівняно із частотою ПД за контрольних умов – Δ .

3.1.5. Q_{10} та енергія активації, розраховані на основі спонтанної та викликанної електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри

Графік Арреніуса демонструє залежність частоти нервової імпульсації СМН-ноцицептивних аферентів від температури у межах 20–40 °С (рис. 3.8Г). Генерація ПД є енергозалежним процесом; енергію активації визначали на основі даних Арреніус-аналізу відповідно до формул (2.1) і (2.2) (див. розділ 2.1.10). У розрахунках використано усереднені значення частоти імпульсації (середнє $\pm$ стандартна похибка середнього) за контрольних умов і за умов хімічної стимуляції. Параметри лінійної регресії, на основі яких визначалися значення

енергії активації (E_a , кДж/моль) та температурного коефіцієнта Q_{10} , наведено у розділі «Матеріали та методи».

Отримані значення енергії активації становили: для базальної електричної активності за контрольних умов $51,4 \pm 8,6$ кДж/моль; для збудження аферентів розчином K^+ (10,8 мМ/л) $46,7 \pm 2,5$ кДж/моль; для стимуляції АТФ (200 μ М) $83,6 \pm 10,6$ кДж/моль; для стимуляції розчином з рН 6,7 $87,1 \pm 8,6$ кДж/моль.

Значення температурного коефіцієнта Q_{10} для частоти імпульсації в інтервалі 20–30 °С становили: $2,01 \pm 0,2$ за контрольних умов; $1,88 \pm 0,06$ при стимуляції K^+ (10,8 мМ/л); $3,11 \pm 0,44$ при стимуляції АТФ (200 μ М); $3,25 \pm 0,38$ при стимуляції розчином з рН 6,7.

Значення Q_{10} у діапазоні температур 30–40 °С становили: $1,92 \pm 0,21$ за контрольних умов; $1,81 \pm 0,06$ при стимуляції K^+ ; $2,89 \pm 0,39$ при стимуляції АТФ (200 μ М); $3,02 \pm 0,33$ при стимуляції розчином з рН 6,7.

Значення Q_{10} для швидкості проведення нервового імпульсу у немієлінізованих С-волокнах становили $1,38 \pm 0,023$ у діапазоні 20–30 °С та $1,40 \pm 0,034$ у діапазоні 30–40 °С.

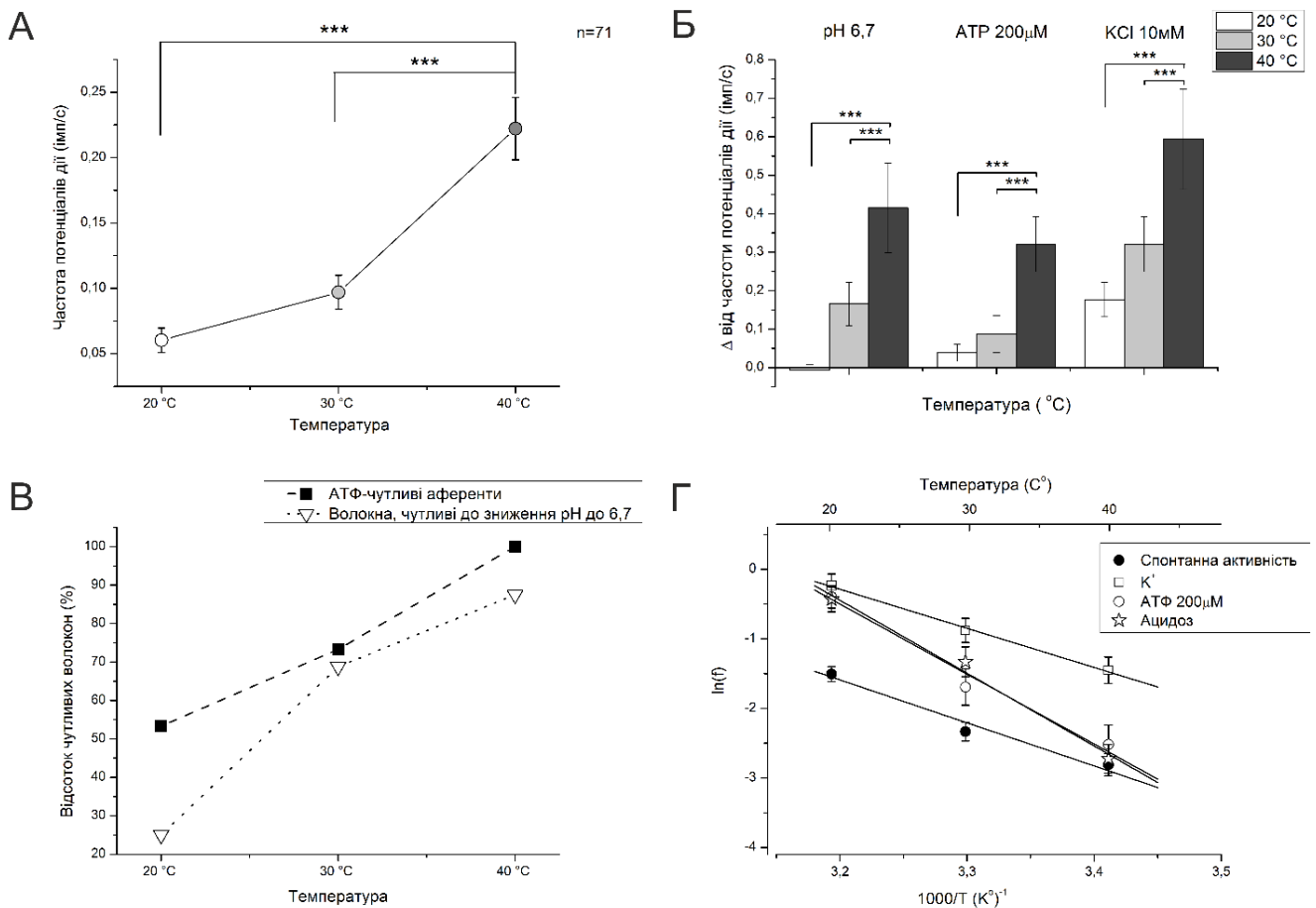


Рис. 3.8. А. Залежність спонтанної базальної активності полімодальних ноцицептивних аферентів від температури. Б. Різниця між середнім значенням частоти ПД під час хімічної стимуляції та значенням спонтанної активності нервових аферентів за контрольних умов (Δ, дельта) при 20, 30 та 40 °C. В. Графік кількості активованих нервових полімодальних нервових аферентів шкіри. Г. Графік Арреніуса, що демонструє температурну залежність частоти імпульсації СМН-ноцицепторів. Позначення - * на графіках: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Таким чином, найвищі значення температурного коефіцієнта Q_{10} спостерігалися для збудження ноцицепторів у відповідь на ацидоз і АТФ. Це може свідчити про потенційно синергічну дію підвищення температури на активацію протон-чутливих та пуринергічних рецепторів. Отримане значення Q_{10} для швидкості проведення у С-волокнах (1,4) у межах фізіологічного діапазону

температур (20–40 °C) узгоджується з температурною залежністю іонного струму у відкритих каналах, для яких характерні значення Q_{10} у межах 1,3–1,5 [125].

3.2. Вплив селективного антагоніста TRPV1-рецептора AMG-517 на збудження чутливих закінчень ноцицепторів шкіри мишей *ex vivo*, викликане ацидозом, підвищенням температури та капсаїцином

3.2.1. Селективний антагоніст TRPV1-рецептора AMG-517 не впливає на протон-викликане збудження ноцицептивних закінчень шкіри при pH 6,1 і температурі 40 °C

TRPV1-рецептор, що активується капсаїцином та підвищенням температури понад 43 °C, також є чутливим до зниження позаклітинного pH і здатен ініціювати активацію ноцицептивних волокон у відповідь на закислення середовища при pH < 6,0. Встановлено, що підвищення температури в межах фізіологічних значень знижує поріг активації TRPV1 під дією протонів [43]. У зв'язку з цим було висунуто припущення, що поєднання зниження pH до 6,1 та підвищення температури до 40 °C може зумовлювати активацію TRPV1 на сенсорних закінченнях аферентів, незважаючи на підпороговий характер кожного з чинників окремо. З метою перевірки цього припущення було досліджено вплив селективного антагоніста TRPV1 AMG-517 на відповідь СМН-аферентних волокон на стимуляцію pH 6,1 за температури 40 °C.

Показано, що селективний антагоніст TRPV1 AMG-517 ефективно і повністю блокує активацію струмів, викликаних капсаїцином, протонами та шкідливим підвищенням температури в клітинах CHO (Chinese hamster ovary), у яких рекомбінантно експресується TRPV1 *in vitro*, у наномолярних концентраціях, а також пригнічує капсаїцин-індуковану поведінкову больову реакцію у щурів *in vivo* при концентрації $\approx 0,7 \mu\text{M}$ [126].

У цьому експерименті протестовані СМН-волокна ($n = 22$) демонстрували спонтанну базальну активність із середньою частотою нервової імпульсації $0,08 \pm 0,025$ імп/с за контрольних умов на початку експерименту. AMG-517 у концентрації $1,3 \mu\text{M}$ сам по собі не впливав на базальну активність нервових волокон під час попередньої перфузії рецептивного поля чутливих нервових закінчень шкіри *ex vivo* ($n = 22$, $p = 0,096$). Стимуляція розчином із рН 6,1 підвищувала частоту ПД до $0,51 \pm 0,084$ імп/с ($n = 22$, $p < 0,001$), у той час як AMG-517 у концентрації $1,3 \mu\text{M}$ не мав суттєвого впливу на це протон-викликане зростання частоти ПД аферентів шкіри ($0,483 \pm 0,074$ імп/с; $n = 22$; $p = 0,298$).

На рисунку 3.9А подано приклад запису електричної активності полімодальних ноцицептивних С-волокон шкіри під час послідовної стимуляції їх рецептивного поля розчином з рН 6,1. Перша та остання (третя) стимуляції рН 6,1 використовувалися відповідно як контрольний стимул і тест на відновлення. Під час другої стимуляції нервових закінчень розчин для перфузії з рН 6,1 додатково містив селективний антагоніст TRPV1, AMG-517 у концентрації $1,3 \mu\text{M}$, ефект якого безпосередньо перевіряли на здатність пригнічувати протон-індуковану активацію ноцицептивних закінчень шкіри.

Рисунок 3.9Б ілюструє оглядову статистику електричної активності нервових волокон упродовж експерименту. На графіку зображено частоту генерації ПД ноцицептивними закінченнями шкіри протягом експериментального протоколу дослідження впливу селективного антагоніста TRPV1 AMG-517 на протон-індуковану активацію полімодальних ноцицепторів. Препарат AMG-517 у концентрації $1,3 \mu\text{M}$ не впливав ані на спонтанну, ані на протон-індуковану генерацію ПД полімодальних СМН-волокон шкіри.

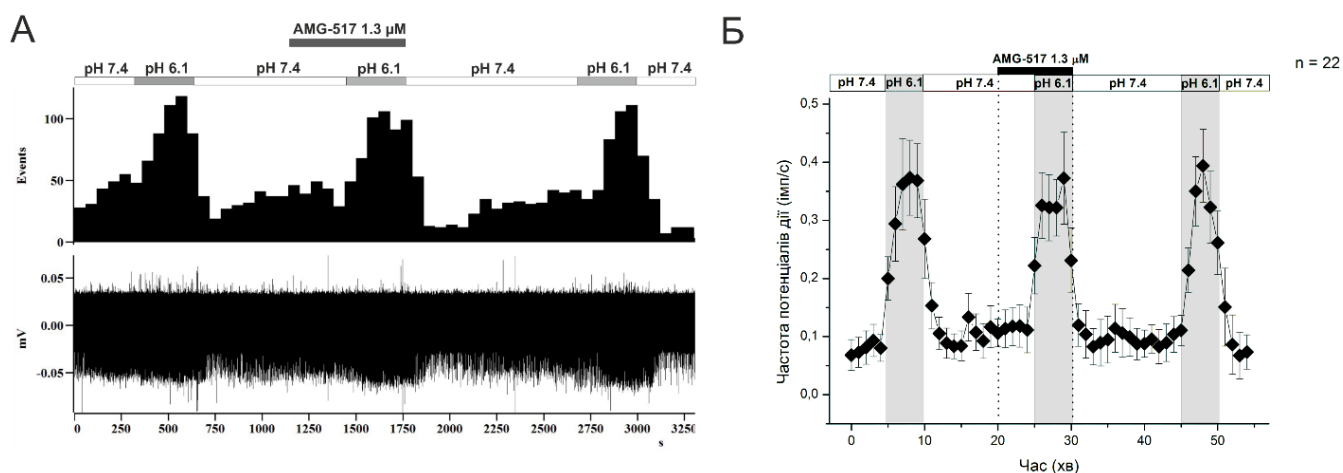


Рис. 3.9. А. Приклад запису електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри під час тестування впливу AMG-517 на їх активацію розчином із рН 6,1. У верхній частині: гістограма суми потенціалів дії (ПД) за 1 хвилину. У нижній частині: запис електричної активності нервового аферента (вісь ординат — mV; вісь абсцис — час, с). Б. Усереднена за 1-хвилинні інтервали частота ПД зареєстрована на ноцицептивних закінчень шкіри під час дослідження впливу антагоніста TRPV1 (AMG-517) на протон-викликану активацію.

Отримані результати свідчать, що одночасна дія помірного нагрівання (до 40 °C) і помірного закислення (рН 6,1) не є достатньою для активації TRPV1-рецепторів на чутливих закінченнях сенсорних нейронів шкіри, тобто ці чинники в поєднанні не знижують поріг активації рецептора до рівня, достатнього для генерації ноцицептивної відповіді [127].

3.2.2. Вплив AMG-517 на активацію полімодальних ноцицепторів у відповідь на теплову стимуляцію

Активацію аферентних закінчень полімодальних ноцицепторів за допомогою підвищення температури з 30 до 50 °C досліджували з урахуванням встановленого пригнічувального впливу AMG-517 на теплову активацію рецептора TRPV1 у клітинних моделях[126].

Рецептивні поля 13 нервових закінчень шкіри перфузували розчином AMG-517 у концентрації $5 \mu\text{M}$ протягом 5 хвилин за температури 30°C з метою преаплікації, щоб забезпечити проникнення речовини в тканини шкіри. Для температурної стимуляції використовували перфузійний розчин, нагрітий з 30 до 50°C протягом 60 секунд. Першу та останню теплові стимуляції застосовували як контрольну та тест на відновлення відповідно. Другу температурну стимуляцію проводили одразу після преаплікації AMG-517, при цьому перфузійний розчин також містив AMG-517 у концентрації $5 \mu\text{M}$ (рис. 3.10А).

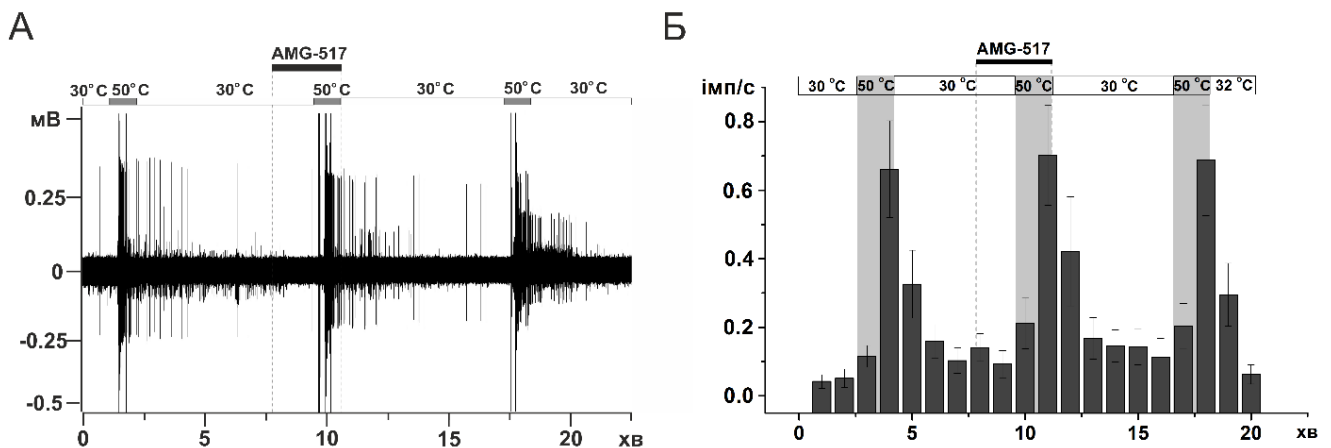


Рис. 3.10. А. Приклад запису електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри під час тестування впливу AMG-517 на їх активацію підвищенням температури до 50°C . Б. Частота ПД нервових аферентів, усереднена за 1-хвилинні інтервали, під час дослідження впливу антагоніста TRPV1 (AMG-517) на активацію аферентів підвищенням температури з 30°C до 50°C .

Досліджувані СМН-волокна ($n = 13$) демонстрували спонтанну базальну активність із частотою нервової імпульсації ПД $0,048 \pm 0,022$ імп/с за контрольних умов на початку експерименту при 30°C . Підвищення температури перфузійного розчину з 30 до 50°C спричиняло зростання частоти ПД до $0,662 \pm 0,14$ імп/с ($n = 13$; $p < 0,001$). AMG-517 у концентрації $5 \mu\text{M}$ не впливав на базальну електричну активність СМН нервових волокон під час преаплікації при 30°C ($n = 13$; $p = 1$). Додавання AMG-517 до перфузійного розчину під час теплової стимуляції також не змінювало теплову відповідь нервових волокон ($0,7 \pm 0,15$ імп/с; $n = 13$; $p = 1$; рис. 3.10Б).

Отримані результати показали, що антагоніст TRPV1-рецептора AMG-517 у концентрації 5 μM не спричиняв достовірних змін теплової відповіді полімодальних ноцицепторів шкіри *ex vivo*. Це свідчить, що активація цих ноцицепторів при температурі до 50 °C може опосередковуватися додатковими, TRPV1-незалежними механізмами термочутливості.

3.2.3. AMG-517 блокує збудження ноцицепторів, індуковане капсаїцином

Ефект AMG-517 на збудження чутливих закінчень шкіри ноцицептивних нейронів, індуковане капсаїцином, досліджували на 16 СМН-волокнах. Для аплікації капсаїцину рецептивні поля нервових закінчень шкіри перфузували розчином Кребса–Гензелейта, насиченим киснем і з капсаїцином у концентрації 20 μM протягом 5 хвилин. Як було встановлено експериментально, цього достатньо для значної активації всіх капсаїцин-чутливих нервових волокон без необхідності попереднього тестування чутливості аферентів або підбору індивідуальної концентрації капсаїцину.

Капсаїцин, залежно від концентрації та тривалості впливу, викликає тимчасову десенситизацію нервових закінчень. За результатами попередніх експериментів, для повного відновлення їх чутливості необхідна перерва між аплікаціями капсаїцину тривалістю не менше 30 хвилин. Експериментальна серія включала три послідовні капсаїцинові стимуляції. AMG-517 додавався до перфузійного розчину під час другої аплікації після 5-хвилинної преаплікації речовини на рецептивне поле. Перша та остання аплікації капсаїцину використовувалися як контрольна стимуляція та тест на відновлення відповідно (рис. 3.11А).

Перфузія рецептивного поля розчином який містив капсаїцин у концентрації 20 μM спричиняла зростання частоти ПД з базального рівня за контрольних умов $0,031 \pm 0,01$ імп/с до $0,39 \pm 0,048$ імп/с ($n = 16$, $p < 0,001$). AMG-517 значно знижував загальну відповідь до рівня базальної активності, на

87,7 % ($0,048 \pm 0,015$ імп/с; $p < 0,001$). Ефект AMG-517 був оборотним: після його відмивання відповідь на капсаїцин повністю відновлювалася під час третьої стимуляції яка слугувала тестом на відновлення активації нервових аферентів: $0,31 \pm 0,049$ імп/с; $p = 0,21$ (рис. 3.11Б).

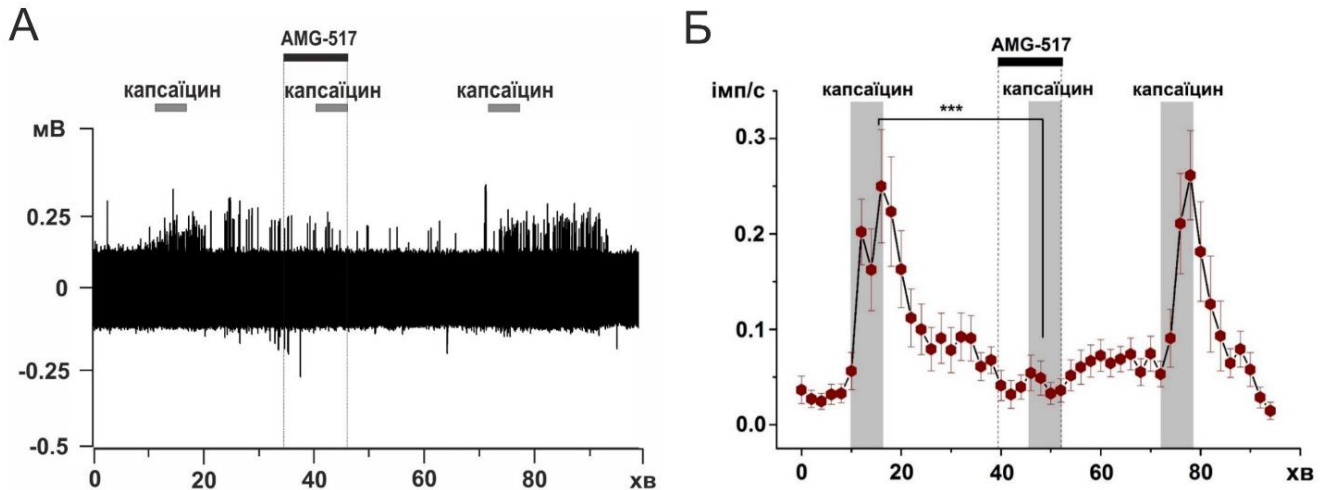


Рис. 3.11. А. Репрезентативний запис електричної активності полімодальних СМН-аферентних волокон шкіри миші під час тестування дії AMG-517 на активацію, індуковану капсаїцином. Б. Частота ПД, усереднена за двохвилинні інтервали, зареєстрована на ноцицептивних закінченнях шкіри під час дослідження впливу антагоніста TRPV1 (AMG-517) на капсаїцин-індуковану активацію аферентів (***) $p < 0.001$).

Отримані результати показали, що антагоніст AMG-517 повністю пригнічував відповідь ноцицептивних аферентів шкіри на капсаїцин, причому ця відповідь відновлювалася після відмивання препарату. Це підтверджує специфічне блокування TRPV1-рецепторів на чутливих закінченнях сенсорних нейронів.

3.2.4. Дослідження дії селективного антагоніста TRPV1 на АТФ-індуковане збудження полімодальних ноцицептивних закінчень аферентів шкіри при температурах 30 та 40 °C

Дослідження проводили з урахуванням відомого синергічного ефекту гіпертермії (підвищення температури) ацидозу та АТФ у збудженні первинних ноцицептивних нейронів [128, 129].

Згідно з експериментальним протоколом, рецептивні поля тих самих сенсорних закінчень полімодальних ноцицепторів послідовно стимулювали трьома аплікаціями перфузійного розчину, що містив АТФ у концентрації 200 μM і подавався протягом 4 хвилин, при двох температурних режимах, 30 та 40 °C (загалом шість аплікацій АТФ). Інтервали між аплікаціями становили не менше ніж 10 хвилин. Для кожної температури (30 або 40 °C) другу аплікацію АТФ (200 $\mu\text{M}/\text{л}$) проводили разом із селективним антагоністом TRPV1, AMG-517 (1,3 $\mu\text{M}/\text{л}$), після попередньої 5-хвилинної преаплікації цього антагоніста. Перша та третя аплікації АТФ слугували контрольним стимулом і тестом на відновлення відповідно. Загалом було протестовано 13 полімодальних СМН-ноцицепторів шкіри, з яких три не реагували на АТФ (200 μM) за жодного температурного режиму. Таким чином, до подальшого аналізу було включено 10 чутливих СМН-волокон.

На рисунку 3.12 представлено електричну активність тих самих нервових аферентів (частота ПД, усереднена за 1-хвилинні інтервали) під час шести послідовних аплікацій АТФ у концентрації 200 $\mu\text{M}/\text{л}$ у присутності та за відсутності AMG-517 (1,3 $\mu\text{M}/\text{л}$) при температурах 30 і 40 °C.

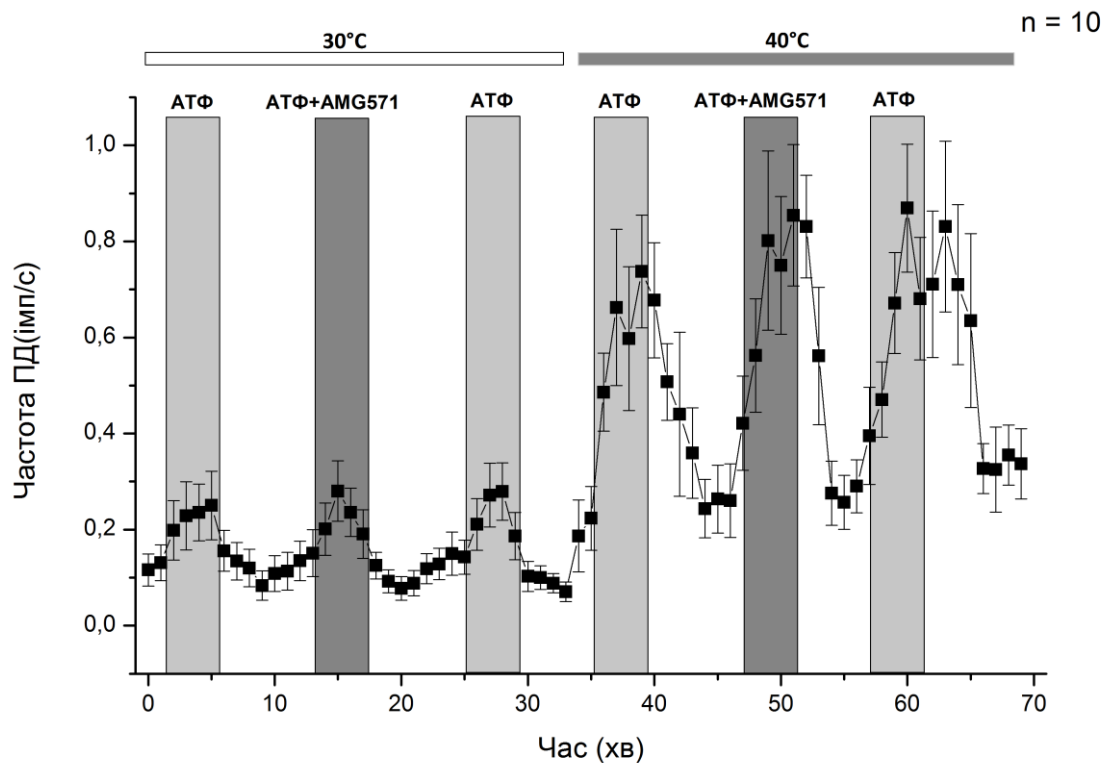


Рис. 3.12 Частота ПД, зареєстрована на ноцицептивних аферентах шкіри під час дослідження впливу AMG-517 на АТФ-індуковану активацію аферентів за температур 30 °С і 40 °С.

При температурі 30 °С аплікація АТФ у концентрації 200 μ М не спричиняла статистично достовірного зростання частоти ПД нервових волокон: з $0,12 \pm 0,03$ імп/с за контрольних умов до $0,23 \pm 0,06$ імп/с ($n = 10$; $p = 0,95$; однофакторний дисперсійний аналіз для повторних вимірів із постхок-тестом Бонферроні). AMG-517 також не впливав на спонтанну активність аферентів під час преаплікації ($p = 1$), а також не змінював відповідь на АТФ ($p = 1$).

Натомість при температурі 40 °С АТФ у концентрації 200 μ М викликав статистично достовірне підвищення імпульсації ноцицептивних аферентів, з $0,34 \pm 0,06$ імп/с до $0,67 \pm 0,13$ імп/с ($n = 10$; $p = 0,017$). Однак AMG-517 за цієї температури не впливав ані на спонтанну активність ($p = 1$), ані на відповідь на АТФ ($p = 0,994$; рис. 3.13).

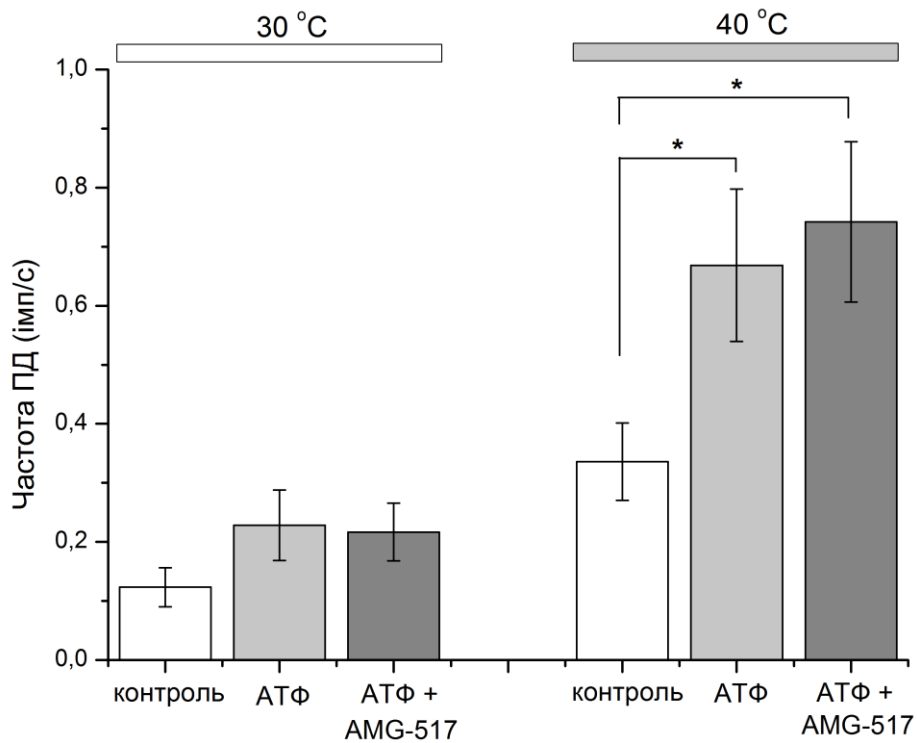


Рис. 3.13 Усереднена частота ПД, зареєстрована на ноцицептивних аферентах шкіри за, під час дослідження впливу AMG-517 на АТФ-індуковану активацію аферентів за температур 30 °C і 40 °C (* $p < 0,05$).

Таким чином, селективний антагоніст TRPV1-рецептора AMG-517 не впливав на АТФ-індуковану активацію ноцицептивних закінчень шкіри як за фізіологічної температури, так і в умовах гіпертермії (40 °C), що свідчить про відсутність залучення TRPV1-рецепторів у синергічну дію гіпертермії та АТФ на збудження сенсорних закінчень ноцицептивних аферентів.

3.3. Вплив антагоніста ASIC-рецепторів на протон-індуковану електричну активність полімодальних ноцицепторів шкіри

3.3.1. Селективний антагоніст ASIC-рецепторів диміназен у концентраціях 10 та 25 μM не впливає на активацію СМН-волокон, індуковану зниженням рН

Показано, що протон-чутливі іонні канали (ASIC) є найчутливішими сенсорами протонів [16, 39], які експресуються в чутливих закінченнях сенсорних нейронів. Доведено, що диміназен є ефективним блокатором цих рецептор-канальних комплексів із $\text{IC}_{50} \approx 0.3 \mu\text{M}$ (концентрація антагоніста, яка викликає 50 % максимального інгібування струму) [130]. Було висунуто припущення, що диміназен повинен ефективно пригнічувати збудження полімодальних СМН-волокон у відповідь на кислий рН.

Вплив диміназenu на протон-індуковану активацію СМН-аферентів шкіри *ex vivo* досліджувався у концентраціях 10 та 25 μM . Досліджувані волокна ($n = 8$) демонстрували спонтанну базальну активність із частотою ПД 0.06 ± 0.03 імп/с на початку експерименту.

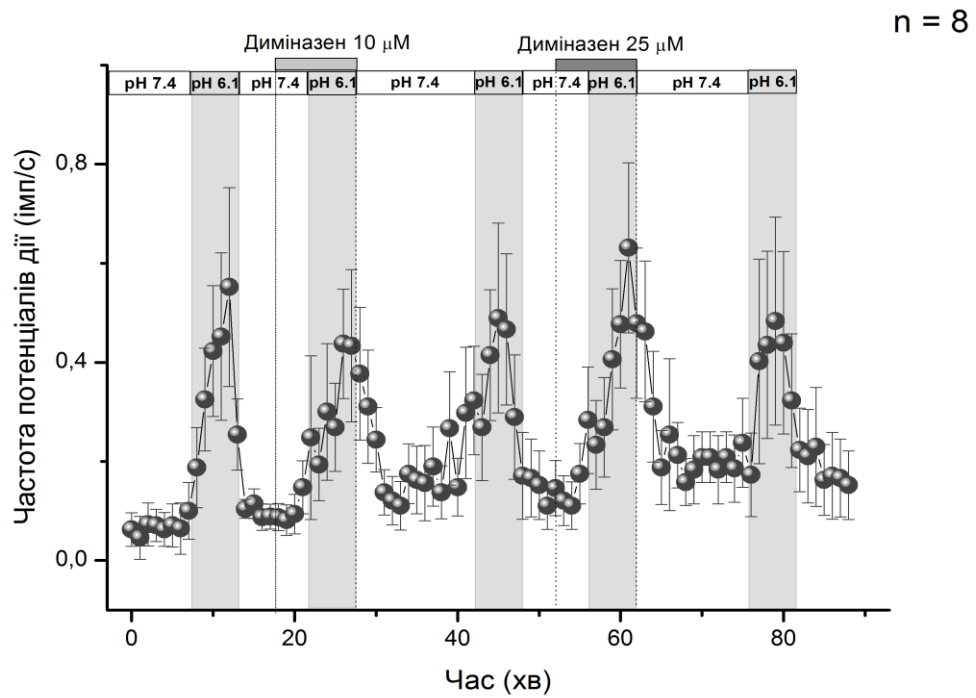


Рис. 3.14 Спонтанна та протон-індукована частота імпульсації ноцицептивних аферентів шкіри миші, усереднена за 1-хвилинні інтервали, під час тестування впливу диміназону (10 і 25 μM) на протон-викликану активацію.

Диміназен сам по собі не впливав на спонтанну активність під час пре-аплікації: частота імпульсації становила 0.01 ± 0.03 імп/с при концентрації 10 μM ($n = 8$; $p = 0.291$) і 0.13 ± 0.05 імп/с при 25 μM ($p = 0.14$). Стимуляція кислим розчином з pH 6.1 викликала зростання частоти імпульсації до 0.68 ± 0.17 імп/с ($n = 8$; $p = 0.00416$). Одночасна аплікація диміназону з розчином із pH 6,1 не змінювала частоту генерації ПД яка становила 0.53 ± 0.12 імп/с при 10 μM ($n = 8$; $p = 0.157$) і 0.68 ± 0.17 імп/с при 25 μM ($n = 8$; $p = 0.972$). Таким чином, диміназен у концентраціях до 25 μM не впливає на протон-індуковане збудження чутливих нервових закінчень шкіри миші *ex vivo* (рис. 3.14).

3.3.2. Селективний антагоніст ASIC-рецепторів диміназен пригнічує протон-індуковані струми в сомах первинних сенсорних DRG-нейронів миші

Оскільки диміназен у концентраціях 10 та 25 μM не впливав на протон-індуковану активацію чутливих закінчень шкіри миші, у дисертаційному дослідженні було використано метод patch-clamp для вивчення його впливу на електричну активність нативних протон-чутливих іонних каналів, що експресуються в DRG-нейронах мишей. Відомості про його дію на протон-індуковані струми в сенсорних нейронах *in vitro* до цього часу були відсутні.

Дослідження трансмембранних струмів показало, що диміназен викликає дозозалежне інгібування ASIC-струмів, індукованих різким зниженням pH із 7.4 до 6.0 у DRG-нейронах мишей, з $\text{IC}_{50} = 16.9 \pm 4.4 \mu\text{M}$ (рис. 3.15), що є значно вищим за раніше повідомлені значення для окремих субодиниць ASIC (від 0,3 до 3 μM) [130]. ASIC-струми в цих нейронах майже повністю пригнічувалися при концентрації диміназену 100 μM . Таким чином, диміназен ефективно пригнічує електричну активність нативних ASIC-каналів у сомах сенсорних нейронів DRG мишей лише у високих мікромолярних концентраціях.

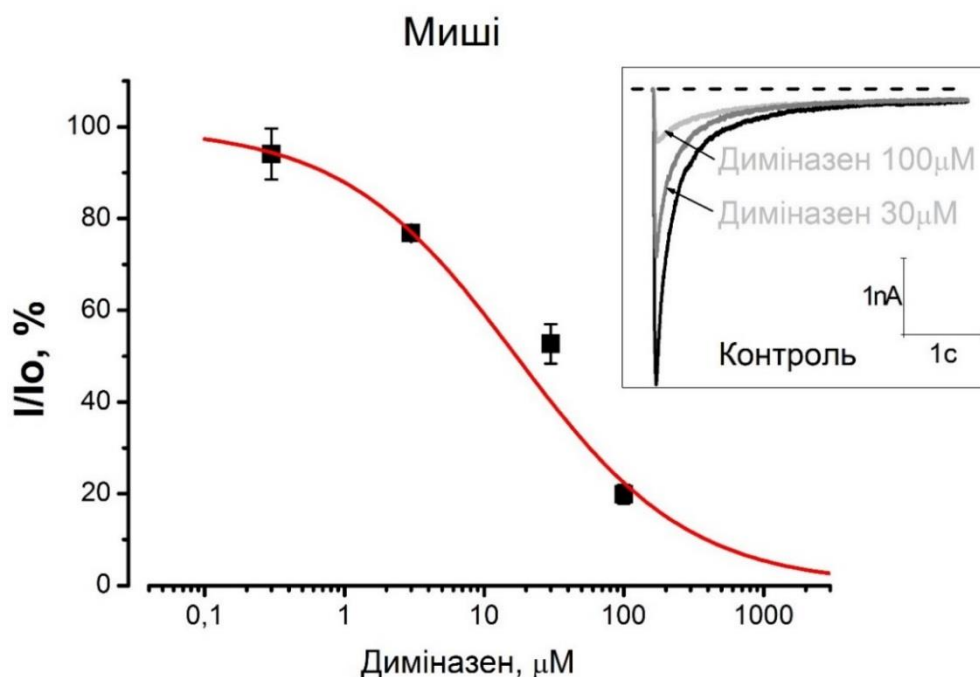


Рис. 3.15. Дозо-залежність протон-викликаних трансмембранних катіонних струмів від концентрації диміназenu на первинній культурі сенсорних DRG-нейронів. Вставка на графіку показує приклади протон-активованих струмів на DRG-нейроні: відповідь на контрольний стимул розчином із низьким рН 6.0 і пригнічення протон-активованих струмів при застосуванні диміназenu у концентраціях 30 і 100 μM .

3.3.3. Диміназен і AMG-517 не впливають на протон-індуковане збудження СМН-волокон

Перфузія рецептивних полів чутливих закінчень сенсорних ноцицептивних нейронів розчином із рН 6,7 протягом 5 хвилин спричиняла підвищення частоти імпульсації аферентів шкіри у 12 з 24 СМН-волокон, що становить 50 % загальної вибірки. У цій групі протон-чутливих полімодальних ноцицепторів спостерігалось зростання частоти імпульсації з базального рівня $0,07 \pm 0,02$ імп./с за контрольних умов при рН 7,4 до $0,23 \pm 0,04$ імп./с під час дії буферного розчину з рН 6,7 ($n = 12$; $p < 0,001$). Перфузія AMG-517 у концентрації 1,3 μM , а також його одночасне застосування з диміназеном (25 μM) не змінювали рівень спонтанної активності під час преаплікації: частота імпульсації ПД становила $0,08 \pm 0,02$

імп./с для AMG-517 ($p=1$) і $0,09 \pm 0,02$ імп./с для комбінації AMG-517 з диміназеном ($p=1$). Крім того, ці речовини не впливали на частоту імпульсації у відповідь на розчин рН 6,7: $0,24 \pm 0,04$ імп./с при одночасній аплікації AMG-517 ($p=1$) і $0,25 \pm 0,05$ імп./с при застосуванні комбінації AMG-517 з диміназеном ($p=1$).

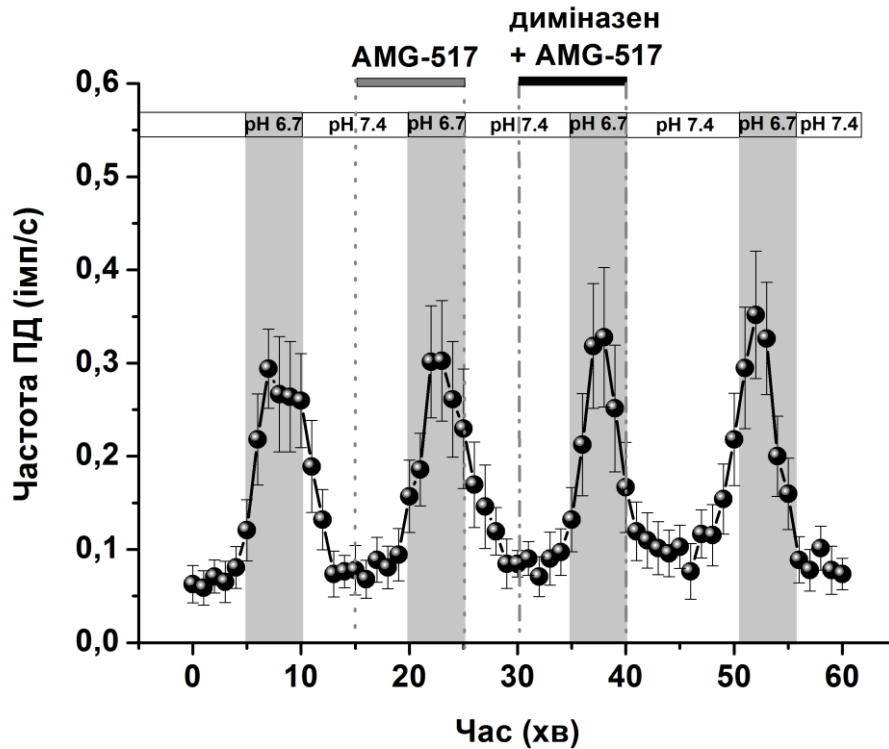


Рис. 3.16. Частота ПД зареєстрована на полімодальних С-волоконках (імп./с), усереднена за 60-секундними інтервалами, під час тестування впливу AMG-517 та диміназеноу на протон-індуковану відповідь ($n = 12$).

Таким чином, аплікація селективного блокатора TRPV1 AMG-517 ($1,3 \mu\text{M}$), а також його комбінація з блокатором ASIC-рецепторів диміназеном ($25 \mu\text{M}$) не впливали на протон-індуковану активацію первинних полімодальних ноцицептивних волокон шкіри миші (рис. 3.16), що свідчить про те, що зниження рН до 6,7 є недостатнім для активації TRPV1-рецепторів.

3.3.4. Диміназен у концентрації 100 μ M посилює протон-індуковану електричну активність полімодальних СМН-аферентів шкіри миші

Результати, отримані за допомогою методики patch-clamp щодо впливу диміназenu на нативні ASIC-рецептори, експресовані в сенсорних нейронах DRG мишей *in vitro* (див. розділи 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3), спонукали нас підвищити його концентрацію в експериментах із чутливими нервовими закінченнями шкіри в препараті шкіра–нерв *ex vivo*.

У цій серії експериментів досліджені СМН-волокна ($n = 13$) демонстрували спонтанну базову активність із частотою ПД $0,05 \pm 0,02$ імп./с за контрольних умов. Стимуляція розчином зі зниженим рН (6,1) статистично достовірно підвищувала середню частоту імпульсації до $0,4 \pm 0,11$ імп./с ($n = 13$, $p = 0,00265$). Диміназен у концентрації 100 μ M сам по собі не викликав змін у спонтанній активності ноцицептивних аферентів шкіри під час преаплікації ($n = 13$, $p = 0,281$), однак його одночасна аплікація разом із розчином зі зниженим рН посилювало протон-індуковану імпульсацію ПД до $1,81 \pm 0,42$ імп./с ($n = 13$, $p = 0,000337$; рис. 3.18).

На рисунку 3.17 представлено репрезентативний електрофізіологічний запис електричної активності полімодальних (механо- і термочутливих) ноцицептивних С-волокон шкіри при послідовній стимуляції їх рецептивного поля розчином із рН 6,1, а також розчином із рН 6,1 у поєднанні з блокатором ASIC-рецепторів диміназеном (100 μ M).

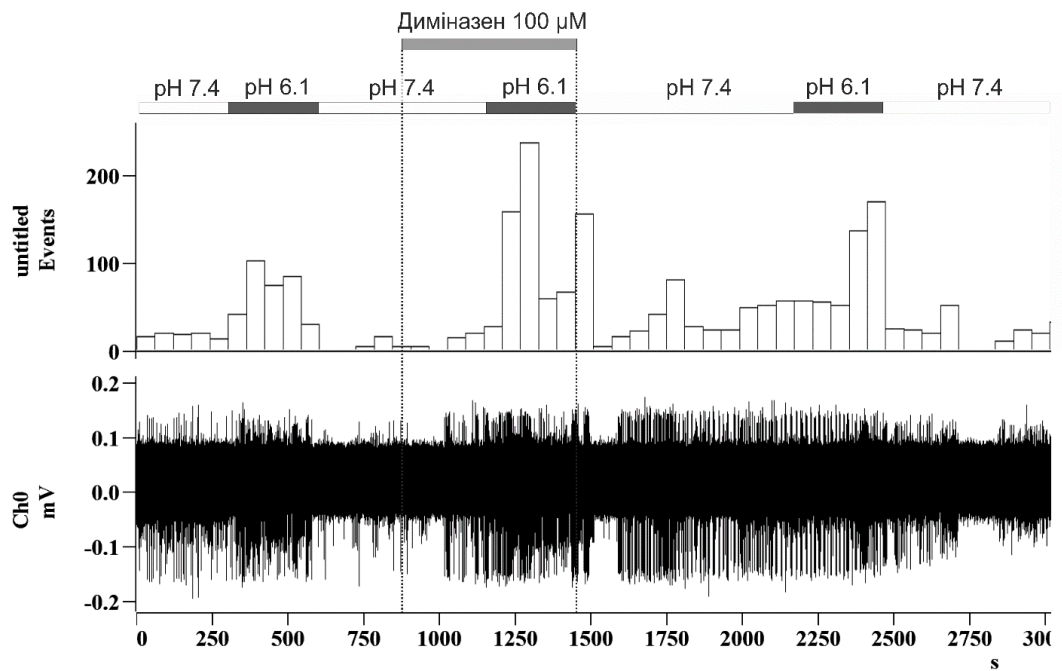


Рис. 3.17. Приклад електрофізіологічного запису під час тестування дії диміназену ($100\text{ }\mu\text{M}$) на протон-викликану активацію СМН-волокон (знизу). Зверху — гістограма ПД за 1-хвилинні інтервали.

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що диміназен у концентрації $100\text{ }\mu\text{M}$ підвищує чутливість СМН-волокон до рН 6,1 на 453,8 %. На підставі цих результатів можна дійти висновку, що диміназен у даній концентрації чинить неселективну дію на сенсорні нервові закінчення та залучає додаткові молекулярні механізми, не пов'язані з ASIC-каналами.

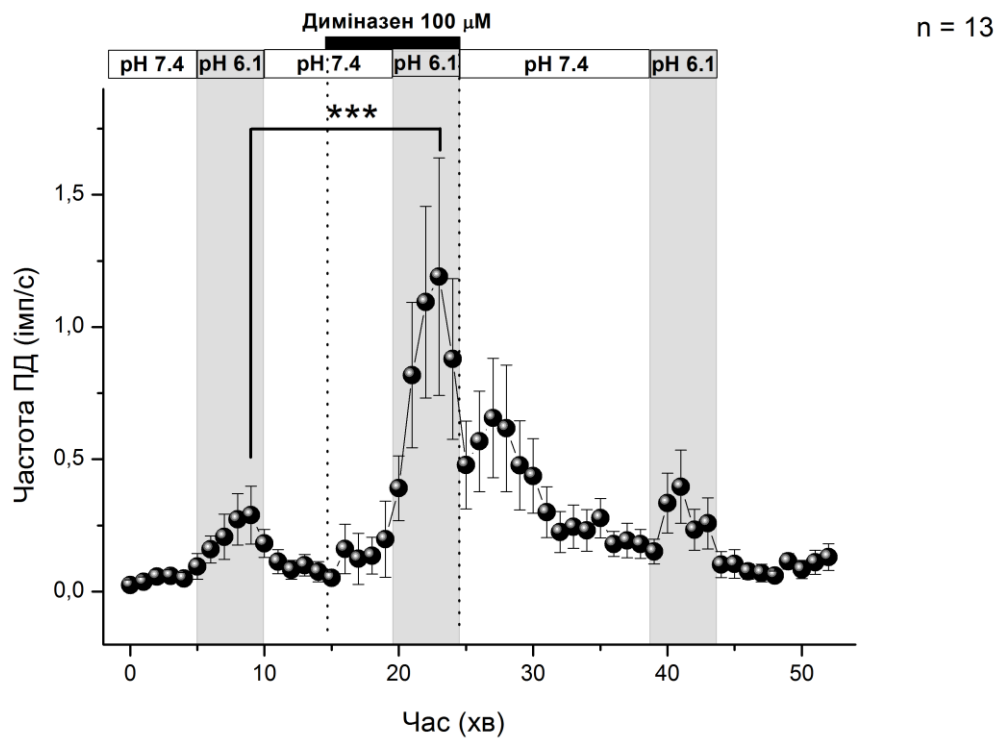


Рис. 3.18. Частота ПД аферентних нервових волокон шкіри, усереднена за 1-хвилинні інтервали, під час дослідження впливу диміназеноу (100 μM) на протон-індуковане збудження ноцицептивних закінчень (***) $p < 0,001$).

3.4. Вплив блокаторів протонно-натрієвих антипортерів NHE, EIPA і зоніпориду, на протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.

Отримані в ході дисертаційного дослідження експериментальні дані, здобуті з використанням різних методичних підходів, засвідчили, що диміназен пригнічує протон-викликані струми в сомах сенсорних нейронів DRG *in vitro*, однак не впливає на протон-викликану активацію чутливих закінчень С-волокон шкіри *ex vivo*. Також не було виявлено впливу селективного антагоніста рецептора TRPV1 AMG-517 на протон-викликане збудження шкірних ноцицепторів. Це наштовхнуло нас на гіпотезу, що посилення диміназеном відповідей нервових

волокон на закислення зумовлене механізмами збудження, не пов'язаними з активацією рецепторів ASIC і TRPV1 на периферичних нервових закінченнях.

Відомо, що неселективний блокатор рецепторів ASIC та трансмембранного протонно-натрієвого обмінника NHE амілорид дозозалежно посилює протон-викликану відповідь ноцицепторів шкіри щурів [49]. Це дозволяє припустити, що в наших експериментах диміназен діє подібно до амілориду, підвищуючи відповідь шкірних ноцицепторів мишей на зниження pH. Для перевірки цієї гіпотези ми дослідили вплив відомих селективних і неселективних антагоністів першої та найпоширенішої ізоформи H^+/Na^+ -іонообмінника – NHE1 на протон-індуковані відповіді сенсорних аферентів шкіри.

3.4.1. Неселективний блокатор протонно-натрієвих антипортерів NHE, EIPA (10 μ M), підвищує протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.

Було показано, що похідна амілориду: 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA) діє як неспецифічний інгібітор ASIC і NHE [131], але її дія на нативні чутливі закінчення сенсорних нейронів досі не вивчалася.

У цій серії експериментів 14 досліджених СМН-волокон демонстрували спонтанну активність із частотою ПД $0,03 \pm 0,01$ імп./с за контрольних умов. На Рисунку 3.19 наведено приклад електрофізіологічного запису від нервового філаменту з полімодальними ноцицептивними аферентами шкіри. Рецептивні поля чутливих закінчень послідовно стимулювалися кислим розчином із pH 6,1.

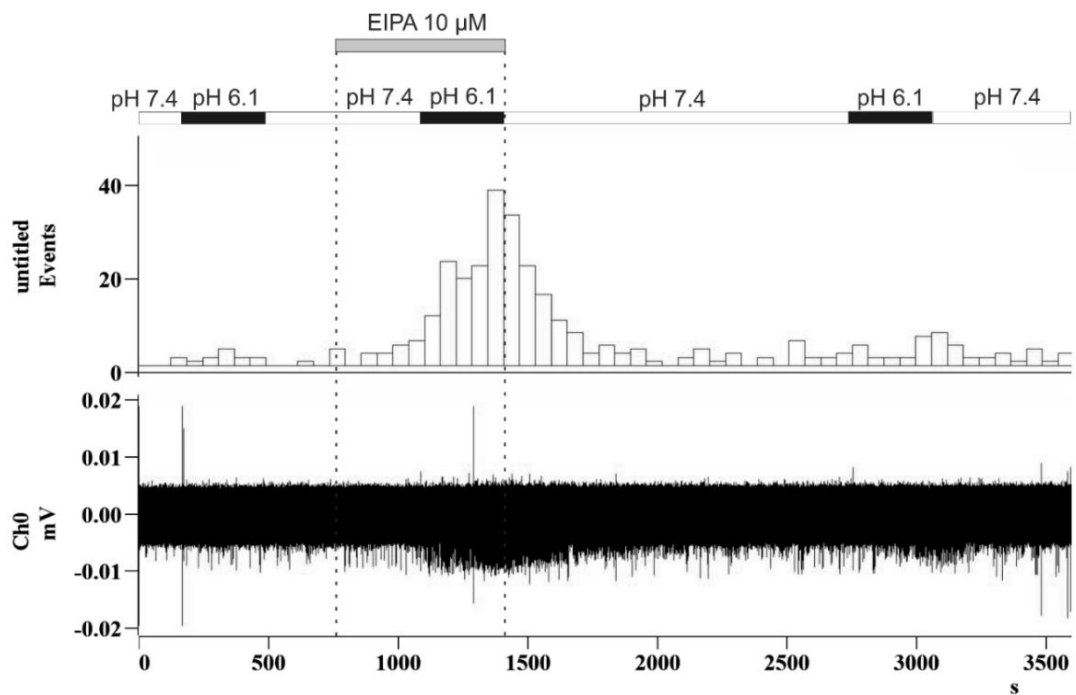


Рис. 3.19. Приклад електрофізіологічного запису з нервового філаменту шкіри (знизу). Зверху — гістограма ПД за 1-хвилинні інтервали. Рецептивні поля СМН-аферентів послідовно стимулювали розчином із рН 6,1. Додавання ЕІРА (10 μM) до цього розчину суттєво підсилювало протон-індуковану активацію СМН-аферентів.

Подібно до диміназону, ЕІРА у концентрації 10 $\mu\text{M}/\text{l}$ самостійно не викликав зростання частоти ПД під час пре-аплікації ($p = 0,14$). Стимуляція розчином із рН 6,1 статистично достовірно підвищувала частоту імпульсації ПД до $0,11 \pm 0,03$ імп./с ($n = 14$, $p = 0,023$). Одночасна аплікація ЕІРА (10 μM) разом із кислим розчином посилювало протон-індуковану генерацію ПД до $0,41 \pm 0,06$ імп./с ($n = 14$, $p < 0,001$; рис. 3.20). Чотири нервові аференти (22 %), які не змінювали частоту генерації ПД при зниженні рН з 7,4 до 6,1, а також за умов поєднання зниження рН до 6,1 з аплікацією ЕІРА у концентрації 10 μM , не були включені до статистичного аналізу.

У підсумку, ЕІРА у концентрації 10 μM підвищував чутливість полімодальних СМН-волокон до зниженого рН на 376,4 % від контрольного рівня.

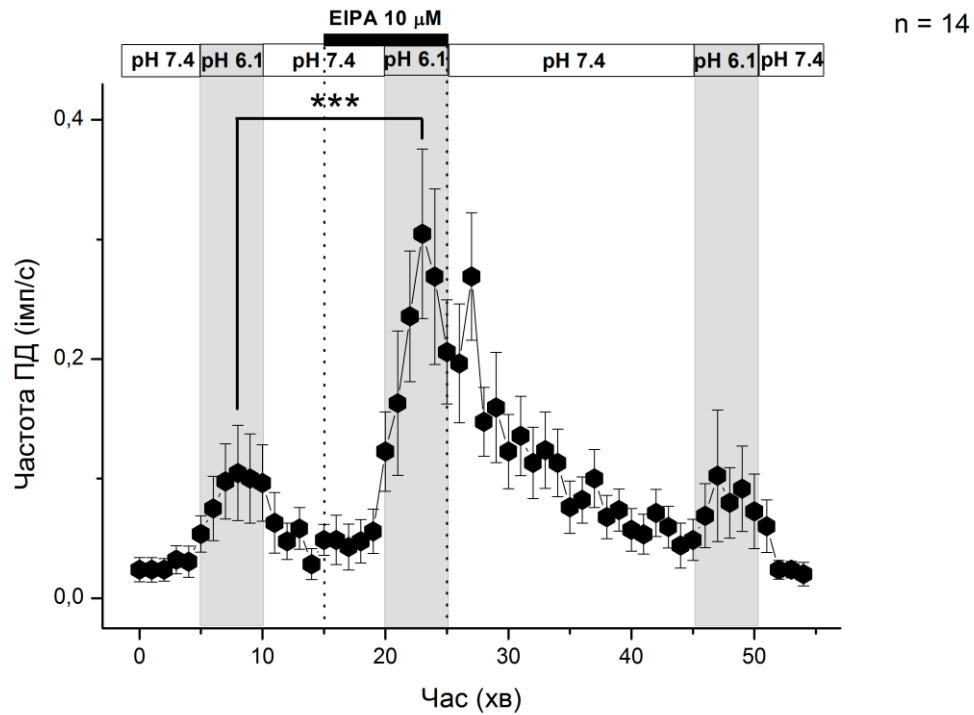


Рис. 3.20. Частота ПД, згенерованих ноцицептивними аферентами, усереднена за 60-секундні інтервали під час дослідження впливу EIPA (10 μ M) на протон-індуковану активацію СМН-аферентів. EIPA достовірно підсилював протон-індуковане збудження первинних аферентів шкіри *ex vivo* (***) $p < 0,001$).

Отримані результати свідчать про те, що Na^+/H^+ -антипортер, який забезпечує підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу іонів H^+ , відіграє важливу роль у модуляції протон-індукованої больової чутливості сенсорних нейронів. Підвищення концентрації H^+ у цитоплазмі сенсорних аферентів призводить до посилення їхньої відповіді на ацидоз.

3.4.2. Селективний блокатор першої ізоформи протонно-натрієвого антипортера NHE1, зоніпорид у мікромольних концентраціях, збільшує протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.

На відміну від EIPA, зоніпорид є селективним і потужним інгібітором першої ізоформи протонно-натрієвого іонообмінника (NHE1). У дослідженні

оцінювався вплив зоніпориду (в концентраціях 0,5 і 5 μM) на протон-індуковану електричну активність полімодальних ноцицепторів шкіри.

Для контрольної стимуляції в області рецептивного поля нервових аферентів протік нормального перфузійного розчину протягом 5 хвилин переключали на розчин із рН 6,1. У цих умовах перша аплікація розчину з рН 6,1 слугувала контрольним стимулом, а остання аплікація в якості стимула для оцінки відновлення активності СМН-аферентів.

Після першої контрольної стимуляції розчином із рН 6,1 проводили тестування дії зоніпориду на протон-викликану активацію ноцицептивних аферентів (СМН). Для цього протік нормального перфузійного розчину з рН 7,4 переключали на такий самий розчин, що містив зоніпорид (0,5 або 5 μM), на 5 хвилин для проведення преаплікації. Після цього перфузію на 5 хвилин переключали на розчин із рН 6,1, який також містив зоніпорид.

У групі, де досліджувалась дія зоніпориду в концентрації 0,5 μM , протестовані СМН-волокна ($n = 17$) демонстрували спонтанну активність із частотою генерації ПД $0,017 \pm 0,0057$ імп/с за контрольних умов. На рисунку 3.21 наведено приклад електрофізіологічного запису від поодинокого С-волокна під час трьох послідовних перфузій його рецептивного поля розчином із рН 6,1. Перша аплікація розчину з рН 6,1 використовувалась як контроль, а остання як тест на відновлення. Для оцінки дії зоніпориду у концентрації 0,5 $\mu\text{M}/\text{л}$ проводили перфузію нервових закінчень ноцицептивних СМН-аферентів протягом 5 хвилин контрольним розчином з рН 7,4, що містив зоніпорид (преаплікація), після чого здійснювали переключення на перфузію розчином з рН 6,1, який також містив зоніпорид 0,5 $\mu\text{M}/\text{л}$.

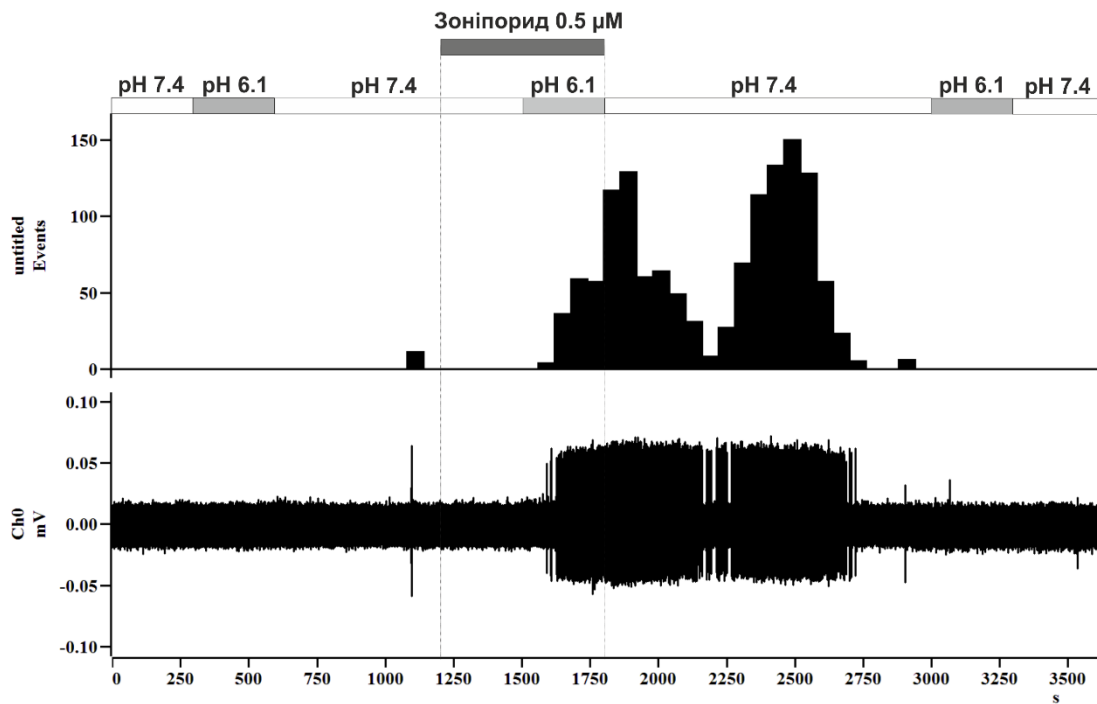


Рис. 3.21. Приклад електрофізіологічного запису від одного С-волокна під час дослідження дії зоніпориду $0,5 \mu\text{M}$ на протон-індуковане збудження (знизу). Зверху — гістограма ПД за 1-хвилинні інтервали.

Стимуляція рецептивного поля шкіри розчином з рН 6,1 достовірно збільшувала частоту імпульсації до $0,66 \pm 0,27$ імп/с ($n = 17$, $p = 0,029$). Зоніпорид у концентрації $0,5 \mu\text{M}$ сам по собі не впливав на спонтанну електричну активність аферентних волокон ($p = 0,154$). Натомість аплікація зоніпориду разом із кислим розчином підвищувала частоту імпульсів до $1,68 \pm 0,58$ імп/с ($n = 17$, $p = 0,0118$; рис. 3.21). Таким чином, зоніпорид у концентрації $0,5 \mu\text{M}$ підвищував чутливість СМН-волокон до ацидозу до 253,8% від контрольного рівня.

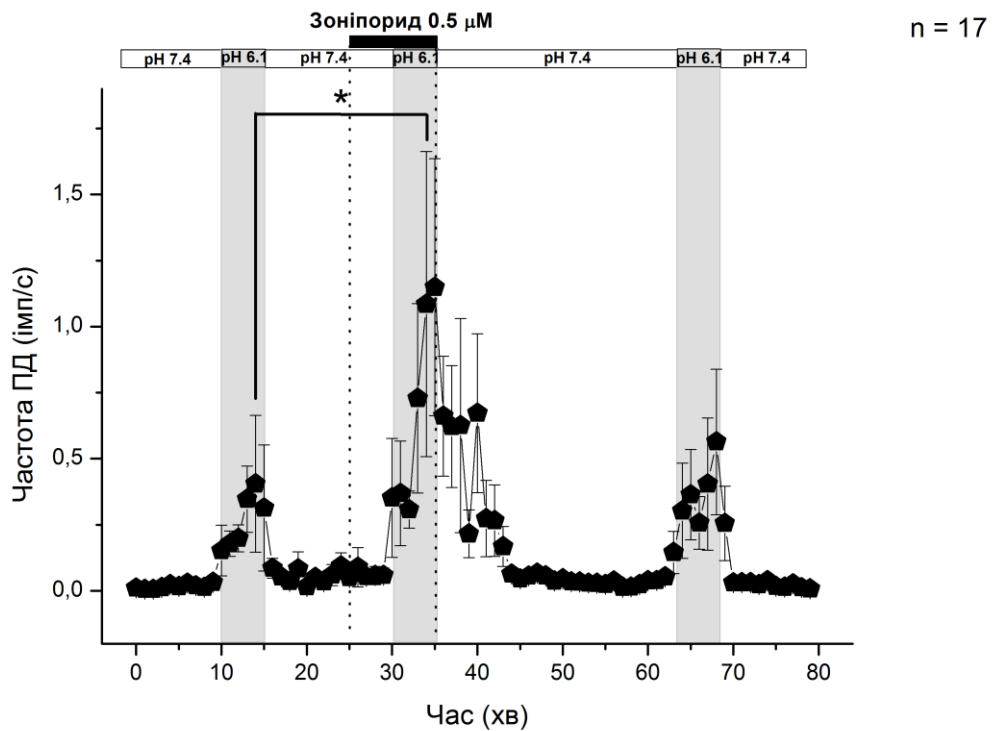


Рис. 3.22. Середня частота імпульсації (ПД) С-волокон шкіри, усереднена за 1-хвилинні інтервали, під час дії зоніпориду (0,5 μM) у присутності розчину з рН 6,1. Зоніпорид достовірно підсилював чутливість ноцицепторів шкіри до протонів (* $p < 0,05$; $n = 17$).

Експериментальний протокол дослідження дії зоніпориду у концентрації 5 μM на протон-викликану збудження ноцицептивних аферентів не відрізнявся від протоколу, застосованого для концентрації зоніпориду 0,5 μM, описаного вище.

У групі, де тестували вплив зоніпориду у концентрації 5 μM/л на протон-індуковану активацію полімодальних аферентів, СМН-волокна мали спонтанну активність із частотою $0,02 \pm 0,01$ імп/с ($n = 23$). Рецептивні поля тричі стимулювали розчином із рН 6,1: перша аплікація була контрольною, остання аплікація для оцінки відновлення. Зоніпорид 5 μM наносився на рецептивне поле після 5-хвилинної попередньої аплікації разом із кислим розчином.

Стимуляція рецептивних полів розчином із рН 6,1 призводила до зростання частоти імпульсації до $0,06 \pm 0,02$ імп/с ($n = 23$, $p = 0,986$). Сам зоніпорид 5 μM не змінював спонтанну електричну активність ($0,055 \pm 0,025$ імп/с; $p = 0,995$). Однак сумісна аплікація зоніпориду 5 μM із розчином з рН 6,1 значно підвищувало

частоту імпульсів до $0,423 \pm 0,08$ імпл/с ($n = 23$; $p < 0,001$; рис. 3.23). Пік активації спостерігався протягом перших 5 хвилин після відмивання, що може свідчити про повільне виведення зоніпориду та пролонгований ефект його дії через блокаду H^+/Na^+ -антипорту. Отже, зоніпорид у концентрації $5 \mu M$ підвищував чутливість СМН-волокон до низького рН у 21 раз (2097,62%). Посилення протон-викликаної активації ноцицепторів прямо корелює з концентрацією зоніпориду.

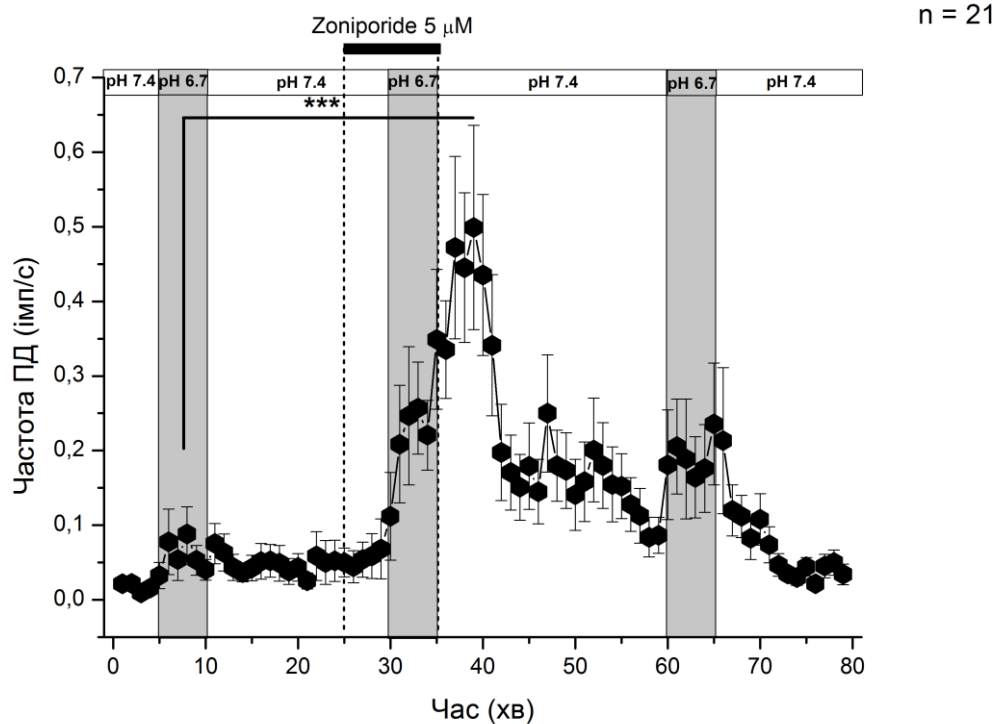


Рис. 3.23. Частота ПД СМН-аферентів шкіри, усереднена за 1-хвилинні інтервали, під час дії зоніпориду ($5 \mu M$). Спостерігалось достовірне підсилення чутливості до протонів при рН 6,1 (***) $p < 0,001$).

Отримані результати свідчать про те, що перша і найбільш поширена ізоформа Na^+/H^+ -антипортера (NHE1), забезпечуючи підтримання внутрішньоклітинного гомеостазу іонів H^+ , відіграє важливу роль у модуляції протон-індукованої больової чутливості сенсорних нейронів. Підвищення концентрації H^+ у цитоплазмі сенсорних аферентів унаслідок блокування NHE1 зоніпоридом призводить до посилення їхньої відповіді на ацидоз.

3.4.3. Зоніпорид у концентрації 1 μM не впливає на протон-активовані струми в DRG-нейронах мишей і щурів, а також у клітинах HEK293

У межах дослідження також було протестовано вплив селективного блокатора першої ізоформи Na^+/H^+ -антипортера (NHE1), зоніпориду, на протон-активовані струми в нативних сенсорних нейронах DRG мишей і щурів, а також у клітинах HEK293 з експресією ASIC1a. Концентрація 1 μM вважається ефективною для інгібування NHE1 [132]. При цьому зоніпорид не впливав на електричну активність ASIC-каналів, ендогенно експресованих у DRG-нейронах, а також на електричну активність hASIC1a у HEK293 (рис. 3.24).

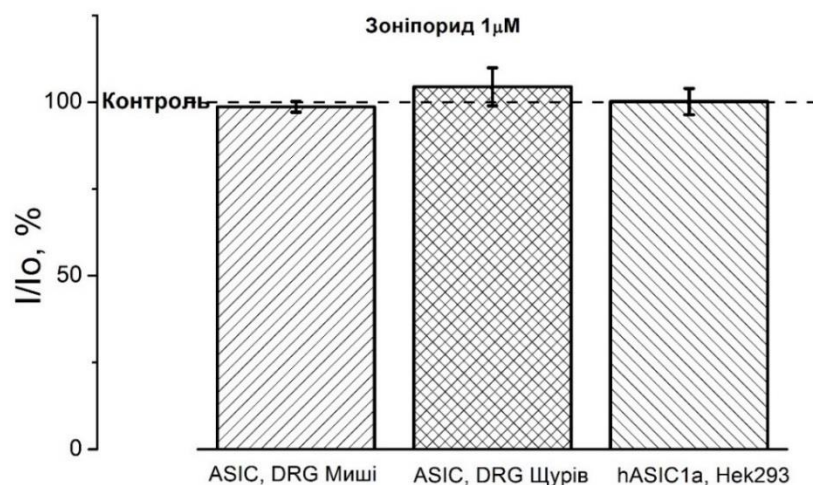


Рис. 3.24. Діаграма протон-активованих трансмембранних струмів у DRG-нейронах *in vitro* у відповідь на зниження рН з 7,4 до 6,0 під час тестування дії зоніпориду.

Таким чином, відсутність впливу селективного антагоніста першої ізоформи Na^+/H^+ -антипортера (NHE1) зоніпориду на протон-індуковані трансмембранні струми свідчить про відсутність його неселективної дії на протон-чутливі кислотозалежні іонні канали (ASIC). Це принципово відрізняє зоніпорид від амілориду та його похідної EIPA, які, окрім інгібування Na^+/H^+ -антипортера, також здатні безпосередньо блокувати ASIC-канали, що підтверджено даними

літератури [131]. Сукупність отриманих експериментальних результатів дозволяє зробити заключний висновок, що підвищення частоти нервової імпульсації ноцицептивними аферентами зумовлене саме селективним блокуванням NHE1 і не пов'язане з активацією або модуляцією ASIC-каналів, які у межах досліджуваного механізму участі не беруть.

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1. Удосконалений підхід до - реєстрації електричної активності шкірних ноцицептивних аферентів

Підшкірний нерв (n. saphenus), який є шкірною гілкою стегнового нерва, забезпечує сенсорну іннервацію шкіри тильної поверхні лапки у гризунів. Підшкірне введення формаліну в цю ділянку викликає больові поведінкові реакції, що підтверджується у формаліновому тесті [133]. Двофазна больова відповідь, що спостерігається у формаліновому тесті, відповідає двом фазам електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри, які було виявлено у моделі «шкіра–нерв» *ex vivo* [94]. Така відповідність дозволяє інтегрувати результати, отримані різними методами, зокрема в моделях болю, спрямованих на дослідження змін поведінки у відповідь на тривале периферичне ушкодження чи запалення (наприклад, формаліновий тест або набряк лапки, індукований каррагінаном) [134, 135]; у тестах на механічну чутливість [136]; в *in vivo* та *ex vivo* електрофізіологічних записах електричної активності нервових волокон шкіри [92]; а також у дослідженнях культур сенсорних нейронів з використанням електрофізіологічних методів, аналізу сигнальної трансдукції, вивільнення нейромедіаторів або кальцієвої візуалізації [84].

Методи позаклітинного запису *ex vivo*, подібні до методів patch-clamp, які застосовуються в культурах клітин *in vitro*, забезпечують точний контроль концентрацій досліджуваних хімічних сполук завдяки постійній перфузії та можливості швидкої заміни розчину у рецептивних полях нервових закінчень. На противагу цьому, переваги такого контролю відсутні в методах, що використовуються для дослідження больової поведінки тварин та запису електричної активності нервових волокон *in vivo*, де основним шляхом введення речовин є ін'єкції. *Ex vivo*-записи електричної активності аферентів шкіри

дозволяють реєструвати та ідентифікувати ПД, що поширюються по нервових волокнах; однак ці методи не дозволяють безпосередньо вимірювати зміни електрохімічного градієнта та напруги в чутливих нервових закінченнях шкіри, саме в ділянках генерації ПД. Природні периферичні нервові закінчення ссавців залишаються недоступними для вимірювань за допомогою техніки patch-clamp.

Метод patch-clamp дає змогу досліджувати рецепторно-канальні комплекси в первинних культурах сенсорних нейронів, реєструвати зміни іонних струмів і аналізувати властивості окремих трансмембранних білків, гетерологічно експресованих у не нейрональних клітинах, таких як HEK293, яйцеклітини *Xenopus* та клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO). Крім того, цей метод дає змогу вимірювати зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів за допомогою флуоресцентних барвників. Проте ізоляція нейронів DRG для первинних культур вимагає ферментативної обробки та механічного розділення клітин, з неминучим видаленням аксонів і супутніх гліальних клітин. Після цього тіла сенсорних нейронів поміщають у штучне культуральне середовище, що призводить до зміни складу функціональних мембранних білків [88] і, відповідно, ще більше поглиблює відмінності між ізольованими клітинами та природними нервовими закінченнями [95]. Таким чином, кожен із наведених методів має свої переваги й обмеження, які слід ретельно враховувати під час інтерпретації експериментальних даних.

Розроблений у ході дисертаційного дослідження підхід до реєстрації електричної активності окремих аферентних нервових волокон, що іннервують ізольовану ділянку шкіри миші *ex vivo*, суттєво спрощує процес препарування, оскільки дозволяє здійснювати записи безпосередньо з дрібних підшкірних гілок нерва без необхідності від'єднання всього стовбура стегново-шкірного нерва по всій його довжині. Це нововведення значно скорочує час, необхідний для препарування та локалізації рецептивних полів аферентних волокон. Крім того, удосконалена методика дає змогу працювати з меншою площею шкіри у препараті, що полегшує перфузію та хімічну стимуляцію поверхні шкіри з

нервовими закінченнями із застосуванням менших об'ємів розчину, тим самим зменшуючи витрати активних речовин.

Ex vivo-запис електричної активності одиночних аферентних нервових волокон шкірно-нервового препарату гризунів є ефективним методом для дослідження властивостей чутливих закінчень сенсорних нейронів, вивчення механізмів периферичної чутливості та оцінки анальгетичних речовин, які діють безпосередньо на ноцицептивні нервові закінчення. Якість і надійність експериментальних даних залежить від деталей експериментальної постановки та протоколу, зокрема від швидкості препарування, яка впливає на життєздатність препарату, точності маніпуляцій з нервовим компонентом, а також відповідної конструкції скляного електродного наконечника.

Методика реєстрації електричної активності аферентів у препараті шкіра–нерв миші *ex vivo*, розроблена в межах цього дисертаційного дослідження, є особливо придатною для вивчення дії біологічно активних речовин на рецепторно-каналні комплекси в нервових закінченнях шкіри і може бути відтворена іншими лабораторіями, що працюють у галузі електрофізіології та фармакології.

4.2. Залежність збудливості ноцицептивних рецепторів від температури

Температура впливає на функціонування майже всіх біомолекул, а отже, і на клітинний метаболізм. Відомо вже багато століть, що зміни температури в межах фізіологічного діапазону значно впливають на чутливість до болю, однак молекулярні механізми цього явища залишаються недостатньо вивченими. Температурні коефіцієнти потоків у відкритих іонних каналах є низькими ($Q_{10} = 1.3\text{--}1.5$), що вказує на те, що ентальпійні бар'єри для потоку є приблизно такими ж низькими, як і для звичайної дифузії у водному середовищі. З цієї та інших причин нейрофізіологи зазвичай описують іонний потік у каналах, використовуючи інтегровані рівняння електродифузії, отримані з

диференціальних рівнянь Нернста-Планка для вільної дифузії іонів у в'язкому середовищі [125].

У наших експериментах значення температурного коефіцієнта для частоти генерації ПД під час базальної активності ($Q_{10} \approx 1,9$), для ПД, індукованих K^+ ($Q_{10} \approx 1,9$), а також для швидкості проведення імпульсів нервовими волокнами ($Q_{10} \approx 1,4$) узгоджуються з наведеними показниками.

Таке значення Q_{10} для швидкості проведення добре відповідає раніше опублікованим даним [6, 40, 41]. Це може свідчити про те, що температурна залежність цих параметрів безпосередньо зумовлена температурною залежністю струму через натрієві та калієві канали клітинної мембрани.

Молекулярна основа температурної чутливості залишається недостатньо вивченою. Надродина рецепторів транзиторного потенціалу (TRP) має широкий діапазон температурних порогів активації ($> 43^\circ\text{C}$ для TRPV1, $> 52^\circ\text{C}$ для TRPV2, $\geq 34\text{--}38^\circ\text{C}$ для TRPV3, $\geq 27\text{--}35^\circ\text{C}$ для TRPV4, $\geq 25\text{--}28^\circ\text{C}$ для TRPM8 і $< 17^\circ\text{C}$ для TRPA1) і експресується як у первинних сенсорних нейронах, так і в інших тканинах [137]. Однак електрофізіологічні дослідження С-волокон у моделі шкіра–нерв мишей *ex vivo* з делецією генів *trpv1*/-, *trpm2*/-, та потрійною делецією *trpv1:trpa1:trpm3*/- показали, що здатність полімодальних С-волокон розпізнавати як теплові, так і холодкові стимули майже не відрізняється від такої у диких мишей [138]. Це вказує на можливість існування додаткових молекулярних механізмів, що сприяють температурній чутливості.

Дійсно, було встановлено, що рецептори P2X3, які активуються зовнішньоклітинним АТФ вважаються відповідальними за ноцицепцію та майже виключно експресуються в сенсорних нейронах ссавців, також беруть участь у кодуванні температурного сприйняття [64]. Чутливість рецепторів P2X3 значно знижується при низьких температурах, що вказує на їхню можливу роль у знеболювальному ефекті охолодження. Гомомерні P2X3-рецептори швидко десенситизуються і дуже повільно відновлюються після десенситизації (20–25 хв при кімнатній температурі) [65]. Проте підвищення температури значно прискорює цей процес ($Q_{10} \approx 10$) [66]. На жаль, причина загадкової різниці між Q_{10}

для збудження чутливих нервових закінчень під дією АТФ та відновлення рецепторів P2X3 після десенситизації залишається невідомою. Це можна пояснити тим, що у складі гетеромерних P2X-каналів на нервових закінченнях містяться температурно-нечутливі P2X2-субодиниці.

Також було висловлено припущення, що P2Y1-рецептори, зчеплені з G-білками, можуть відігравати роль у температурній чутливості шкірних сенсорних аферентів [53]. Було показано, що при 35 °C основними рН-сенсорами нейронів DRG у діапазоні $\text{pH} \geq 6$ є ASIC-рецептори, а не TRPV1-канали [39].

Щоб виключити участь TRPV-каналів у відповіді нервових закінчень на зниження рН, ми використовували буферний розчин із рН 6,7 і рН 6,1. Дійсно, AMG-517, селективний антагоніст TRPV1-каналів, не спричинив жодних помітних змін у температурній чутливості реакції на зниження $\text{pH} \geq 6,1$.

З іншого боку, температурна залежність активації ASIC-рецепторів є досить слабкою, а значення Q_{10} близькі до типових для процесів відкриття іонних каналів, що супроводжуються конформаційними змінами. Крім того, підвищення температури прискорює інактивацію ASIC-каналів у нейронах DRG, що, у свою чергу, зменшує кількість ПД, викликаних закисленням [39]. Це дає протилежний ефект у порівнянні з тим, що ми спостерігали в ноцицептивних нервових закінченнях. Однак закислення також прискорює відновлення рецепторів P2X3 після десенситизації [139], тому не можна виключати, що температурна чутливість рН-індукованих реакцій зумовлена саме рецепторами P2X3, а не ASIC.

Таким чином, температурна залежність АТФ-індукованих відповідей ноцицептивних нервових закінчень є складним механізмом, у якому беруть участь різні типи пуринергічних рецепторів. Температурна чутливість відповідей на H^+ є ще більш загадковою і потребує подальших досліджень.

Наші дані показують, що підвищення температури з 30 до 40°C збільшує частоту генерації ПД під час базальної активності ноцицептивних аферентів, тоді як зниження температури з 30 до 20°C, навпаки, пригнічує цю активність. Такі зміни легко пояснюються класичною температурною чутливістю іонних потоків

через канали відповідно до рівнянь Нернста-Планка для вільної дифузії іонів у в'язкому середовищі [125].

Однак підвищення температури в цьому діапазоні значно посилює генерацію ПД ноцицептивними аферентами у відповідь на хімічну стимуляцію їх чутливих закінчень АТФ і кислим рН ($Q_{10} \approx 3$), але вплив підвищення температури на реакцію, індуковану високою концентрацією K^+ є значно нижчим, температурна залежність якої ($Q_{10} \approx 2$) майже така сама, як і для частоти генерації ПД під час базальної активності. Зниження температури викликало аналогічні ефекти у зворотному напрямку.

Вищі значення Q_{10} для активності аферентних нервових волокон сенсорних нейронів у відповідь на зниження рН або дію АТФ порівняно з відповідними значеннями Q_{10} у контролі та при високому K^+ вказують на можливу роль протон-чутливих і АТФ-чутливих рецепторів у температурному сприйнятті.

Таким чином, підвищення температури в межах фізіологічно нешкідливих значень є потужним фактором, який знижує поріг збудження ноцицептивних нервових волокон у відповідь на хімічні подразники, підсилюючи гіпералгезію та ноцицептивну відповідь. Використання трансгенних моделей і ефективних селективних блокаторів больових рецепторів може допомогти розкрити механізми цього явища.

4.3. Диференційна дія антагоніста TRPV1 рецепторів AMG-517 на активацію ноцицептивних закінчень шкіри

У дисертаційній роботі досліджено вплив AMG-517 на відповіді ноцицептивних нервових закінчень шкіри миші у препараті шкіра–нерв *ex vivo*, викликані капсаїцином та нагріванням [127]. Основним висновком дослідження стало те, що AMG-517 вибірково пригнічує лише збуджувальну дію капсаїцину, не впливаючи при цьому на теплові відповіді аферентів шкіри.

Капсаїцин викликає відчуття пекучого болю внаслідок активації рецепторів TRPV1 на сенсорних нервових закінченнях. Клонований рецептор капсаїцину (TRPV1) функціонує як інтегратор кількох ноцицептивних стимулів: протонів, шкідливо підвищеної температури ($> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) та капсаїцину, які можуть активувати або потенціювати канали TRPV1, спричиняючи неселективний вхід катіонів (Na^+ , Ca^{2+}). Кожен із цих активаторів знижує поріг активації для інших, що дозволяє TRPV1 активуватися навіть за субпорогових умов, наприклад при pH 5,9 та кімнатній температурі [43]. Показано, що значення IC_{50} для струму через TRPV1 визначалося при pH 5,4 та температурі $22\text{ }^{\circ}\text{C}$, тоді як за умов підвищення температури до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ значення IC_{50} зміщувалося до вищого pH і становило 6,3. [43].

Капсаїцин є специфічним активатором TRPV1, тому викликана ним активація сенсорних нейронів слугує маркером експресії цього рецептора. Локалізація TRPV1 у ноцицепторах і його здатність інтегрувати шкідливі фізичні та хімічні подразники, а також медіатори запалення роблять його важливою фармакологічною мішенню для терапії болю. Антагоністи TRPV1 із різною хімічною структурою: рутеній червоний, капсазепін та AMG-517 пригнічують викликані капсаїцином, протонами й теплом струми у ненеурональних клітинах (CHO та HEK293), що експресують VR1-рецептори людини, кролика та щура [43, 126]. Проте у DRG-нейронах *in vitro* вони пригнічують лише струми, активовані капсаїцином, не впливаючи на струми, індуковані протонами [140], або ж на збудження сенсорних закінчень шкіри, викликане ацидозом *ex vivo* [141]. Рутеній червоний значно зменшував теплові струми в ноцицептивних DRG-нейронах щурів [142]. Було показано, що рутеній червоний пригнічує лише збудження й десенситизацію, викликані капсаїцином, у шкірних закінченнях *ex vivo*, але не впливає на розряди нервових імпульсів (ПД), зумовлені дією протонів або тепла [143]. AMG-517 інгібує трансмембранні струми, активовані капсаїцином, у DRG-нейронах щурів і блокує капсаїцин-індуковану поведінку типу здригання у щурів [126].

У мишей дикого типу та тварин із нокаутом TRPV1 реакції дихальних шляхів на оцтову кислоту не відрізнялися. Антагоніст TRPV1 (йодорезініфератоксин) також не впливав на ці реакції, що свідчить про відсутність істотної ролі TRPV1 у активації сенсорних закінчень трійчастого нерва на подразнення леткими кислотами [144]. У цьому дисертаційному дослідженні показано, що селективний антагоніст TRPV1 AMG-517 пригнічує лише капсаїцин-індуковане збудження ноцицептивних аферентів шкіри, не впливаючи ані на теплову активацію [139].

Оскільки відомо, що підвищення температури в межах фізіологічних значень знижує чутливість TRPV1 до протонної активації у гетерологічних експресійних системах [43], у дисертаційному дослідженні було перевірено вплив зниження pH з 7,4 до 6,1 за температури 40 °C на ноцицептори шкіри. Отримані результати показали, що селективний антагоніст TRPV1 AMG-517 не змінював протон-індукованого збудження нервових аферентів, що свідчить: зниження pH до 6,1 при 40 °C не є достатнім для активації TRPV1 на сенсорних закінченнях ноцицепторів [139].

Рецептори надродини каналів транзйєтного (короткочасного) рецепторного потенціалу (transient receptor potential, TRP) експресуються у первинних сенсорних нейронах і характеризуються широким діапазоном порогів температурної активації: TRPV1 активується при температурах понад 43 °C, TRPV2 активується при температурах понад 52 °C, TRPV3 активується у діапазоні 34–38 °C, TRPV4 активується у діапазоні 27–35 °C, TRPM8 активується у діапазоні 25–28 °C, а TRPA1 активується при охолодженні нижче 17 °C [137]. Цей набір температурних сенсорів, що експресуються на чутливих закінченнях сенсорних нейронів шкіри, перекриває температурний діапазон активації TRPV1.

У дослідженнях, де порівнювали властивості DRG-нейронів *in vitro*, чутливих закінчень у препараті «шкіра–нерв» *ex vivo* та больову поведінку у мишей з нокаутом рецептора VR1 (TRPV1-/-), було виявлено повну відсутність сенсорної відповіді на ванілоїди (капсаїцин і резиніфератоксин). При цьому відповідь на стимуляцію протонами та шкідливою температурою була зниженою,

але не повністю відсутньою. Сенсорна відповідь на інші стимули (АТФ, механічна стимуляція) істотно не відрізнялася між TRPV1^{-/-} і TRPV1^{+/+} мишами [52, 145].

У мишей з подвійним генетичним блокуванням TRPV1^{-/-} та TRPM2^{-/-} відповідь чутливих ноцицептивних закінчень шкіри *ex vivo* була зниженою, але не зникала повністю. Крім того, у мишей із потрійним нокаутом TRPV1:TRPA1:TRPM3^{-/-} не спостерігалася чутливість до шкідливого тепла, однак зберігалася здатність сприймати нагрівання шкіри [138].

Таким чином, у ненеурональних клітинах (CHO, HEK293), де експресується лише TRPV1-рецептор, антагоністи TRPV1 блокують його активацію ванілоїдами, протонами та шкідливим теплом. У складніших системах, таких як природні сенсорні нейрони шкіри та внутрішніх органів, де TRPV1 експресується поряд з іншими рецепторами, хімічні антагоністи TRPV1 блокують лише збудження, викликане капсаїцином, і больову поведінку у тварин. Генетичне блокування TRPV1 також призводить до повної нечутливості сенсорних нейронів та експериментальних тварин лише до капсаїцину. Оскільки капсаїцин є потужним і специфічним активатором TRPV1, відсутність відповіді на нього або його аналог (резиніферотоксин) при хімічному чи генетичному блокуванні TRPV1 є маркером ефективної інгібіції цього рецептора.

Селективний антагоніст рецептора TRPV1, AMG-517, ефективно запобігав збудженню природних ноцицептивних закінчень шкіри *ex vivo*, викликаному капсаїцином, але не впливав на активацію, спричинену шкідливим теплом. Відсутність впливу AMG-517 на теплову відповідь узгоджується з даними інших досліджень, у яких використовували антагоністи TRPV1, а також з дослідженнями на мишах з нокаутом ванілоїдного рецептора VR1. Отже, TRPV1 не є єдиним термочутливим сенсором, що відповідає за реакцію ноцицепторів шкіри на тепло.

4.4. Роль внутрішньо- та позаклітинного рН у регуляції збудливості первинних ноцицепторів

Первинні ноцицептори є високочутливими до змін рН. Позаклітинне закислення тканин збуджує сенсорні закінчення ноцицепторів без ознак десенситизації і адаптації [33, 34]. Коливання внутрішньоклітинного рН (pH_i) також суттєво впливають на їхню збудливість. У стані спокою pH_i підтримується в межах приблизно $\sim 7,2-7,3$. Нейрональна активність або метаболічний стрес можуть спричиняти тимчасове зниження pH_i (приблизно на $0,1-0,5$ одиниці рН) [146]. У первинних сенсорних нейронах таке закислення може виникати внаслідок підвищення концентрації метаболічних продуктів, дифузії CO_2 у клітину або через роботу іонних транспортних систем. Наприклад, інтенсивна активність ноцицепторів підвищує внутрішньоклітинний вміст Ca^{2+} , що активує плазматичну Ca^{2+} -АТФ-азу (PMCA). PMCA виводить Ca^{2+} з клітини в обмін на H^+ , що призводить до накопичення внутрішньоклітинних протонів і зниження pH_i відповідно [147]. У нормі гомеостаз pH_i підтримується механізмами виведення H^+ із клітини, такими як Na^+/H^+ -обмінник (NHE) та бікарбонатні транспортні системи, які швидко відновлюють рівень pH_i [147-149]. Однак при патологічних станах, таких як запалення, ішемія або пошкодження нерва, може виникати стійке або надмірне внутрішньоклітинне закислення, що перевищує компенсаторні можливості цих систем. Зниження pH_i змінює функціонування багатьох іонних каналів і білків, модулюючи тим самим збудливість мембрани ноцицепторів. Зниження внутрішньоклітинного рН може призводити до протонування амінокислотних залишків у складі іонних каналів, змінюючи їхню кінетику відкривання/закривання або провідність. У ноцицепторах кілька типів каналів безпосередньо модулюються pH_i :

4.4.1. Вплив ацидозу на потенціалзалежні натрієві канали (Nav)

Внутрішньоклітинний ацидоз різко уповільнює або навіть перешкоджає нормальній інактивації потенціалзалежних натрієвих каналів [150], а також знижує їх поріг активації [151]. Класичні дослідження показали, що зниження pH_i в збудливих клітинах майже повністю усуває інактивацію Na_v [150]. Це означає, що після відкривання під час ПД потенціалзалежні натрієві канали залишаються активними довше або легше повторно відкриваються, що може пролонгувати деполяризуючий натрієвий струм [151]. Результатом є зниження порога генерації ПД та виникнення можливості повторної або стійкої активності. У м'язових і нервових клітинах кислий pH_i таким чином підсилює натрієві струми та може викликати гіперзбудливість. Варто відзначити, що зовнішній ацидоз, як правило, зменшує амплітуду натрієвого струму шляхом протонування зовнішніх сайтів каналу, тоді як внутрішній ацидоз чинить протилежний вплив на механізми інактивації.

4.4.2. Вплив ацидозу на потенціалзалежні калієві канали (KV) і канали витоку K^+ (K_2P)

Двопорові K^+ -канали (K_2P) генерують витікні (також звані фоновими) калієві струми. Добре відома роль фонових K^+ -струмів полягає у стабілізації негативного потенціалу спокою мембрани та протидії деполяризації. Однак за останнє десятиліття (під час детального вивчення клонованих і відповідних ендогенних типів K_2P -каналів) стало очевидним, що ця первинна гіперполяризувальна дія не є пасивною. Канали K_2P регулюються широким спектром факторів, незалежних від напруги. Основні фізико-хімічні параметри (наприклад, pH , температура, розтяг мембрани), а також кілька внутрішньоклітинних сигнальних шляхів істотно й специфічно модулюють різних представників шести підродин K_2P -каналів (TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK і

TRESK). Значна залученість у різноманітні фізіологічні процеси, обмежені патерни експресії окремих каналів і цікаві фармакологічні властивості привернули особливу увагу до родини K_2P -каналів. У цьому огляді ми зосереджуємося на фізіологічних ролях K_2P -каналів у найдетальніше досліджених типах клітин, із особливим наголосом на молекулярних механізмах регуляції каналів [152].

Протонування K^+ -каналів загалом знижує вихід іонів калію з клітини, що призводить до деполяризації мембрани. Струми слабого випрямлення, амплітуда яких пропорційна відхиленню мембранного потенціалу від рівноважного потенціалу K^+ , опосередковуються родиною двопорових калієвих каналів (K_2P). Ці «витоківі» струми визначають мембранний потенціал спокою та сприяють реполяризації під час ПД, відіграючи ключову роль у контролі нейронної збудливості. Багато K_2P -каналів, що підтримують потенціал спокою, є високочутливими до рН як із позаклітинного (pH_o), так і з внутрішньоклітинного боку (pH_i) [153]. Наприклад, канали типу TASK-1/TASK-3 пригнічуються при ацидозі, і кілька K_2P -ізоформ безпосередньо реагують на зниження внутрішньоклітинного рН [153]. У ноцицепторних нейронах підвищення концентрації внутрішньоклітинних протонів закриває ці K^+ -канали витоку, що робить потенціал спокою більш деполяризованим і ближчим до порога активації. Деякі потенціалзалежні K^+ -канали, які забезпечують реполяризацію мембрани, також можуть пригнічуватися при низькому рН, що уповільнює завершення ПД. У сукупності внутрішньоклітинний ацидоз зменшує калієві струми, які в нормі протидіють збудженню, тим самим посилюючи збудливість нейрона.

4.4.3. Канал TASK2 сенсор позаклітинного рН.

TASK-2 діє як фоновий (**background**) калієвий канал або **канал витоку (leak)**, що важливо для встановлення мембранного потенціалу спокою та регуляції збудливості нейронів [154]. Канали витоку, або фонові калієві канали, які визначають мембранний потенціал спокою завдяки постійному пасивному витоку

K^+ . TASK-2 належить до родини двопорових калієвих каналів (K2P), що формують саме такі “background” або “leak” струми.

Датчик рН: Його активність безпосередньо залежить від рівня рН, що є ключовою особливістю, яка пов'язує його з такими сенсорними модальностями, як біль і температура.

TASK2 (TWIK-related acid-sensitive K^+ channel 2) є рН-керованим представником родини двопорових калієвих каналів (K2P) [152, 155]. TASK2 широко експресується, зокрема в нейронах, імунних клітинах, хондроцитах та епітеліальних клітинах різних органів (зокрема нирок) і бере участь у хемосенсації, регуляції клітинного об'єму та іонному гомеостазі [154, 156-161]. TASK-2 також широко експресується в сенсорних нейронах, зокрема в гангліях задніх корінців, який відіграє роль у сприйнятті болю та термосенсації [162]. Він активується змінами зовнішньоклітинного і внутрішньоклітинного рН та сприяє збуджуючій активності периферичних сенсорних нейронів, впливаючи на те, як організм реагує на механічні та теплові подразники. Це робить його потенційною мішенню для терапії, спрямованої на лікування хронічних больових станів. Чутливий до кислоти, TASK-2 чутливий до змін як позаклітинного, так і внутрішньоклітинного рН, які часто пов'язані з пошкодженням тканин, запаленням або іншими шкідливими подразниками.

Фізіологічні функції TASK2 пов'язують зі змінами як внутрішньоклітинного, так і позаклітинного рН (pH_i та pH_o) [154, 163, 164]. Канал активується за умов алкалізації та закривається при позаклітинному або внутрішньоклітинному ацидозі. TASK-2 бере участь у регуляторних адаптаційних процесах і є одним із медіаторів хеморецепції у нейронах ретротрапеціоїдного ядра, де його чутливість до внутрішньоклітинного рН може відігравати важливу роль у регуляції збудливості та передачі сигналів про стан O_2/CO_2 [164]. У цих нейронах інгібування TASK-2 позаклітинними або внутрішньоклітинними протонами, зокрема при моделюванні підвищення рівня CO_2 у крові [165], спричиняє деполяризацію, підвищення частоти ПД та посилення дихання [156, 157, 163, 166].

Механізми рН-керування TASK2. Процес відкриття TASK2, контрольований внутрішньоклітинним рН (pH_i), є незалежним від pH_o . Закриття каналу при позаклітинній ацидифікації не вдається усунути шляхом внутрішньоклітинної алкалізації [165]. TASK2 залишається переважно закритим при рН 6,5 та активується як позаклітинним, так і внутрішньоклітинним зрушенням рН у бік лужних значень, із середньою рН-точкою активації 8,0–8,5 [154, 155, 167]. Таким чином, pH_i разом із pH_o є ключовими детермінантами активності TASK2 та визначають його роль у фізіологічних процесах.

Інші члени сімейства двопорові K^+ -каналів (K_2P), такі як TASK1 і TASK3 також є протон-чутливими і приймають участь у регуляції нервової збудливості, але на сьогодні їх роль маловивчена [169].

Таким чином, протони можуть безпосередньо ініціювати ПД, керуючи цими каналами. Інгібування TASK2 позаклітинними або внутрішньоклітинними протонами спричиняє деполяризацію, гіперзбудження і відповідно збільшення частоти ПД.

4.4.4. Вплив ацидозу на потенціалкеровані кальцієві канали (Ca_v)

На відміну від потенціалкеруваних Na^+ -каналів, Ca^{2+} -струми пригнічуються при внутрішньоклітинному ацидозі. Ноцицептори використовують кальцієві канали N-типу ($Ca_v2.2$) у пресинаптичних нервових закінченнях для запуску вивільнення нейромедіаторів. Експерименти на сенсорних нейронах показали, що навіть помірне зниження pH_i у фізіологічному діапазоні може суттєво зменшувати амплітуду Ca^{2+} -струму [146]. Наприклад, зниження pH_i з $\sim 7,3$ до 7,0 пригнічує Ca^{2+} -струм N-типу приблизно на 40%, а до рН 6,6 приблизно на 65% [146]. Натомість невелике алкалізування середовища до рН 7,5 може збільшити Ca^{2+} -струм приблизно на 40% [146]. Важливо, що ці зміни струму відбуваються без зсуву кривої активації за потенціалом, що свідчить про те, що H^+ , ймовірно, знижують імовірність відкриття каналу або його провідність [146].

Функціонально зменшення надходження Ca^{2+} під час ПД буде послаблювати вивільнення нейромедіаторів із центральних закінчень ноцицепторів до нейронів заднього рогу спинного мозку: (оскільки екзоцитоз запускається Ca^{2+}). Дослідники припускають, що це пригнічення Ca^{2+} -струму протонами є негативним зворотним зв'язком: невеликі зниження pH_i під час нормальної активності тонко регулюють синаптичну передачу, а більш суттєве закислення при патологічних станах захищає клітину, обмежуючи надмірний вхід Ca^{2+} [146]. Таким чином, внутрішньоклітинний ацидоз істотно пригнічує активність Ca_v -каналів у ноцицепторах, що може зменшувати вивільнення збуджувальних медіаторів та знижувати збудливість, частково врівноважуючи про-збуджувальний ефект модифікацій Na^+ - та K^+ -каналів.

4.4.5. Вплив внутрішньоклітинного рН на генерацію та проведення потенціалів дії в ноцицепторах

Помірне зниження pH_i зазвичай робить ноцицептори більш схильними до генерації ПД. Деполаризація мембрани спокою внаслідок гальмування K^+ -струму [153] наближає нейрон до порогового рівня. Крім того, уповільнення інактивації Na^+ -каналів означає, що більша частка Na^+ -каналів залишається доступною або повторно відкривається, що сприяє повторюваній генерації імпульсів із більшою частотою [150]. У сукупності це призводить до того, що ноцицептори зі зниженим внутрішньоклітинним рН можуть генерувати ПД у відповідь на слабші стимули. Таким чином, внутрішньоклітинне закислення полегшує генерацію ПД (через зниження порогу збудження та посилення деполаризації).

4.4.6. Вплив ацидозу на вивільнення нейромедіаторів та нейропептидів у ноцицепторах

Внутрішньоклітинний ацидоз впливає на вивільнення медіаторів як у периферичних, так і в центральних закінченнях ноцицепторів. У периферичних

(чутливих) нервових закінченнях деполяризація та вхід Ca^{2+} , спричинені локальним ацидозом, запускають вивільнення нейропептидів, таких як субстанція Р (SP) та кальцитонін-ген-зв'язаний пептид (CGRP). Стимуляція препарату шкіри щура *ex vivo* за допомогою зниження pH (6,1 або 5,2) достовірно підвищував вивільнення CGRP, а також вивільнення SP [170]. Таке протон-опосередковане вивільнення пептидів є характерним для нейрогенного запалення оскільки CGRP і SP діють на судини та імунні клітини, викликаючи вазодилатацію та запалення, що може додатково знижувати позаклітинний pH, створюючи самопідсилювальний цикл.

4.4.7. Вплив ацидозу на протон-чутливі іонні канали (ASIC)

Окрім впливу на потенціалкеровані канали, ацидоз може безпосередньо активувати спеціалізовані протон-чутливі канали на ноцицепторах. ASIC це натрій-проникні канали, які активуються позаклітинними протонами. У DRG-нейронах експресуються декілька субодиниць ASIC (ASIC1a/b, ASIC2, ASIC3) [171, 172]. Зниження позаклітинного pH (pH_o) до приблизно 6,5–7,0 здатне відкрити ASIC, викликаючи транзиторний вхід Na^+ , що деполяризує нейрон [173]. Наприклад, гомомерні канали ASIC3, які у високій концентрації представлені у багатьох ноцицепторах, активуються приблизно при pH $\sim 6,7$, генеруючи значний вхідний Na^+ струм, і вважаються ключовими медіаторами болю, спричиненого тканинним ацидозом [174]. У культивованих DRG-нейронах близько 60–90% малих ноцицепторів відповідають на підкислення (pH 6,0–5,0) внутрішнім катіонним струмом [173]. Важливість ASIC у патологічному ацидозі підтверджують моделі запального болю: ASIC3 є ключовим сенсором «кислотного болю» при запаленні та ішемії [174]. Помірний ацидоз (pH $\sim 7,0$) у поєднанні з прозапальними медіаторами (такими як арахідонова кислота чи гіпертонічність, які часто супроводжують запалення) синергічно активує ASIC3, значно підсилюючи збудження ноцицепторів [174]. Блокування ASIC3 їх

селективним інгібітором –пептидом APETx2 або зниження експресії ASIC3 суттєво зменшує первинну запальну гіпералгезію у щурів [174]. Таким чином, ASIC (особливо ASIC3) виступають як прямі детектори позаклітинного ацидозу, перетворюючи знижений рН на деполяризацію ноцицепторів і сигнали болю як у фізіологічних, так і в патологічних умовах.

Але водночас за умов тривалого ацидозу в ASIC-каналів настає стаціонарна десенсибілізація (steady-state desensitization), процес, за якого канали інактивуються при тривалому впливі незначного зниження рН. Для виходу зі стаціонарної десенсибілізації ASIC потребують певного часу перебування за нормального рН 7,4 [36, 175–177], після чого канал знову здатен до активації. ASIC3, що є основною ізоформою ASIC у ноцицепторах, вважається ключовим медіатором відповіді на тканинний ацидоз [174]. Стаціонарна десенситизація, за якої канали ASIC3 повністю інактивуються, настає при рН приблизно 6,5 [177].

У тесті больової поведінки на “звивання” (writhing), індукованому оцтовою кислотою, у мишей з нокаутом гена ASIC3 (ASIC3^{-/-}) відзначено достовірне підвищення інтенсивності ноцицептивної реакції на оцтову кислоту порівняно з тваринами дикого типу [178]. Спонтанна поведінкова реакція на ін’єкцію формаліну в стопу (стандартний формаліновий тест) у мишей дикого типу не відрізнялася від такої у мишей із нокаутом генів ASIC3^{-/-} та TRPV1^{-/-}, тоді як нокаут ASIC1^{-/-} і ASIC2^{-/-} супроводжувався підвищенням спонтанної больової активності [179]. Ці експериментальні результати разом із даними отриманими в ході дисертаційної роботи із застосуванням блокаторів ASIC каналів (диміназену і EIPA) вказують на існування інших сенсорів протонів окрі ASIC та TRPV1 у ноцицептивних сенсорних нейронах.

4.4.8. Вплив ацидозу на TRPV1 рецептори

TRPV1, відомий рецептор капсаїцину та теплових стимулів у ноцицепторах, також є чутливим до протонів. Позаклітинний ацидоз може активувати або потенціювати канали TRPV1, спричиняючи неселективний вхід катіонів (Na⁺,

Ca^{2+}), що призводить до деполяризації нейрона [43]. TRPV1 забезпечує тривалий протон-керований струм у ноцицепторах за умов кислих значень $\text{pH} < 6,0$, який відрізняється від транзйєнтного струму, характерного для ASIC [173]. Цей стійкий струм підтримує мембрану в деполяризованому стані під час ацидозу, сприяючи тривалому генеруванню ПД. За умов запалення TRPV1 стає ще більш значущим: такі медіатори, як простагландин E_2 та NGF, сенситизують TRPV1 таким чином, що навіть помірні зниження pH або нормальна температура тіла можуть викликати збудження [171]. Важливо, що TRPV1 не лише реагує на протони, але й може проводити їх через мембрану. Коли TRPV1 відкритий, його великий канал дозволяє H^+ проникати всередину клітини: активація TRPV1 в кислому середовищі викликає вимірювану внутрішньоклітинну ацидифікацію у ноцицептивних нейронах [180]. Іншими словами, TRPV1 може функціонувати як протонний канал, який безпосередньо транспортує H^+ у цитозоль [180]. Такий потік протонів через TRPV1 може створювати позитивний зворотній зв'язок, при якому зовнішній ацидоз активує TRPV1, що, у свою чергу, додатково знижує pH_i і потенційно активує інші внутрішньоклітинні шляхи чутливі до кислот.

Таким чином, основними сенсорами ноцицепторів, що реагують на позаклітинні протони є ASIC [172] і TRPV1 [37, 43]. Однак у мишей дикого типу та нокаутних за TRPV1 реакції на подразнення чутливих закінчень трійчастого нерва оцтовою кислотою не відрізнялися, що може свідчити про те, що TRPV1 не є єдиним сенсором значного зниження pH у цих нейронах [144].

4.4.9. TRPA1 - сенсор внутрішньоклітинного pH

Іншим потенційним кандидатом, який може опосередковувати є іонний канал TRPA1, що коекспресується з TRPV1 і ASIC у багатьох ноцицептивних нейронах. TRPA1 бере участь у сприйнятті запального болю, холоду та свербєжу. TRPA1 активується гірчиною олією, циннамальдегідом, формальдегідом, продуктами окисного стресу [186], а також болісним охолодженням нижче 17°C

[181]. Після активації TRPA1 функціонує як неспецифічний катіонний канал, пропускаючи трансмембранний струм переважно йонів Ca^{2+} та Na^+ [185].

Визначальною характеристикою слабких кислот (таких як карбонатна - C_2HCO_3 , або оцтова - CH_3COOH) є те, що вони не повністю дисоціюють у розчині. У недисоційованій формі слабкі кислоти легше проникають крізь епітелій, досягаючи вільних нервових закінчень, а також можуть перетинати клітинну мембрану ноцицептивних аферентів, викликаючи ацидифікацію цитозолу. Таким чином, ноцицептивні ефекти слабких кислот можуть бути зумовлені дією рецепторів, що реагують або на позаклітинні, або на внутрішньоклітинні протони [184]. Унікальною властивістю TRPA1 є його активація внутрішньоклітинними протонами. Яскравим прикладом цього є біль при вдиханні CO_2 або при споживанні газованих напоїв: CO_2 легко дифундує у закінчення ноцицептивних сенсорних нейронів трійчастого нерва і утворює вуглекислу кислоту, що спричиняє ацидифікацію цитозолу [182]. Отже, TRPA1 слугує внутрішньоклітинним сенсором протонів і бере участь у ноцицептивній відповіді на ацидоз. Після активації TRPA1 канал відкривається пропускаючи катіони ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), що призводить до деполяризації нейрона. Примітно, що TRPA1 блокується позаклітинними протонами (кислий pH_o), але внутрішньоклітинні протони обходять цей блок і активують канал [182].

У патологічних умовах метаболічного ацидозу або ішемії (які підвищують CO_2/H^+ усередині клітин) TRPA1, ймовірно, відіграє роль у больовій відповіді та нейрогенному запаленні. Цікаво, що сильно лужні значення pH також можуть активувати TRPA1 через інший механізм, хоча ацидифікація є більш релевантним стимулом у більшості станів, пов'язаних із болем [183].

Вимірювання трансмембранних струмів у конфігурації excised-patch («inside-out») у клітинах HEK-293, трансфікованих TRPV1 або TRPA1, показало, що у відповідь на зниження внутрішньоклітинного pH (pH_i), спричинене насиченням розчину CO_2 , активувалися лише канали TRPA1, причому амплітуда струму через TRPA1 канали корелювала зі ступенем внутрішньоклітинної ацидифікації. Тоді як

TRPV1 не проявляли чутливості до зниження pH_i [182]. Таким чином TRPA1 канал є сенсором зміни внутрішньоклітинного pH [184].

Разом ASIC, TRPV1 і TRPA1 забезпечують збудження ноцицепторів у відповідь на зниження як позаклітинного, так і внутрішньоклітинного pH. У культурах DRG-нейронів майже всі ноцицептивні нейрони відповідають на зниження pH: на позаклітинне зниження pH переважно через ASIC- або TRPV1-опосередковані струми, а на внутрішньоклітинне зниження pH через активацію TRPA1.

4.4.10. Na^+/H^+ -антипортер 1 (NHE1)

NHE1 це повсюдно експресований антипортер, який виводить один внутрішньоклітинний протон (H^+) в обмін на один позаклітинний Na^+ , ефективно видаляючи кислотність із клітини. DRG-нейрони щільно експресують NHE1 (але мало або зовсім не експресують NHE5) [187], тому NHE1 є основною системою захисту від внутрішньоклітинного ацидозу в ноцицепторах. Експериментальне інгібування NHE1 призводить до накопичення внутрішньоклітинних протонів і суттєво впливає на збудливість ноцицепторів. *In vivo*, локальне введення інгібіторів NHE1 (аналогів амilorиду) у периферичні тканини підвищує больову поведінку: наприклад, низькі дози амilorиду, EIPA або DMA, введені у лапу щура, істотно посилювали ноцицептивні рухові реакції на капсаїцин і серотонін, а також підсилювали біль під час другої фази болю у формаліновому тесті [187]. Ці речовини блокують виведення протонів через NHE1 антипортер, що призводить до надмірного накопичення H^+ у закінченнях ноцицептивних нервів [187]. Результатом було посилення болю, що свідчить: у нормі активність NHE1 зменшує збудження ноцицепторів в умовах ацидозу. Відповідно, генетичне або фармакологічне блокування NHE1 у сенсорних нейронах призводить до стійкого внутрішньоклітинного ацидозу, який може підвищувати фонову активність ноцицепторів [21]. Таким чином, NHE1 виконує критичну роль «гальма»

кисотно-індукованої гіперзбудливості, швидко видаляючи протони з цитозолу; коли це гальмо не працює, ноцицептори стають надмірно активними.

4.4.11. $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ котранспортери

DRG-нейрони також експресують $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ котранспортери (ізоформи NBC), які імпортують бікарбонат (HCO_3^-) для нейтралізації внутрішньоклітинних протонів (H^+) [188]. Підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у сенсорних нейронах, індуковане глутаматом та капсаїцином, спричиняє внутрішньоклітинну ацидифікацію через активацію PMCA типу 3; що відновлення pH_i після ацидифікації опосередковується переважно мембранними транспортерами NHE1 та pNBC1; і що активність цих транспортерів безпосередньо впливає на збудливість нейронів [188]. Це підкреслює значення транспортерів, що регулюють pH : вони не лише підтримують гомеостаз, але й дозволяють нейронам продовжувати генерувати ПД в умовах стресу. У станах хронічного болю експресія або активність NHE1 може змінюватися: запальні медіатори можуть підвищувати рівень NHE1 як компенсаторну відповідь [189]. У мишей з нокаутом NHE1 спостерігають більш виражений ацидоз та підвищену збудливість нейронів під час метаболічного стресу, що додатково підтверджує захисну роль NHE1 [190, 191]. NHE1 експресується в ноцицепторах, а його фармакологічне пригнічення посилює ноцицептивну поведінку в моделях гострого болю. Електрофізіологічні дослідження також демонструють, що NHE1 модулює електричну активність первинних ноцицептивних закінчень [19]. Отже, такі транспортери, як NHE1 і NBC, працюють для нормалізації pH_i і тим самим регулюють збудливість ноцицепторів.

4.4.12. Зниження pH за фізіологічних умов.

За нормальної активності зміни внутрішньоклітинного pH , як правило, невеликі й короткочасні. Короткочасна, помірна ацидифікація ноцицепторів може виконувати роль зворотного модулятора. Наприклад, під час високочастотної

активності або фізичного навантаження внутрішньоклітинний рН ноцицептора може знижуватися приблизно на $\sim 0,1$ одиниці, що може дещо пригнічувати надходження Ca^{2+} та таким чином запобігати надмірному вивільненню медіатора [146]. Гомеостатичні механізми (NHE1, буферні системи) швидко відновлюють рН_i, тому нейрон зберігає здатність до тривалої активності. За фізіологічних умов тканини зазвичай мають рН близько 7,4, тож протон-чутливі канали на закінченнях ноцицепторів здебільшого залишаються закритими і мало впливають на базову збудливість. Будь-яка внутрішньоклітинна ацидифікація швидко компенсується, обмежуючи її ефекти. Отже, у фізіологічному режимі рН_i підтримується поблизу оптимального рівня, а його короточасні відхилення тонко налаштовують збудливість нейрона, не спричиняючи больових відчуттів.

4.4.13. Зниження рН за патологічних умов

При запаленні, ішемії або ушкодженні регуляція рН порушується, і ацидоз (як позаклітинний, так і внутрішньоклітинний) стає більш вираженим та стійким. **Запалення.** Локальний ацидоз тканин є важливим патофізіологічним чинником, що модулює збудливість сенсорних нейронів. Ноцицептори в такій тканині зазнають тривалої ацидифікації, що суттєво підвищує їх збудливість. Самі протони відіграють ключову роль у збудженні больових сигналів при запаленні [34]. Вони безпосередньо активують ASIC та TRPV1 на нервових закінченнях ноцицепторів, приводячи до генерації больових імпульсів. Крім того, запальні медіатори (брадикінін, серотонін, простагландини тощо) підвищують чутливість цих іонних каналів. Наприклад, брадикінін або серотонін можуть знижувати поріг рН для активації TRPV1 або потенціювати струми ASIC через сигнальні каскади [174]. Канали ASIC3 інтегрують кілька запальних сигналів, тому навіть помірне підкислення тканини (близько рН $\sim 7,0$) у поєднанні з гіпертонічністю та арахідоною кислотою суттєво підвищує їх активність і збудливість ноцицепторів. Таке комбіноване впливання призводить до посилення частоти розрядів ноцицепторів та формування больової відповіді. Таким чином,

периферичні канали ASIC3 є ключовими сенсорами кислотного болю та інтеграторами молекулярних сигналів, що генеруються під час запалення, де вони відіграють важливу роль у розвитку первинної гіпералгезії [174]. Результатом є первинна гіпералгезія (посилене відчуття болю у відповідь на подразники, які зазвичай викликають лише помірний біль).

Запалення також супроводжується підвищенням експресії протон-чутливих каналів. Наприклад, після розвитку запалення функція TRPV1 посилюється (особливо в IB4-позитивних пептидергічних нейронах) [171], що робить ноцицептори більш чутливими до кислоти або тепла.

Активність NHE1 також зростає як компенсаторна реакція, спрямована на виведення надлишкового H^+ ; фармакологічне блокування NHE1 у запаленій ділянці посилює біль [187].

Таким чином, при запаленні внутрішньоклітинна ацидифікація є більш глибокою і тривалою, безпосередньо сприяючи гіперзбудливості ноцицепторів і розвитку больового синдрому.

Ішемія. Під час ішемії (недостатнього кровопостачання) у тканинах швидко накопичуються молочна кислота та CO_2 , що призводить як до позаклітинної, так і до внутрішньоклітинної ацидифікації. Біль у скелетних м'язах або серці при ішемії (стенокардія, переміжна кульгавість) значною мірою зумовлений активацією ноцицепторів протонами. Наприклад, аференти м'язів, багаті на ASIC3, налаштовані на детектування зниження рН під час ішемії м'язів і передають цей сигнал як біль [174]. Усередині нейрона дефіцит АТФ під час ішемії порушує роботу протонних насосів і обмінників, тому внутрішньоклітинний рН може знижуватися. Може виникати аноксична деполяризація: нейрони деполяризуються внаслідок поєднання підвищеної концентрації H^+ у цитозолі, підвищеної позаклітинної концентрації K^+ та пригніченої роботи насосів. На ранніх етапах ішемії ацидифікація спричиняє інтенсивну імпульсацію (відчуття «поколювання» або болючих спазмів при ішемії), опосередковану активацією протон-чутливих іонних каналів.

Обмінник Na^+/H^+ (NHE) є мембранним білком, присутнім у багатьох типах клітин ссавців. Він бере участь у регуляції внутрішньоклітинного рН та об'єму клітини. Ізоформа NHE1 є найбільш поширеною у центральній нервовій системі та відіграє важливу роль у розвитку ушкодження мозку після гіпоксії-ішемії. Надмірна активація NHE під час гіпоксії-ішемії призводить до надлишкового надходження Na^+ у клітину, що, у свою чергу, сприяє входженню Ca^{2+} шляхом реверсії обмінника $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі запускає нейротоксичний каскад [192]. Важливо, що CO_2 , який утворюється в ішемічній тканині, може активувати TRPA1 із внутрішньої сторони нейрона [182], сприяючи характерному пекучо-поколюючому відчуттю CO_2 та ішемічного болю. Таким чином, при ішемії внутрішньоклітинна ацидифікація спочатку спричиняє активацію больових сигналів, але за умови її вираженості та тривалості може призводити до блокади проведення нервових імпульсів або навіть пошкодження нервових волокон. У всіх цих патологічних станах внутрішньоклітинна ацидифікація перестає бути лише слабким модулятором і стає ключовим медіатором збудливості. Ноцицептори в уражених тканинах зазнають тривалого ацидозу, який може постійно активувати протон-керовані струми, знижувати поріг генерації ПД та змінювати функцію каналів, що веде до спонтанного болю та гіперчутливості. У відповідь на ацидоз організм запускає компенсаторні механізми (наприклад, підвищення експресії NHE1, утворення ендогенних буферів), однак якщо вони виснажуються або виявляються недостатніми, результатом стає стійкий біль. Ураховуючи це, дослідники вивчають лікарські засоби, які блокують протон-чутливі іонні канали, а також такі, що посилюють регуляцію рН, як потенційні терапевтичні засоби проти болю [174, 187].

4.4.14. Вплив внутрішньоклітинного ацидозу на збудливість первинних ноцицепторів

Внутрішньоклітинний ацидоз чинить подвійний вплив на первинні ноцицептори: він безпосередньо збуджує їх шляхом активації протон-чутливих

каналів (зокрема TRPA1), що спричиняє деполяризацію мембрани через вхідний катіонний струм Ca^{2+} і Na^+ , а також підвищує збудливість нейрона шляхом пригнічення витоку K^+ через канали TASK2, які підтримують негативний мембранний потенціал спокою. Внутрішньоклітинний ацидоз також модулює функціонування багатьох інших іонних каналів, які визначають збудливість. На молекулярному рівні накопичення іонів H^+ усередині нейрона змінює роботу Na^+ -, K^+ - та Ca^{2+} -каналів – загалом сприяючи деполяризації і генерації розрядів (через вплив на Na_v і K_v) та водночас обмежуючи надмірну активність (через пригнічення Ca_v).

У короткостроковій перспективі зниження pH_i підвищує частоту генерування ПД та вивільнення нейропептидів, посилюючи передавання больових сигналів. Це особливо виражено в патологічних станах, таких як запалення та ішемія, де тканинний ацидоз є рушійним фактором болю та гіпералгезії. У разі ж тривалої або надмірної ацидифікації може виникати захисне пригнічення збудливості, коли функціонування каналів та метаболічні процеси порушуються. Експериментальні дослідження, проведені на різних моделях – від реєстрації трансмембранних струмів через іонні канали у режимі фіксації мембранного потенціалу до поведінкових моделей болю послідовно демонструють, що протони, які діють із внутрішнього боку нейрона, є потужними модуляторами збудливості ноцицепторів [150, 174, 182]. Співвідношення між порушеннями pH_i та компенсаторними механізмами (зокрема активністю NHE1) визначає, чи передаватиме ноцицептор сигнали болю, чи залишатиметься «мовчазним» [187, 188]. У фізіологічних умовах цей баланс підтримується, і зміни pH_i виконують тонку регуляторну роль; у патології рівновага зміщується в бік ацидозу, що призводить до посилення болю. Таким чином, внутрішньоклітинна ацидифікація є одночасно маркером метаболічного стресу нейронів і безпосереднім драйвером больової сигналізації, поєднуючи стани, такі як запалення та ішемія, з електричною активністю ноцицепторів на фундаментальному біофізичному рівні.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати власного експериментального дослідження електричної активності первинних аферентів шкіри. Проаналізовано вплив змін температури в межах фізіологічно нешкідливого діапазону на активацію ноцицептивних аферентів сенсорних нейронів під дією алгогенних стимулів, а також досліджено механізми активації ноцицептивних аферентів в умовах слабого закислення зовнішнього середовища.

1. У ході дослідження було оптимізовано та експериментально апробовано оригінальну методику реєстрації електричної активності аферентних нервових волокон у препарованому комплексі «шкіра–нерв» миші за допомогою скляного мікроелектрода. Запропонований підхід забезпечує стабільний позаклітинний запис протягом щонайменше 8 годин, дозволяє швидко змінювати експозицію на поверхню рецепторів, мінімізує об'єм середовищ і спрощує експериментальну процедуру. Це технічне вдосконалення дозволило отримувати якісні сигнали від окремих ноцицепторів з високою часовою роздільністю, що стало основою для подальших досліджень температурної та хемічної чутливості нервових закінчень.

2. Встановлено, що температурна залежність активації шкірних ноцицепторів значною мірою визначається типом алгогенного стимулу. Відповідь на АТФ і помірне зниження рН (до 6,7) має високу температурну чутливість (коефіцієнти $Q_{10} \sim 3,0-3,1$), тоді як для підвищеної концентрації калію температурна залежність є слабкою ($Q_{10} \sim 1,84$), аналогічною до контрольних умов. Це свідчить про важливу роль температурозалежних механізмів у посиленні відповіді на пуринергічні та протонні стимули, зокрема можливу участь температурочутливих рецепторів, тоді як деполяризація через зниження градієнта K^+ меншою мірою залежить від температури середовища.

3. Блокування TRPV1 селективним антагоністом AMG-517 пригнічувало капсаїцин-індуковану активацію ноцицептивних аферентів, але не впливало на активацію, викликану короткочасним підвищенням температури від 30 до 50 °C, що свідчить про те, що TRPV1 не є єдиним сенсором болісного тепла. Помірне

зниження рН до 6,1 у поєднанні з нагріванням до 40 °С не призводило до активації TRPV1 на сенсорних закінченнях периферичних ноцицепторів.

4. Показано, що блокування ASIC-каналів диміназеном – навіть у концентрації, що повністю інгібує відповідні протон-чутливі струми – не усуває відповідь ноцицепторів на помірний позаклітинний ацидоз. Навпаки, у високій концентрації диміназен неочікувано підсилює збудження, що не дозволяє пояснити спостережувану активність лише ASIC-залежними механізмами. Ці дані вказують на участь інших механізмів протонної чутливості, незалежних від ASIC, у забезпеченні реакції нервових закінчень на слабе закислення.

5. Установлено, що одним із таких альтернативних механізмів активації ноцицепторів при помірному ацидозі є внутрішньоклітинне закислення. Блокування натрій-протонного обмінника (NHE1) фармакологічними інгібіторами (EIPA, зоніпорид) призводить до підсилення відповідей на ацидоз, що пов'язано зі зниженням внутрішньоклітинного рН. Це внутрішньоклітинне закислення, імовірно, активує TRPA1-рецептори і блокує протон-чутливі калієві канали витоку, сприяючи деполяризації та підвищенню збудливості ноцицепторів. Також гіпотетично такий ефект може знижувати активність ASIC, що узгоджується з відсутністю ефекту диміназenu. Отже, NHE1 виконує ключову роль у регуляції чутливості ноцицепторів до кислотних подразників. 6. Узагальнюючи отримані дані, можна стверджувати, що периферичне кодування температурної та кислотної чутливості шкірними ноцицепторами має багатофакторний характер і забезпечується узгодженою участю іонних каналів TRPV1, ASIC, пуринергічних P2X₃-рецепторів та Na⁺/H⁺-антипортера NHE1. Показано, що P2X₃-рецептори здійснюють суттєвий внесок у кодування помірних теплових ноцицептивних стимулів, тоді як роль TRPV1 є визначальною переважно за умов екстремальних теплових і кислотних стимулів. Встановлено, що за помірного ацидозу ключове значення мають активність NHE1, внутрішньоклітинне закислення та пов'язана з ними модуляція збудливості ноцицепторів за участю TRPA1 і протон-чутливих K⁺-каналів. Таким чином, результати роботи розширюють уявлення про

периферичні механізми ноцицепції та окреслюють перспективи пошуку нових фармакологічних мішеней знеболювальної дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kendroud S, Fitzgerald LA, Murray IV, Hanna A. Physiology, Nociceptive Pathways. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470255/>.
2. Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*. 2010;120(11):3760-72. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>.
3. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>.
4. Grider MH, Jessu R, Kabir R. Physiology, Action Potential. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538143/>.
5. Kiernan MC, Cikurel K, Bostock H. Effects of temperature on the excitability properties of human motor axons. *Brain*. 2001;124(Pt 4):816-25. <https://doi.org/10.1093/brain/124.4.816>.
6. Leandri M, Leandri S, Lunardi G. Effect of temperature on sensory and motor conduction of the rat tail nerves. *Neurophysiol Clin*. 2008;38(5):297-304. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2008.08.002>.
7. Djouhri L. Delta-fiber low threshold mechanoreceptors innervating mammalian hairy skin: A review of their receptive, electrophysiological and cytochemical properties in relation to Delta-fiber high threshold mechanoreceptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;61:225-38. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.12.009>.
8. Zimmermann K, Hein A, Hager U, Kaczmarek JS, Turnquist BP, Clapham DE, Reeh PW. Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc*. 2009;4(2):174-96. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.223>.
9. Tkachenko Y, Cherninskyi A, Maximyuk O. Improved skin-nerve preparation technique for recording from cutaneous afferents. *Neurophysiology*. 2025. <https://doi.org/10.1007/s11062-025-09951-3>.

10. Cauwels A, Rogge E, Vandendriessche B, Shiva S, Brouckaert P. Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality. *Cell Death Dis.* 2014;5(3):e1102. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.70>.
11. Casimir GJ, Lefevre N, Corazza F, Duchateau J, Chamekh M. The Acid-Base Balance and Gender in Inflammation: A Mini-Review. *Front Immunol.* 2018;9:475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00475>.
12. Jones NG, Slater R, Cadiou H, McNaughton P, McMahon SB. Acid-induced pain and its modulation in humans. *J Neurosci.* 2004;24(48):10974-9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2619-04.2004>.
13. Dixit S, Lowe P, Fischer G, Lim A. Ice anaesthesia in procedural dermatology. *Australas J Dermatol.* 2013;54(4):273-6. <https://doi.org/10.1111/ajd.12057>.
14. Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci.* 1992;12(1):86-95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-01-00086.1992>.
15. Steen KH, Steen AE, Kreysel HW, Reeh PW. Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. *Pain.* 1996;66(2-3):163-70. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(96\)03034-5](https://doi.org/10.1016/0304-3959(96)03034-5).
16. Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Nishigaki M, Shibata Y, Shimada S. Amiloride-blockable acid-sensing ion channels are leading acid sensors expressed in human nociceptors. *J Clin Invest.* 2002;110(8):1185-90. <https://doi.org/10.1172/JCI15709>.
17. Slepko ER, Rainey JK, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J.* 2007;401(3):623-33. <https://doi.org/10.1042/BJ20061062>.
18. Ugawa S, Ueda T, Yamamura H, Shimada S. In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;136(1-2):125-33. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.01.010>.
19. Torres-Lopez JE, Guzman-Priego CG, Rocha-Gonzalez HI, Granados-Soto V. Role of NHE1 in Nociception. *Pain Res Treat.* 2013;2013:217864. <https://doi.org/10.1155/2013/217864>.

20. Zhu K, Wang L, Liao T, Li W, Zhou J, You Y, Shi J. Progress in the development of TRPV1 small-molecule antagonists: Novel Strategies for pain management. *Eur J Med Chem.* 2023;261:115806. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115806>.
21. Castaneda-Corral G, Rocha-Gonzalez HI, Godinez-Chaparro B, Jimenez-Andrade JM, Granados-Soto V. Role of the spinal Na⁺/H⁺ exchanger in formalin-induced nociception. *Neurosci Lett.* 2011;501(1):4-9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.06.048>.
22. Whitten ST, Garcia-Moreno EB, Hilser VJ. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4282-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407499102>.
23. Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(1):50-61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>.
24. Rajamaki K, Nordstrom T, Nurmi K, Akerman KE, Kovanen PT, Oorni K, Eklund KK. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem.* 2013;288(19):13410-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426254>.
25. Berkmann JC, Herrera Martin AX, Ellinghaus A, Schlundt C, Schell H, Lippens E, Duda GN, Tsitsilonis S, Schmidt-Bleek K. Early pH Changes in Musculoskeletal Tissues upon Injury-Aerobic Catabolic Pathway Activity Linked to Inter-Individual Differences in Local pH. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072513>.
26. Simmen HP, Battaglia H, Giovanoli P, Blaser J. Analysis of pH, pO₂ and pCO₂ in drainage fluid allows for rapid detection of infectious complications during the follow-up period after abdominal surgery. *Infection.* 1994;22(6):386-9. <https://doi.org/10.1007/BF01715494>.
27. Engin K, Leeper DB, Cater JR, Thistlethwaite AJ, Tupchong L, McFarlane JD. Extracellular pH distribution in human tumours. *Int J Hyperthermia.* 1995;11(2):211-6. <https://doi.org/10.3109/02656739509022457>.

28. Schneider D, Gerhardt E, Bock J, Muller MM, Wolburg H, Lang F, Schulz JB. Intracellular acidification by inhibition of the Na⁺/H⁺-exchanger leads to caspase-independent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis. *Cell Death Differ.* 2004;11(7):760-70. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401377>.
29. Guenther S, Reeh PW, Kress M. Rises in [Ca²⁺]_i mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *Eur J Neurosci.* 1999;11(9):3143-50. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00734.x>.
30. Werth JL, Thayer SA. Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 1994;14(1):348-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00348.1994>.
31. Zeilhofer HU, Kress M, Swandulla D. Fractional Ca²⁺ currents through capsaicin- and proton-activated ion channels in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1997;503 (Pt 1)(Pt 1):67-78. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.067bi.x>.
32. Liu CN, Somps CJ. Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitors reduce neuronal excitability and alter na⁺ channel inactivation properties in rat primary sensory neurons. *Toxicol Sci.* 2008;103(2):346-53. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn045>.
33. Steen KH, Issberner U, Reeh PW. Pain due to experimental acidosis in human skin: evidence for non-adapting nociceptor excitation. *Neurosci Lett.* 1995;199(1):29-32. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12002-l](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12002-l).
34. Steen KH, Steen AE, Reeh PW. A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci.* 1995;15(5 Pt 2):3982-9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-03982.1995>.
35. Pattison LA, Callejo G, St John Smith E. Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019;374(1785):20190291. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0291>.
36. Boscardin E, Alijevic O, Hummler E, Frateschi S, Kellenberger S. The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na⁽⁺⁾ channel (ENaC): IUPHAR Review 19. *Br J Pharmacol.* 2016;173(18):2671-701. <https://doi.org/10.1111/bph.13533>.

37. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24. <https://doi.org/10.1038/39807>.
38. Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;131:73-118. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.01.002>.
39. Blanchard MG, Kellenberger S. Effect of a temperature increase in the non-noxious range on proton-evoked ASIC and TRPV1 activity. *Pflugers Arch*. 2011;461(1):123-39. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0884-3>.
40. Neelands TR, Jarvis MF, Han P, Faltynek CR, Surowy CS. Acidification of rat TRPV1 alters the kinetics of capsaicin responses. *Mol Pain*. 2005;1:28. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-1-28>.
41. Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(14):8134-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.100129497>.
42. Cui Y, Yang F, Cao X, Yarov-Yarovoy V, Wang K, Zheng J. Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *J Gen Physiol*. 2012;139(4):273-83. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110724>.
43. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21(3):531-43. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80564-4).
44. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev*. 2002;82(3):735-67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2002>.
45. Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci*. 2003;26(9):477-83. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00210-8](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00210-8).

46. Xiao R, Xu XZS. Temperature Sensation: From Molecular Thermosensors to Neural Circuits and Coding Principles. *Annu Rev Physiol.* 2021;83:205-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031220-095215>.
47. Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain.* 2011;7:37. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-37>.
48. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* 2006;25(9):1804-15. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601083>.
49. Steen KH, Wegner H, Reeh PW. The pH response of rat cutaneous nociceptors correlates with extracellular [Na⁺] and is increased under amiloride. *Eur J Neurosci.* 1999;11(8):2783-92. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00695.x>.
50. Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(7):529-39. <https://doi.org/10.1038/nrn1141>.
51. LaMotte RH, Thalhammer JG, Robinson CJ. Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: a comparison of neural events in monkey with sensory judgments in human. *J Neurophysiol.* 1983;50(1):1-26. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.50.1.1>.
52. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 2000;288(5464):306-13. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.306>.
53. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature.* 2000;405(6783):183-7. <https://doi.org/10.1038/35012076>.
54. Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have

- normal heat responses. *J Neurosci.* 2004;24(28):6410-5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1421-04.2004>.
55. Zimmermann K, Leffler A, Fischer MM, Messlinger K, Nau C, Reeh PW. The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neuroscience.* 2005;135(4):1277-84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.018>.
 56. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1999;398(6726):436-41. <https://doi.org/10.1038/18906>.
 57. Frias B, Merighi A. Capsaicin, Nociception and Pain. *Molecules.* 2016;21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060797>.
 58. Tan CH, McNaughton PA. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature.* 2016;536(7617):460-3. <https://doi.org/10.1038/nature19074>.
 59. Song K, Wang H, Kamm GB, Pohle J, Reis FC, Heppenstall P, Wende H, Siemens J. The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science.* 2016;353(6306):1393-8. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7537>.
 60. Vilar B, Tan CH, McNaughton PA. Heat detection by the TRPM2 ion channel. *Nature.* 2020;584(7820):E5-E12. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2510-7>.
 61. Mulier M, Vandewauw I, Vriens J, Voets T. Reply to: Heat detection by the TRPM2 ion channel. *Nature.* 2020;584(7820):E13-E5. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2511-6>.
 62. North RA. P2X3 receptors and peripheral pain mechanisms. *J Physiol.* 2004;554(Pt 2):301-8. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.048587>.
 63. Dosch M, Gerber J, Jebbawi F, Beldi G. Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041222>.
 64. Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebunius-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature.* 2000;407(6807):1015-7. <https://doi.org/10.1038/35039526>.

65. Krishtal OA, Marchenko SM, Pidoplichko VI. Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones. *Neurosci Lett*. 1983;35(1):41-5. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90524-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90524-4).
66. Khmyz V, Maximyuk O, Teslenko V, Verkhatsky A, Krishtal O. P2X3 receptor gating near normal body temperature. *Pflugers Arch*. 2008;456(2):339-47. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0376-2>.
67. Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol*. 2012;165(4):787-801. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>.
68. Cai W, Zhang W, Zheng Q, Hor CC, Pan T, Fatima M, Dong X, Duan B, Xu XZS. The kainate receptor GluK2 mediates cold sensing in mice. *Nat Neurosci*. 2024;27(4):679-88. <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01585-8>.
69. Kersch-Schindl K, Uher EM, Zauner-Dungl A, Fialka-Moser V. [Cold and cryotherapy. A review of the literature on general principles and practical applications]. *Acta Med Austriaca*. 1998;25(3):73–78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9816398/>.
70. Burke D, Mogyoros I, Vagg R, Kiernan MC. Temperature dependence of excitability indices of human cutaneous afferents. *Muscle Nerve*. 1999;22(1):51-60. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199901\)22:1<51::aid-mus9>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199901)22:1<51::aid-mus9>3.0.co;2-q).
71. Swenson C, Sward L, Karlsson J. Cryotherapy in sports medicine. *Scand J Med Sci Sports*. 1996;6(4):193-200. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.1996.tb00090.x>.
72. Bierman W. Therapeutic use of cold. *J Am Med Assoc*. 1955;157(14):1189-92. <https://doi.org/10.1001/jama.1955.02950310015003>.
73. Ernst E, Fialka V. Ice freezes pain? A review of the clinical effectiveness of analgesic cold therapy. *J Pain Symptom Manage*. 1994;9(1):56-9. [https://doi.org/10.1016/0885-3924\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0885-3924(94)90150-3).
74. Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*. 2020;161(9):1976-82. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>.

75. Lacinova L. Electrophysiology of nociception: understanding of signaling pathways forms a basis for potential treatment. *Pflugers Arch.* 2022;474(4):365-6. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02679-7>.
76. Zhen W, Zhen H, Wang Y, Chen L, Niu X, Zhang B, Yang Z, Peng D. Mechanism of ERK/CREB pathway in pain and analgesia. *Front Mol Neurosci.* 2023;16:1156674. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1156674>.
77. Gong K, Ohara PT, Jasmin L. Patch Clamp Recordings on Intact Dorsal Root Ganglia from Adult Rats. *J Vis Exp.* 2016(115). <https://doi.org/10.3791/54287>.
78. Mancipe JC, Vargas-Pinto P, Rodriguez OE, Borrego-Munoz P, Castellanos Londono I, Ramirez D, Pineros LG, Mejia MC, Pombo LM. Anti-Inflammatory Effect of Izalpinin Derived from *Chromolaena leivensis*: lambda-Carrageenan-Induced Paw Edema and In Silico Model. *Molecules.* 2023;28(9). <https://doi.org/10.3390/molecules28093722>.
79. Raup-Konsavage WM, Sepulveda DE, Wang J, Dokholyan NV, Vrana KE, Graziane NM. Antinociceptive Effects of Cannabichromene (CBC) in Mice: Insights from von Frey, Tail-Flick, Formalin, and Acetone Tests. *Biomedicines.* 2023;12(1). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010083>.
80. Hill CL, Stephens GJ. An Introduction to Patch Clamp Recording. *Methods Mol Biol.* 2021;2188:1-19. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0818-0_1.
81. Jiang LH, Roger S. Heterologous Expression and Patch-Clamp Recording of P2X Receptors in HEK293 Cells. *Methods Mol Biol.* 2020;2041:261-73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_19.
82. Grundy L, Daly DM, Chapple C, Grundy D, Chess-Williams R. TRPV1 enhances the afferent response to P2X receptor activation in the mouse urinary bladder. *Sci Rep.* 2018;8(1):197. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18136-w>.
83. Altinok FA, Dallali I, Boubekka A, Hasan A, Ozturk Y. Optimized primary dorsal root ganglion cell culture protocol for reliable K(+) current patch-clamp recordings. *Neurosci Lett.* 2025;844:138038. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2024.138038>.

84. Lin YT, Chen JC. Dorsal Root Ganglia Isolation and Primary Culture to Study Neurotransmitter Release. *J Vis Exp*. 2018(140). <https://doi.org/10.3791/57569>.
85. Chen Z, Huang Q, Song X, Ford NC, Zhang C, Xu Q, Lay M, He SQ, Dong X, Hanani M, Guan Y. Purinergic signaling between neurons and satellite glial cells of mouse dorsal root ganglia modulates neuronal excitability in vivo. *Pain*. 2022;163(8):1636-47. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002556>.
86. Renthal W, Tochitsky I, Yang L, Cheng YC, Li E, Kawaguchi R, Geschwind DH, Woolf CJ. Transcriptional Reprogramming of Distinct Peripheral Sensory Neuron Subtypes after Axonal Injury. *Neuron*. 2020;108(1):128-44 e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.026>.
87. Hanani M, Spray DC. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2020;21(9):485-98. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>.
88. Bhawe G, Gereau RWt. Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. *J Neurobiol*. 2004;61(1):88-106. <https://doi.org/10.1002/neu.20083>.
89. Gong K, Bhargava A, Jasmin L. GluN2B N-methyl-D-aspartate receptor and excitatory amino acid transporter 3 are upregulated in primary sensory neurons after 7 days of morphine administration in rats: implication for opiate-induced hyperalgesia. *Pain*. 2016;157(1):147-58. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000342>.
90. Qarot E, Guan Y, Hanani M. The protective barrier role of satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia*. 2024;72(6):1054-66. <https://doi.org/10.1002/glia.24511>.
91. Tkachenko Y, Khmyz V, Isaev D, Maximyuk O, Krishtal O. Temperature increase significantly enhances nociceptive responses of C-fibers to ATP, high K(+), and acidic pH in mice. *Front Cell Neurosci*. 2023;17:1131643. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131643>.
92. Kress M, Koltzenburg M, Reeh PW, Handwerker HO. Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *J Neurophysiol*. 1992;68(2):581-95. <https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.2.581>.
93. Scuteri D, Berliocchi L, Rombola L, Morrone LA, Tonin P, Bagetta G, Corasaniti MT. Effects of Aging on Formalin-Induced Pain Behavior and Analgesic Activity of

- Gabapentin in C57BL/6 Mice. *Front Pharmacol.* 2020;11:663. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00663>.
94. Hoffmann T, Klemm F, T IK, Sauer SK, Kistner K, Riedl B, Raboisson P, Luo L, Babes A, Kocher L, Carli G, Fischer MJM, Reeh PW. The formalin test does not probe inflammatory pain but excitotoxicity in rodent skin. *Physiol Rep.* 2022;10(6):e15194. <https://doi.org/10.14814/phy2.15194>.
95. Erbacher C, Britz S, Dinkel P, Klein T, Sauer M, Stigloher C, Uceyler N. Interaction of human keratinocytes and nerve fiber terminals at the neuro-cutaneous unit. *Elife.* 2024;13. <https://doi.org/10.7554/eLife.77761>.
96. Tracey WD, Jr. Nociception. *Curr Biol.* 2017;27(4):R129-R33. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.037>.
97. Ru F, Sun H, Jurcakova D, Herbstsomer RA, Meixong J, Dong X, Udem BJ. Mechanisms of pruritogen-induced activation of itch nerves in isolated mouse skin. *J Physiol.* 2017;595(11):3651-66. <https://doi.org/10.1113/JP273795>.
98. Eller OC, Stair RN, Neal C, Rowe PSN, Nelson-Brantley J, Young EE, Baumbauer KM. Comprehensive phenotyping of cutaneous afferents reveals early-onset alterations in nociceptor response properties, release of CGRP, and hindpaw edema following spinal cord injury. *Neurobiol Pain.* 2022;12:100097. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2022.100097>.
99. Tkachenko Y, Maximyuk O, Cherninskyi A, Krishtal O. Electrophysiological methods in nociception research. *Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv Series: Biology.* 2025;100:66–71. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2025.100.66-71>
100. Zumbusch AS, McEachern ELF, Morgan OB, Nickner E, Mogil JS. Normative Preclinical Algesiometry Data on the von Frey and Radiant Heat Paw-Withdrawal Tests: An Analysis of Data from More Than 8,000 Mice Over 20 Years. *J Pain.* 2024;25(7):104468. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2024.01.333>.
101. Keum S, Shin HS. Rodent models for studying empathy. *Neurobiol Learn Mem.* 2016;135:22-6. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.07.022>.

102. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2012;2:145-65. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110217>.
103. Brady J. A simple technique for making very fine, durable dissecting needles by sharpening tungsten wire electrolytically. *Bull World Health Organ.* 1965;32(1):143–144. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2555190/>.
104. Johnson BR, Hauptman SA, Bonow RH. Construction of a simple suction electrode for extracellular recording and stimulation. *J Undergrad Neurosci Educ.* 2007;6(1):A21–A26. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3592669/>.
105. Li Y, Long F, Yang C, Hao X, Wu J, Situ J, Chen S, Qian Z, Huang F, Yu W. BALB/c Mouse Is a Potential Animal Model System for Studying Acute and Chronic Genotype 4 Hepatitis E Virus Infection. *Front Microbiol.* 2020;11:1156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01156>.
106. Ross JL, Queme LF, Lamb JE, Green KJ, Jankowski MP. Sex differences in primary muscle afferent sensitization following ischemia and reperfusion injury. *Biol Sex Differ.* 2018;9(1):2. <https://doi.org/10.1186/s13293-017-0163-5>.
107. Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia.* 1986;42(2):109-14. <https://doi.org/10.1007/BF01952426>.
108. Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR. Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol.* 1997;78(4):1841-50. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.4.1841>.
109. Kollarik M, Udem BJ. Mechanisms of acid-induced activation of airway afferent nerve fibres in guinea-pig. *J Physiol.* 2002;543(Pt 2):591-600. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.022848>.
110. Forster C, Handwerker HO. Automatic classification and analysis of microneurographic spike data using a PC/AT. *J Neurosci Methods.* 1990;31(2):109-18. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90155-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(90)90155-9).

111. An JH, Su Y, Radman T, Bikson M. Effects of glucose and glutamine concentration in the formulation of the artificial cerebrospinal fluid (ACSF). *Brain Res.* 2008;1218:77-86. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.04.007>.
112. Looser ZJ, Barrett MJP, Hirrlinger J, Weber B, Saab AS. Intravitreal AAV-Delivery of Genetically Encoded Sensors Enabling Simultaneous Two-Photon Imaging and Electrophysiology of Optic Nerve Axons. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:377. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00377>.
113. Bretag AH. Synthetic interstitial fluid for isolated mammalian tissue. *Life Sci.* 1969;8(5):319-29. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(69\)90283-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(69)90283-5).
114. Krubaa P, Yogitha PS. Albino Wistar Rats: Advantages and Limitations in Biomedical Research. *SBV Journal of Basic Clinical and Applied.* 2024;7(2):61-5. https://doi.org/10.4103/SBVJ.SBVJ_22_24.
115. Barden JA, Bennett MR. Distribution of P2X purinoceptor clusters on individual rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett.* 2000;287(3):183-6. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01150-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01150-2).
116. Grubb BD, Evans RJ. Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors. *Eur J Neurosci.* 1999;11(1):149-54. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00426.x>.
117. Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc.* 2007;2(1):152-60. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.461>.
118. Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA, Tsyndrenko AY. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-III. Potassium currents. *Neuroscience.* 1981;6(12):2439-44. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90090-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90090-7).
119. Kostyuk PG, Veselovsky NS, Tsyndrenko AY. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. *Neuroscience.* 1981;6(12):2423-30. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90088-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90088-9).
120. Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am.* 1992;266(3):44-51. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0392-44>.

121. Caverzasio J, Palmer G, Bonjour JP. Fluoride: mode of action. *Bone*. 1998;22(6):585-9. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(98)00058-1).
122. Gunthorpe MJ, Smith GD, Davis JB, Randall AD. Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch*. 2001;442(5):668-74. <https://doi.org/10.1007/s004240100584>.
123. Markowitz K, Kim S. The role of selected cations in the desensitization of intradental nerves. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88 Suppl 1:39–54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1508896/>.
124. Wanachantararak S, Vongsavan N, Matthews B. Electrophysiological observations on the effects of potassium ions on the response of intradental nerves to dentinal tubular flow in the cat. *Arch Oral Biol*. 2011;56(3):294-305. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.10.005>.
125. Hille B. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model. *J Gen Physiol*. 1975;66(5):535-60. <https://doi.org/10.1085/jgp.66.5.535>.
126. Gavva NR, Bannon AW, Hovland DN, Jr., Lehto SG, Klionsky L, Surapaneni S, Immke DC, Henley C, Arik L, Bak A, Davis J, Ernst N, Hever G, Kuang R, Shi L, Tamir R, Wang J, Wang W, Zajic G, Zhu D, Norman MH, Louis JC, Magal E, Treanor JJ. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(1):128-37. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.125674>.
127. Tkachenko, Y. M., Maximyuk, O. P., Cherninskyi, A. O., & Krishtal, O. O. Differential effects of TRPV1 antagonist AMG-517 on activation of nociceptive skin endings. *Fiziol. Zh*. 2025; 71(2), 34–39. <https://doi.org/10.15407/fz71.02.034>
128. Light AR, Huguen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z, Lee J. Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol*. 2008;100(3):1184-201. <https://doi.org/10.1152/jn.01344.2007>.
129. Seo HS, Roh DH, Kwon SG, Yoon SY, Kang SY, Moon JY, Choi SR, Beitz AJ, Lee JH. Acidic pH facilitates peripheral alphabetaATP-mediated nociception in rats: differential roles of P2X, P2Y, ASIC and TRPV1 receptors in ATP-induced mechanical

- allodynia and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology*. 2011;60(4):580-6. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.12.009>.
130. Chen X, Qiu L, Li M, Durnagel S, Orser BA, Xiong ZG, MacDonald JF. Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology*. 2010;58(7):1045-53. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.01.011>.
131. Leng TD, Si HF, Li J, Yang T, Zhu M, Wang B, Simon RP, Xiong ZG. Amiloride Analogs as ASIC1a Inhibitors. *CNS Neurosci Ther*. 2016;22(6):468-76. <https://doi.org/10.1111/cns.12524>.
132. Kleyman TR, Cragoe EJ, Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol*. 1988;105(1):1-21. <https://doi.org/10.1007/BF01871102>.
133. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992;51(1):5-17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T).
134. Bannon AW, Malmberg AB. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. 2007;Chapter 8:Unit 8 9. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41>.
135. Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>.
136. Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J Neurosci Methods*. 1999;87(2):185-93. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(99\)00004-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(99)00004-7).
137. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol*. 2004;61(1):3-12. <https://doi.org/10.1002/neu.20079>.
138. Paricio-Montesinos R, Schwaller F, Udhayachandran A, Rau F, Walcher J, Evangelista R, Vriens J, Voets T, Poulet JFA, Lewin GR. The Sensory Coding of Warm Perception. *Neuron*. 2020;106(5):830-41 e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.035>.

139. Tkachenko Y, Khmyz V, Buta A, Isaev D, Maximyuk O, Krishtal O. Acid-sensing ion channel blocker diminazene facilitates proton-induced excitation of afferent nerves in a similar manner that Na(+)/H(+) exchanger blockers do. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131661. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131661>.
140. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol.* 1992;107(2):544-52. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb12781.x>.
141. Habelt C, Kessler F, Distler C, Kress M, Reeh PW. Interactions of inflammatory mediators and low pH not influenced by capsazepine in rat cutaneous nociceptors. *Neuroreport.* 2000;11(5):973-6. <https://doi.org/10.1097/00001756-200004070-00015>.
142. Kirschstein T, Greffrath W, Busselberg D, Treede RD. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *J Neurophysiol.* 1999;82(6):2853-60. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.82.6.2853>.
143. St Pierre M, Reeh PW, Zimmermann K. Differential effects of TRPV channel block on polymodal activation of rat cutaneous nociceptors in vitro. *Exp Brain Res.* 2009;196(1):31-44. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1808-3>.
144. Symanowicz PT, Gianutsos G, Morris JB. Lack of role for the vanilloid receptor in response to several inspired irritant air pollutants in the C57Bl/6J mouse. *Neurosci Lett.* 2004;362(2):150-3. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.03.016>.
145. Koerber HR, McIlwrath SL, Lawson JJ, Malin SA, Anderson CE, Jankowski MP, Davis BM. Cutaneous C-polymodal fibers lacking TRPV1 are sensitized to heat following inflammation, but fail to drive heat hyperalgesia in the absence of TPV1 containing C-heat fibers. *Mol Pain.* 2010;6:58. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-58>.
146. Kiss L, Korn SJ. Modulation of N-type Ca²⁺ channels by intracellular pH in chick sensory neurons. *J Neurophysiol.* 1999;81(4):1839-47. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.4.1839>.
147. Hwang SM, Koo NY, Jin MH, Davies AJ, Chun GS, Choi SY, Kim JS, Park K. Intracellular Acidification Is Associated with Changes in Free Cytosolic Calcium and

- Inhibition of Action Potentials in Rat Trigeminal Ganglion. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(3):1719-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090951>.
148. Padan E, Landau M. Sodium-Proton (Na(+)/H(+)) Antiporters: Properties and Roles in Health and Disease. *Met Ions Life Sci*. 2016;16:391-458. https://doi.org/10.1007/978-3-319-21756-7_12.
149. Lee D, Hong JH. The Fundamental Role of Bicarbonate Transporters and Associated Carbonic Anhydrase Enzymes in Maintaining Ion and pH Homeostasis in Non-Secretory Organs. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010339>.
150. Nonner W, Spalding BC, Hille B. Low intracellular pH and chemical agents slow inactivation gating in sodium channels of muscle. *Nature*. 1980;284(5754):360-3. <https://doi.org/10.1038/284360a0>.
151. Vilin YY, Peters CH, Ruben PC. Acidosis differentially modulates inactivation in Na_v1.2, Na_v1.4, and Na_v1.5 channels. *Frontiers in Pharmacology*. 2012;3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00109>
152. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev*. 2010;90(2):559-605. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2009>.
153. Richter TA, Dvoryanchikov GA, Chaudhari N, Roper SD. Acid-sensitive two-pore domain potassium (K2P) channels in mouse taste buds. *J Neurophysiol*. 2004;92(3):1928-36. <https://doi.org/10.1152/jn.00273.2004>.
154. Cid LP, Roa-Rojas HA, Niemeyer MI, Gonzalez W, Araki M, Araki K, Sepulveda FV. TASK-2: a K2P K(+) channel with complex regulation and diverse physiological functions. *Front Physiol*. 2013;4:198. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00198>.
155. Reyes R, Duprat F, Lesage F, Fink M, Salinas M, Farman N, Lazdunski M. Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney. *J Biol Chem*. 1998;273(47):30863-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.30863>.

156. Wang S, Benamer N, Zanella S, Kumar NN, Shi Y, Bevengut M, Penton D, Guyenet PG, Lesage F, Gestreau C, Barhanin J, Bayliss DA. TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J Neurosci.* 2013;33(41):16033-44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2451-13.2013>.
157. Warth R, Barriere H, Meneton P, Bloch M, Thomas J, Tauc M, Heitzmann D, Romeo E, Verrey F, Mengual R, Guy N, Bendahhou S, Lesage F, Poujeol P, Barhanin J. Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(21):8215-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400081101>.
158. Niemeyer MI, Cid LP, Barros LF, Sepulveda FV. Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43166-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107192200>.
159. Bayliss DA, Barhanin J, Gestreau C, Guyenet PG. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflugers Arch.* 2015;467(5):917-29. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1633-9>.
160. Julio-Kalajzic F, Villanueva S, Burgos J, Ojeda M, Cid LP, Jentsch TJ, Sepulveda FV. K(2P) TASK-2 and KCNQ1-KCNE3 K(+) channels are major players contributing to intestinal anion and fluid secretion. *J Physiol.* 2018;596(3):393-407. <https://doi.org/10.1113/JP275178>.
161. Clark RB, Kondo C, Belke DD, Giles WR. Two-pore domain K(+) channels regulate membrane potential of isolated human articular chondrocytes. *J Physiol.* 2011;589(Pt 21):5071-89. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210757>.
162. Gabriel A, Abdallah M, Yost CS, Winegar BD, Kindler CH. Localization of the tandem pore domain K⁺ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;98(1-2):153-63. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00330-8](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00330-8).
163. Guyenet PG, Stornetta RL, Souza G, Abbott SGB, Shi Y, Bayliss DA. The Retrotrapezoid Nucleus: Central Chemoreceptor and Regulator of Breathing Automaticity. *Trends Neurosci.* 2019;42(11):807-24. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.09.002>.

164. Lopez-Cayuqueo KI, Pena-Munzenmayer G, Niemeyer MI, Sepulveda FV, Cid LP. TASK-2 K(2)p K(+) channel: thoughts about gating and its fitness to physiological function. *Pflugers Arch.* 2015;467(5):1043-53. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1627-7>.
165. Niemeyer MI, Cid LP, Pena-Munzenmayer G, Sepulveda FV. Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J Biol Chem.* 2010;285(22):16467-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107060>.
166. Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet JF, Goridis C, Warth R, Barhanin J. Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(5):2325-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910059107>.
167. Kang D, Kim D. Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315(4):836-44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.137>.
168. Niemeyer MI, Gonzalez-Nilo FD, Zuniga L, Gonzalez W, Cid LP, Sepulveda FV. Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(2):666-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606173104>.
169. Hall PR, Jouen-Tachoire T, Schewe M, Proks P, Baukrowitz T, Carpenter EP, Newstead S, Rodstrom KEJ, Tucker SJ. Structures of TASK-1 and TASK-3 K2P channels provide insight into their gating and dysfunction in disease. *Structure.* 2025;33(1):115-22 e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2024.11.005>.
170. Averbek B, Reeh PW. Interactions of inflammatory mediators stimulating release of calcitonin gene-related peptide, substance P and prostaglandin E(2) from isolated rat skin. *Neuropharmacology.* 2001;40(3):416-23. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00171-4](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00171-4).
171. Paez O, Segura-Chama P, Almanza A, Pellicer F, Mercado F. Properties and Differential Expression of H(+) Receptors in Dorsal Root Ganglia: Is a Labeled-Line

- Coding for Acid Nociception Possible? *Front Physiol.* 2021;12:733267. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.733267>.
172. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature.* 1997;386(6621):173-7. <https://doi.org/10.1038/386173a0>.
173. Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JGG, Cooper BY. Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: Histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *Journal of Neurophysiology.* 2000;84(5):2365-79. <https://doi.org/DOI 10.1152/jn.2000.84.5.2365>.
174. Deval E, Noël J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *Embo Journal.* 2008;27(22):3047-55. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.213>.
175. Storozhuk M, Cherninskyi A, Maximyuk O, Isaev D, Krishtal O. Acid-Sensing Ion Channels: Focus on Physiological and Some Pathological Roles in the Brain. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(9):1570-89. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210125151824>.
176. Li T, Yang Y, Canessa CM. Impact of recovery from desensitization on acid-sensing ion channel-1a (ASIC1a) current and response to high frequency stimulation. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40680-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418400>.
177. Matasic DS, Holland N, Gautam M, Gibbons DD, Kusama N, Harding AMS, Shah VS, Snyder PM, Benson CJ. Paradoxical Potentiation of Acid-Sensing Ion Channel 3 (ASIC3) by Amiloride via Multiple Mechanisms and Sites Within the Channel. *Front Physiol.* 2021;12:750696. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.750696>.
178. Chen CC, Zimmer A, Sun WH, Hall J, Brownstein MJ, Zimmer A. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(13):8992-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.122245999>.
179. Staniland AA, McMahon SB. Mice lacking acid-sensing ion channels (ASIC) 1 or 2, but not ASIC3, show increased pain behaviour in the formalin test. *Eur J Pain.* 2009;13(6):554-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.07.001>.

180. Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schafer M, Schultz G, Schaefer M. TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem.* 2004;279(33):34553-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402966200>.
181. Clapham DE. Structural biology: Pain-sensing TRPA1 channel resolved. *Nature.* 2015;520(7548):439-41. <https://doi.org/10.1038/nature14383>.
182. Wang YY, Chang RB, Liman ER. TRPA1 is a component of the nociceptive response to CO₂. *J Neurosci.* 2010;30(39):12958-63. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2715-10.2010>.
183. Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Inada H, Sokabe T, Tominaga M. Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(12):4049-57. <https://doi.org/10.1172/JCI35957>.
184. Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER. A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids. *J Gen Physiol.* 2011;137(6):493-505. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110615>.
185. Meents JE, Ciotu CI, Fischer MJM. TRPA1: a molecular view. *J Neurophysiol.* 2019;121(2):427-43. <https://doi.org/10.1152/jn.00524.2018>.
186. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(1):55-68. <https://doi.org/10.1038/nrd2757>.
187. Rocha-Gonzalez HI, Castaneda-Corral G, Araiza-Saldana CI, Ambriz-Tututi M, Caram-Salas NL, Torres-Lopez JE, Murbartian J, Granados-Soto V. Identification of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 in dorsal root ganglion and spinal cord: its possible role in inflammatory nociception. *Neuroscience.* 2009;160(1):156-64. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.033>.
188. Hwang SM, Koo NY, Jin M, Davies AJ, Chun GS, Choi SY, Kim JS, Park K. Intracellular acidification is associated with changes in free cytosolic calcium and inhibition of action potentials in rat trigeminal ganglion. *J Biol Chem.* 2011;286(3):1719-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090951>.

189. Lupachyk S, Watcho P, Shevalye H, Vareniuk I, Obrosova A, Obrosova IG, Yorek MA. Na⁺/H⁺ exchanger 1 inhibition reverses manifestation of peripheral diabetic neuropathy in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(3):E396-404. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00186.2013>.
190. Cox GA, Lutz CM, Yang CL, Biemesderfer D, Bronson RT, Fu A, Aronson PS, Noebels JL, Frankel WN. Sodium/hydrogen exchanger gene defect in slow-wave epilepsy mutant mice. *Cell*. 1997;91(1):139-48. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)80016-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80016-7).
191. Bell SM, Schreiner CM, Schultheis PJ, Miller ML, Evans RL, Vorhees CV, Shull GE, Scott WJ. Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am J Physiol*. 1999;276(4):C788-95. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.4.C788>.
192. Uria-Avellanal C, Robertson NJ. Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchangers and intracellular pH in perinatal brain injury. *Transl Stroke Res*. 2014;5(1):79-98. <https://doi.org/10.1007/s12975-013-0322-x>.

ДОДАТОК 1

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ
РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. **Tkachenko Y**, Khmyz V, Isaev D, Maximyuk O, Krishtal O. Temperature increase significantly enhances nociceptive responses of C-fibers to ATP, high K(+), and acidic pH in mice. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131643. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131643> (Особистий внесок здобувача: провів експериментальні дослідження, здійснив обробку та аналіз експериментальних даних).

2. **Tkachenko Y**, Khmyz V, Buta A, Isaev D, Maximyuk O, Krishtal O. Acid-sensing ion channel blocker diminazene facilitates proton-induced excitation of afferent nerves in a similar manner that Na(+)/H(+) exchanger blockers do. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1131661. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1131661> (Особистий внесок здобувача: виконав експериментальні дослідження з використанням методу препарату «шкіра–нерв» *ex vivo*, обробку та аналіз експериментальних даних).

3. **Tkachenko, Y. M.**, Maximyuk, O. P., Cherninskyi, A. O., & Krishtal, O. O. Differential effects of TRPV1 antagonist AMG-517 on activation of nociceptive skin endings. *Fiziol. Zh.* 2025; 71(2), 34–39. <https://doi.org/10.15407/fz71.02.034> (Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).

4. **Tkachenko Y**, Maximyuk O, Cherninskyi A, Krishtal O. Electrophysiological methods in nociception research. *Visnyk of Taras Shevchenko National University of Kyiv* Series: Biology. 2025;100:66–71. <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2025.100.66-71> (Особистий внесок здобувача: підготовка початкового варіанту рукопису та візуалізація).

5. **Tkachenko Y**, Cherninskyi A, Maximyuk O. Improved skin-nerve preparation technique for recording from cutaneous afferents. *Neurophysiology.* 2025. <https://doi.org/10.1007/s11062-025-09951-3> (Особистий внесок здобувача: розробив і вдосконалив метод *ex vivo* позаклітинної реєстрації електричної активності

аферентних нервів у ізольованому препараті «шкіра–нерв» миші, провів експерименти та аналіз даних, а також написав чернетку рукопису).

ДОДАТОК 2

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ
ДИСЕРТАЦІЇ*Тези доповідей:*

1. **Ткаченко Ю.М.**, Максимюк О.П., Хмиз В.В., Кришталь О.О. Вплив температури на збудження первинних аферентів ноцицепторів АТФ та рН // VI Конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, Україна, 4-8 червня, 2014.

2. **Y. M. Tkachenko**, A.Z. Buta, V.V. Khmyz, O.O. Krishtal, O. P. Maximyuk Diminazene increases the nociceptive response of primary sensory afferent nerve fibers to acidification in a dose-dependent manner // Abstracts of the Ukrainian conference on Neuroscience dedicated to the 90th birthday of academician Volodymyr Skok, 25-27 July 2022, Kyiv // Fiziol. Zh. 2022; 68(3S): p. 12.

3. **Tkachenko Y.**, Khmyz V., Maximyuk O. The nociceptive responses of mice's polymodal nociceptors of C-fibers to ATP and an acidic pH are highly temperature-dependent. IXth Meeting of Ukraine Biophysics Society, Kyiv, Ukraine, 30 October - 2 November, 2023.

4. **Ю.М. Ткаченко**, В.В. Хмиз, О.В. Єгорова, О.П. Максимюк, Д.С. Ісаєв, О.О. Кришталь. Антагоніст TRPV1 рецептора AMG-517 інгібує виключно капсаїцин-індуковане збудження чутливих закінчень ноцицептивних аферентів шкіри миші. // Фізіол. журн., 2024, Т. 70, № 5, додаток, С. 107-108.

5. **Ю.М. Ткаченко**, О.П. Максимюк, Єгорова О.В., Д.С. Ісаєв, О.О. Кришталь. Методика запису активності аферентних нервових волокон шкіри миші *ex vivo* для дослідження сенсорної чутливості.// Фізіол. журн., 2024, Т. 70, № 5, додаток, С. 129-130.