

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

ТКАЧЕНКО ЮРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 591.185; 616.8-009.7; 616-009.623

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

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2026

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, академік НАН України
Кришталь Олег Олександрович, завідувач
відділу фізико-хімічної біології клітинних
мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, академік
НАН України
Костерін Сергій Олексійович,
завідувач відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН
України

доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович, завідувач
кафедри біофізики та нейробіології ННЦ
«Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса
Шевченка

Захист дисертації відбудеться «22» вересня 2026 року о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: м. Київ, вул. Богомольця, 4, 01024.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та на сайті Інституту: <https://biph.kiev.ua>

Автореферат розіслано _____ 2026 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук

Літовка І. Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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. Больові 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 здатні одночасно експресувати різні типи іонних каналів та рецепторів (зокрема ASIC, P2X, TRPV1). 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 потенціалів дії (ПД). Частота ПД кодує інтенсивність больового стимулу. ПД регенерується за принципом «все або нічого» та поширюється вздовж аксона до центральної нервової системи, забезпечуючи передачу ноцицептивного сигналу. 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 сенсорну трансдукцію 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. 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.

Пошкодження тканин і розвиток запального процесу супроводжуються вивільненням аденозинтрифосфату (АТФ), локальним ацидозом і підвищенням температури, що, своєю чергою, спричиняє розвиток болю та гіпералгезії. Натомість зниження температури в зоні ураження, як правило, призводить до зменшення інтенсивності больових відчуттів. Температура є чинником, який впливає одночасно на всі біомолекули клітини, зокрема модулює чутливість

сенсорних закінчень до больових подразників. У цьому дослідженні вивчено вплив температури в межах фізіологічно нешкідливого теплового 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. Вважається, що в організмі ссавців головну роль у сприйнятті кислотності відіграють протон-чутливі іонні канали ASIC. Водночас інші молекулярні структури, зокрема Na^+/H^+ -обмінники (NHE) і рецептори TRPV1, також беруть участь у реакції на ацидоз. Показано, що всі три типи білків експресуються в ноцицептивних волокнах. Зокрема, інгібітори ASIC-каналів знижують кислотно-індуковану периферичну гіпералгезію і пригнічують запальний біль, блокада TRPV1 супроводжується анальгетичним ефектом, тоді як фармакологічне пригнічення домінуючої ізоформи Na^+/H^+ -обмінника — NHE1, експресованої у периферичній нервовій системі, сприяє розвитку ноцицептивної поведінки.

Саме тому у межах дисертаційного дослідження проаналізовано вплив хімічних антагоністів основних протон-чутливих трансмембранних іонних механізмів (ASIC, TRPV1, NHE1) 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 больових стимулів з метою визначення рецепторів, що беруть участь у сприйнятті температури в межах фізіологічно нешкідливого теплового 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 алгогенних 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 активність ноцицептивних аферентів шкіри, індуковану помірним ацидозом.
5. Дослідити вплив блокади Na^+/H^+ -обмінника NHE1 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 Na^+/H^+ -обмінника NHE1 на збудження ноцицепторів шкіри, спричинене ацидозом.

Методи дослідження: реєстрація електричної активності ноцицептивних аферентів у препараті «шкіра–нерв» миші *ex vivo* та реєстрація трансмембранних струмів сенсорних нейронів *in vitro*.

Наукова новизна одержаних результатів. Удосконалено метод позаклітинної реєстрації електричної активності поодиноких нервових волокон підшкірного нерва (*n. saphenus*) у препараті «шкіра–нерв» миші *ex vivo* за допомогою скляного мікроелектрода. Метод забезпечує стабільну реєстрацію протягом 8 годин, швидку заміну розчинів, спрощену перфузію та використання малих об'ємів експериментальних середовищ.

Вперше комплексно досліджено вплив температури у фізіологічно нешкідливому діапазоні на активацію ноцицептивних аферентів шкіри миші алгогенними стимулами та встановлено молекулярні механізми їх активації за умов помірного ацидозу. Вперше показано, що підвищення температури від 20 до 40 °С значно посилює відповіді ноцицепторів на АТФ ($Q_{10} \approx 2,9-3,1$) та H^+ ($Q_{10} \approx 3,0-3,3$), тоді як температурна залежність відповіді на високу концентрацію K^+ є помірною ($Q_{10} \approx 1,8-1,9$) і близькою до базальної активності ($Q_{10} \approx 1,9-2,0$), що свідчить про специфічну температурну модуляцію хімічно індукованої ноцицептивної активності. Вперше встановлено, що поєднання температури 40 °С і рН 6,1 не призводить до AMG-517-чутливої активації TRPV1-рецепторів сенсорних закінчень шкіри.

Вперше показано, що диміназен у концентраціях, достатніх для блокади ASIC, не пригнічує генерацію ПД ноцицептивних аферентів за умов помірного ацидозу, а у концентрації 100 мкМ, навпаки, посилює протон-індуковану

активність, що може бути пов'язано з його слабкою інгібувальною дією на Na^+/H^+ -обмінник NHE1.

Вперше встановлено, що збудження ноцицептивних аферентів за умов помірного ацидозу реалізується переважно через NHE1, а не ASIC-канали, що підтверджено ефектом селективного інгібітора NHE1 зоніпориду.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Показано, що кодування температурної та рН-чутливості первинними ноцицепторами є багатокомпонентним процесом. Окрім класичних сенсорів температури (TRPV1) і рН (ASIC), у ньому беруть участь також пуринергічні рецептори та Na^+/H^+ -обмінник NHE1. Температурна чутливість ноцицептивних аферентів пов'язана з температурною модуляцією пуринергічних і протон-чутливих механізмів, тоді як за помірного ацидозу ключову роль у регуляції кислотної чутливості відіграє NHE1.

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

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

Особистий внесок здобувача. Усі експериментальні дослідження, обробка й аналіз експериментальних даних, а також їхнє 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, присвяченій 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 збірниках матеріалів наукових конференцій і з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», розділу «Результати досліджень та їх обговорення», висновків і списку використаних джерел (192 найменування). Дисертацію викладено на 189 сторінках; робота містить 41 рисунок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Усі роботи виконано з урахуванням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV та відповідно до рішення Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Лабораторні тварини. Для досліджень сенсорної чутливості *ex vivo* використовували дорослих самців мишей BALB/c віком 6–7 тижнів. Для отримання культури клітин із задньокорінцевих гангліїв для *patch-clamp* досліджень використовували самців мишей BALB/c та щурів Wistar віком 8–12 діб. Тварин утримували у віварії Інституту фізіології імені О. О. Богомольця за 12-годинного циклу світло–темрява з вільним доступом до корму та води.

Електричну активність сенсорних аферентів миші *ex vivo* реєстрували скляним всмоктувальним мікроелектродом за допомогою підсилювача моделі 3000 (A-M Systems) і Digidata 1200 (Axon Instruments). Запис і збереження сигналів здійснювали за допомогою програм WinEDR V3.9.1 та WinWCP V4.5.4 (рис. 1).

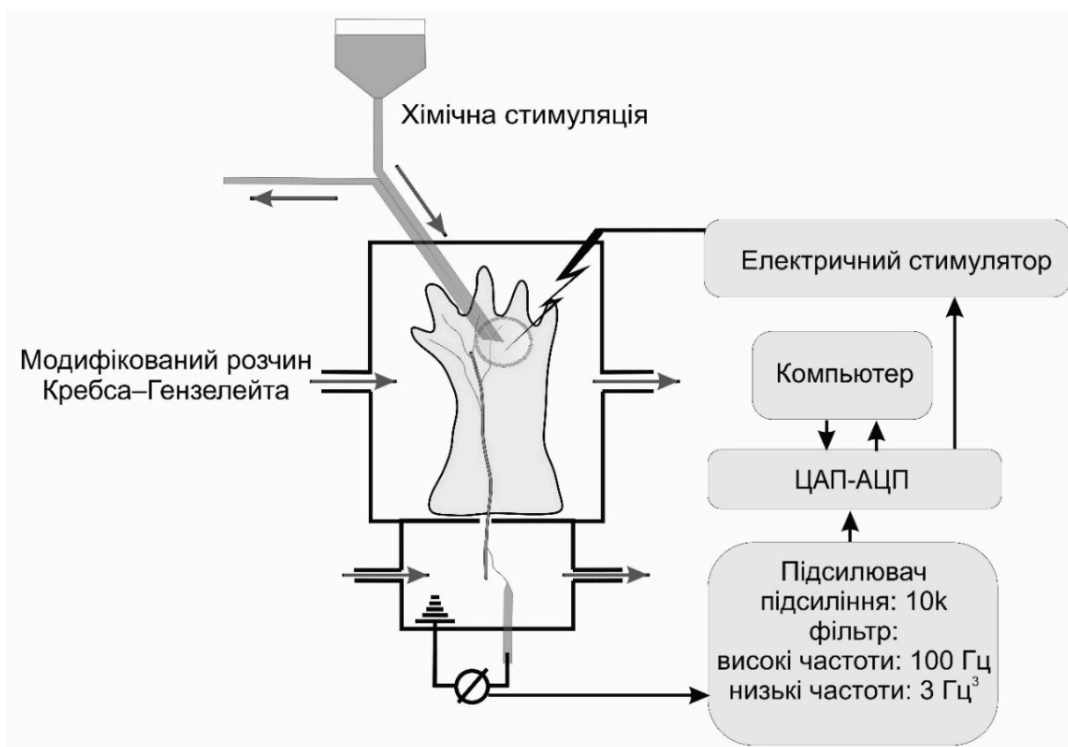


Рис. 1. Спрощена схема експерименту *ex vivo*.

Хімічна і температурна стимуляція чутливих закінчень сенсорних аферентів миші *ex vivo*. Рецептивне поле ізолювали скляним кільцем з окремою системою перфузії (4 мл/хв). Для зниження рН до значення 6,1 використовували розчин Кребса–Гензелейта, насичений 100 % CO₂, а до 6,7 — низькобікарбонатний розчин. Стимуляцію високою концентрацією K⁺ (10,8 мМ) здійснювали еквімолярною заміною Na⁺ на K⁺; АТФ і капсаїцин додавали до перфузійного розчину. Хімічні стимули послідовно застосовували до

рецептивних полів тих самих аферентів, причому перший стимул використовували як контрольний, а останній — для оцінки відновлення відповіді. Температуру перфузійного розчину змінювали відповідно до умов експерименту (рис. 2).

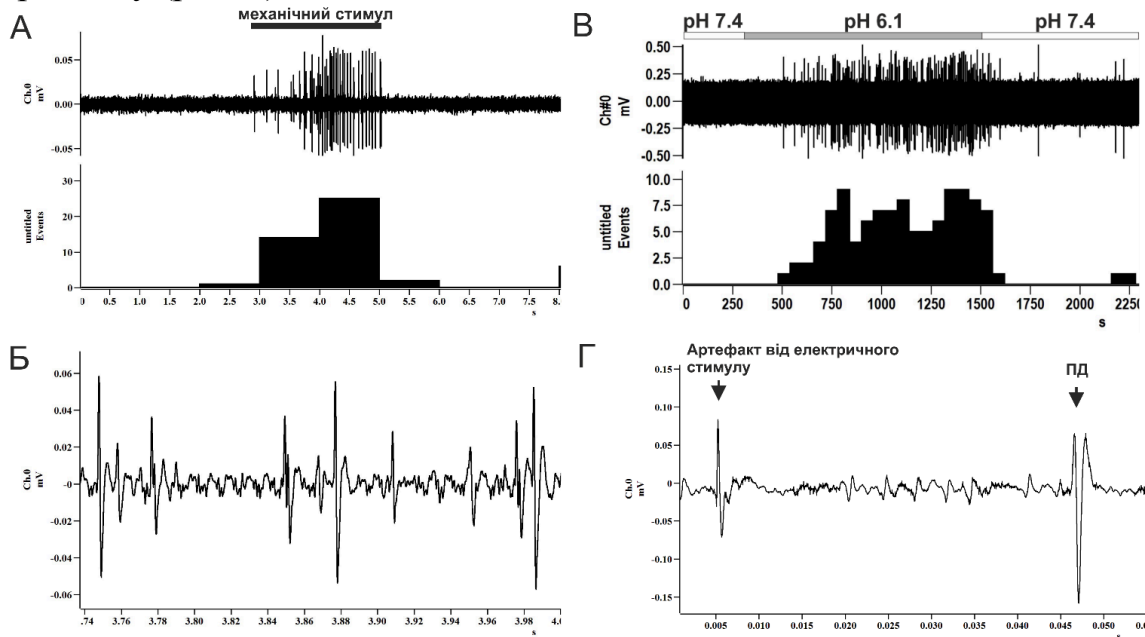


Рис. 2. (А) Запис ПД сенсорних аферентів у відповідь на механічну стимуляцію рецептивного поля: верхній канал — група ПД, нижній — частота генерації ПД, усереднена за 1-хвилинними інтервалами. (Б) Фрагмент запису (А) тривалістю 0,25 с з окремими нервовими імпульсами (ПД). (В) Запис електричної активності аферента під час зміни рН у рецептивному полі (верхній канал) та відповідна частота генерації ПД, усереднена за 1-хвилинними інтервалами (нижній канал). (Г) Запис ПД у відповідь на електричну стимуляцію.

Удосконалений метод *ex vivo* реєстрації активності аферентних волокон шкіри миші. Удосконалено методику *ex vivo* реєстрації електричної активності поодиноких аферентних волокон у препараті «шкіра–нерв» миші для дослідження сенсорної чутливості. Ключовою модифікацією є реєстрація сигналів з окремих гілок *n. saphenus* скляним електродом без відокремлення основного стовбура, що спрощує препарування, зменшує розмір препарату та полегшує локалізацію рецептивних полів. Для фармакологічного тестування інтегровано систему локальної перфузії рецептивного поля, засновану на силах поверхневого натягу, що забезпечує швидку заміну розчину та локальну експозицію нервових закінчень досліджуваними сполуками (рис. 3).

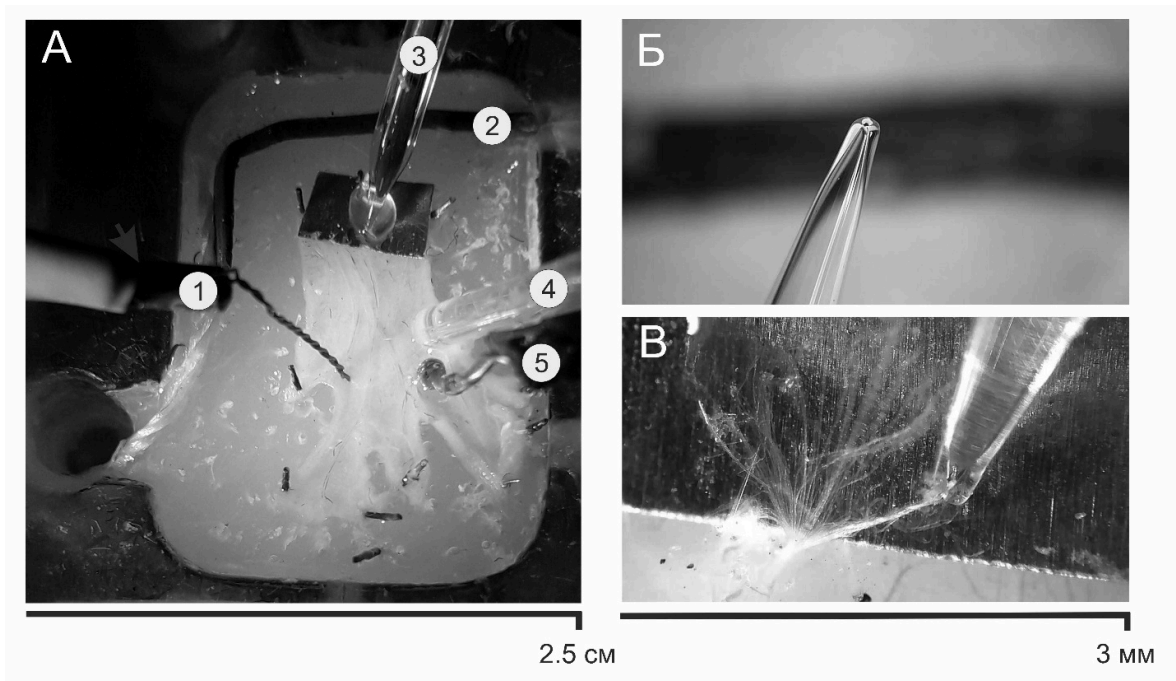


Рис. 3. Експериментальна камера та реєстраційний електрод. (А) Загальний вигляд камери для препарату «шкіра–нерв» миші: 1 — сталевий біполярний електрод; 2 — заземлювальний електрод; 3 — всмоктувальний електрод; 4 — канюля для подачі розчину; 5 — термопара. (Б) Мікрофотографія наконечника скляного всмоктувального електрода. (В) Наконечник електрода з нервовими філаментами.

Аналіз електричної активності сенсорних аферентів проводили у програмі Spike2 (CED, Велика Британія), статистичний аналіз — в OriginPro 8.5. Дані подано як середнє $\pm$ SEM; статистичну значущість оцінювали за допомогою дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями (RM ANOVA) з post hoc-тестом Бонферроні при $p < 0,05$.

Розрахунок енергії активації E_a та температурного коефіцієнта Q_{10} . Енергію активації E_a розраховували на основі частоти ПД (f) за заданої температури T (К) з використанням графіка Арреніуса $\ln(f)$ від $1/T$. Температурний коефіцієнт Q_{10} обчислювали за рівнянням:

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

де $R = 8,3144 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ — універсальна газова стала.

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

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

де X_1 , X_2 швидкості проведення, а T_1 , T_2 — відповідні температури.

Реєстрацію трансмембранних струмів у первинній культурі DRG-нейронів мишей BALB/c та щурів Wistar віком 8–12 діб проводили методом patch-clamp у конфігурації whole-cell із використанням підсилювача EPC8 та системи LHM 1600 (НЕКА). Потенціал утримання становив -60 мВ. Дані реєстрували за допомогою PatchMaster v2×69 (НЕКА), а статистичну обробку проводили в OriginPro 8.5. Результати наведено як середнє $\pm$ SEM; для порівняння амплітуд струмів використовували парний t-тест Стюдента, рівень значущості — $p < 0,05$.

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Залежність електричної активності нервових закінчень шкіри від зміни температури у межах фізіологічного діапазону.

1.1. Вплив зміни температури на швидкість проведення нервових волокон.

Підвищення температури з 30 до 40 °C достовірно збільшувало швидкість проведення С-волокон з $0,68 \pm 0,07$ до $0,95 \pm 0,11$ м/с ($p < 0,001$; $n = 71$), тоді як при 20 °C вона зменшувалася до $0,49 \pm 0,05$ м/с ($p = 0,02$; $n = 71$). Різниця між 20 та 40 °C також була достовірною ($p < 0,001$; $n = 71$; рис. 4А, 5А).

1.2. Вплив зміни температури на спонтанну активність ноцицептивних аферентів. Підвищення температури з 30 до 40 °C достовірно збільшувало частоту ПД з $0,10 \pm 0,01$ до $0,22 \pm 0,02$ імп/с ($n = 71$; $p < 0,001$), тоді як при зниженні температури до 20 °C активність зменшувалася до $0,06 \pm 0,01$ імп/с ($p = 0,18$; рис. 4Б–Г, рис. 5Б).

Таким чином, спонтанна активність і швидкість проведення нервових аферентів були максимальними при 40 °C та мінімальними при 20 °C.

1.3. Вплив зміни температури на протон-викликане збудження ноцицептивних аферентів шкіри. При 30 °C перфузія розчином із рН 6,7 не змінювала частоту ПД ($0,27 \pm 0,06$ проти $0,10 \pm 0,02$ імп/с; $n = 29$; $p = 0,334$). При 40 °C закислення достовірно посилювало імпульсацію з $0,24 \pm 0,04$ до $0,65 \pm 0,12$ імп/с ($n = 29$; $p < 0,001$), тоді як при 20 °C протон-викликана відповідь була відсутня ($0,065 \pm 0,01$ проти $0,07 \pm 0,02$ імп/с; $p > 0,05$; рис. 4В, 5В). Таким чином, підвищення температури посилювало чутливість СМН-аферентів до зниження рН.

1.4. Вплив зміни температури на АТФ-індуковане збудження ноцицептивних аферентів шкіри. При 30 °C АТФ (200 мкМ) не спричиняв достовірного зростання частоти ПД ($0,18 \pm 0,05$ проти $0,10 \pm 0,02$ імп/с; $n = 15$; $p = 0,65$), тоді як при 40 °C достовірно підвищував її з $0,20 \pm 0,03$ до $0,67 \pm 0,11$ імп/с ($n = 15$; $p < 0,001$; рис. 4Г, 5В). При 20 °C підвищення частоти ПД на дію АТФ також була недостовірною ($0,08 \pm 0,02$ проти $0,04 \pm 0,01$ імп/с; $n = 15$; $p = 1$). Отже, підвищення температури посилювало чутливість СМН-аферентів до АТФ.

1.5. Вплив температури на K^+ -індуковане збудження ноцицептивних аферентів шкіри. За температури 30 °C K^+ ($10,8$ мМ) достовірно підвищував частоту ПД з $0,09 \pm 0,02$ до $0,42 \pm 0,07$ імп/с ($n = 23$; $p < 0,001$), а за 40 °C — з $0,20 \pm 0,04$ до $0,79 \pm 0,13$ імп/с ($n = 23$; $p < 0,001$; рис. 4Б, 5В). За 20 °C

підвищення частоти ПД з $0,06 \pm 0,01$ до $0,23 \pm 0,04$ імп/с не було статистично значущим ($n = 23$; $p = 0,195$). Отже, K^+ -індуковане збудження ноцицептивних аферентів залежало від температури.

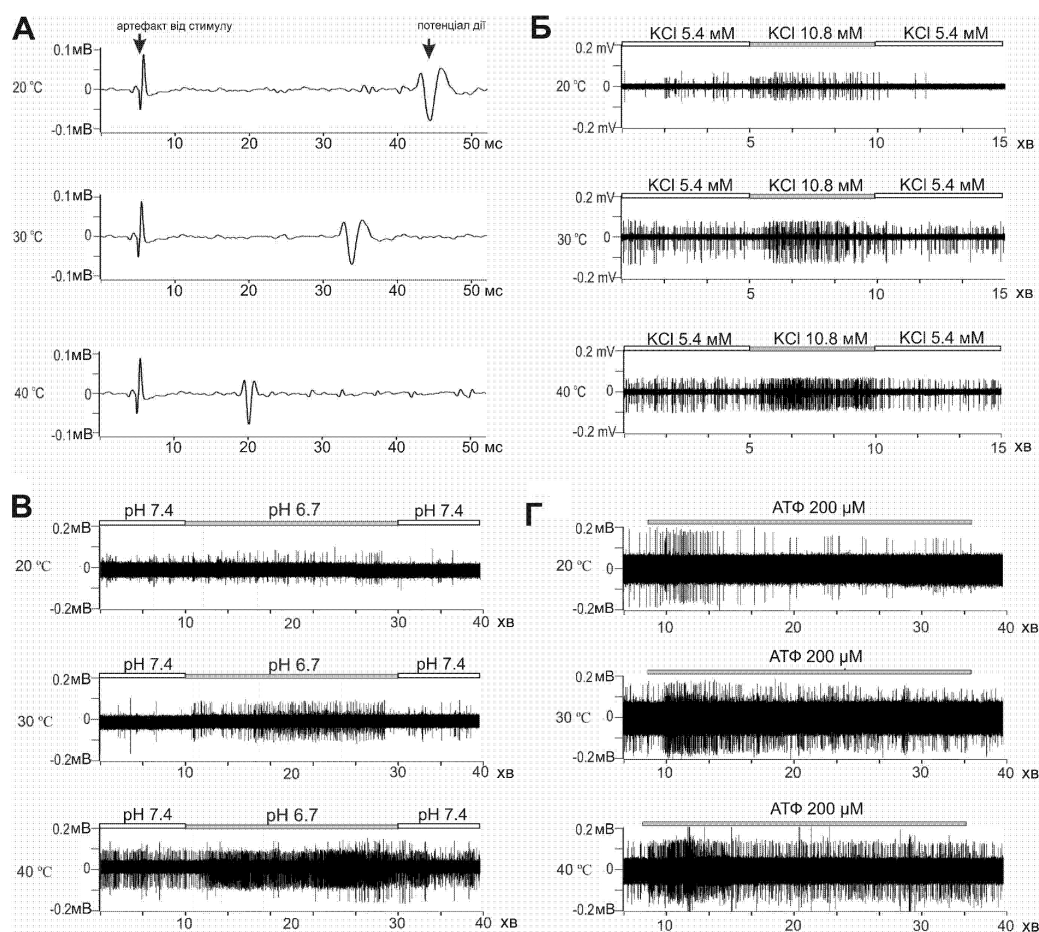


Рис. 4. Приклади електрофізіологічних записів, що ілюструють температурну залежність параметрів електричної активності С-аферентів шкіри при 20, 30 і 40 °С: (А) швидкість проведення поодинокого С-волокна; (Б) K^+ -індуковане зростання частоти ПД; (В) H^+ -індуковане зростання частоти ПД; (Г) АТФ-індуковане зростання частоти ПД.

Таким чином, підвищення температури супроводжувалося збільшенням частоти ПД як у стані спокою (рис. 5Б), так і у відповідь на подразнення H^+ , АТФ і K^+ . На рисунку 5В показано приріст частоти ПД нервових волокон у відповідь на хімічне подразнення порівняно з контрольними значеннями (Δ).

1.6. Q_{10} та енергія активації, розраховані на основі спонтанної та викликанної електричної активності ноцицептивних аферентів шкіри. Значення енергії активації (E_a) становили $51,4 \pm 8,6$ кДж/моль для базальної активності, $46,7 \pm 2,5$ кДж/моль для K^+ , $83,6 \pm 10,6$ кДж/моль для АТФ та $87,1 \pm 8,6$ кДж/моль для низького рН. Q_{10} у діапазоні 20–30 °С становив $2,01 \pm 0,20$ для базальної активності, $1,88 \pm 0,06$ для K^+ , $3,11 \pm 0,44$ для АТФ та $3,25 \pm 0,38$ для низького рН; у діапазоні 30–40 °С — відповідно $1,92 \pm 0,21$, $1,81 \pm 0,06$, $2,89 \pm$

0,39 та $3,02 \pm 0,33$. Q_{10} для швидкості проведення С-волокон у діапазоні 20–40 °С становив 1,4, що відповідає температурній залежності іонних струмів (рис. 5Г).

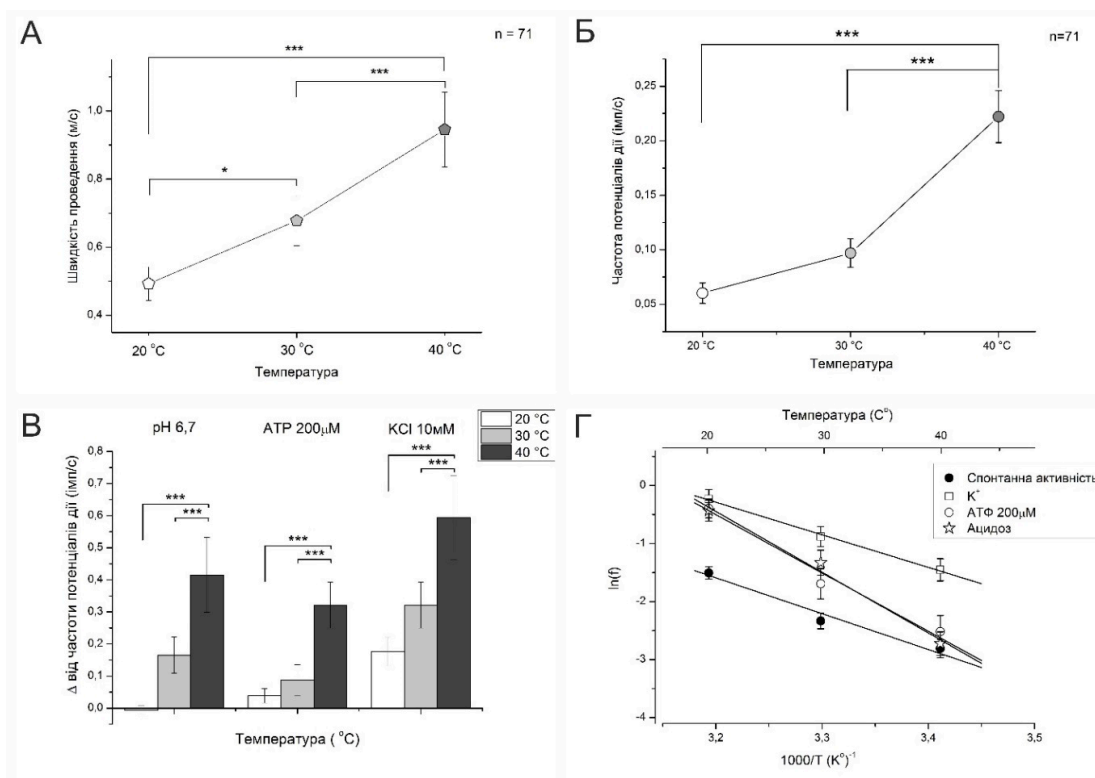


Рис. 5. (А) Залежність швидкості проведення нервових імпульсів (ПД) по С-волоконках від температури; (Б) залежність спонтанної активності полімодальних ноцицептивних аферентів від температури; (В) різниця між середнім значенням частоти ПД під час хімічної стимуляції та рівнем спонтанної активності нервових аферентів за контрольних умов (Δ) за температури 20, 30 і 40 °С; (Г) графік Арреніуса, що демонструє температурну залежність частоти імпульсації СМН-ноцицепторів. Позначення на графіках: *** $p < 0,001$.

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

2.1. AMG-517 не впливав на протон-викликане збудження ноцицептивних закінчень шкіри при pH 6,1 і температурі 40 °С. Перевірено можливість синергічної активації TRPV1 при одночасній дії помірного ацидозу та підвищеної температури, використовуючи селективний антагоніст TRPV1 AMG-517. У СМН-волоконках ($n = 22$) AMG-517 (1,3 мкМ) не впливав на спонтанну активність та протон-викликане збудження за pH 6,1 і температури 40 °С ($0,51 \pm 0,084$ проти $0,48 \pm 0,074$ імп/с; $p = 0,298$). Отже, одночасна дія помірного нагрівання та ацидозу не спричиняє активації TRPV1 у периферичних ноцицептивних закінченнях шкіри.

2.2. Вплив AMG-517 на активацію полімодальних ноцицепторів у відповідь на теплову стимуляцію. Вплив селективного антагоніста TRPV1 AMG-517 на теплову активацію полімодальних СМН-ноцицепторів досліджували при нагріванні перфузійного розчину з 30 до 50 °С протягом 60 с. AMG-517 (5 мкМ) попередньо аплікували на рецептивне поле протягом 5 хв, після чого проводили теплову стимуляцію; перша та остання стимуляції слугували контролем.

Під час контрольної стимуляції нагрівання до 50 °С достовірно підвищувало частоту імпульсації СМН-волокон ($n = 13$) з $0,048 \pm 0,022$ до $0,662 \pm 0,14$ імп/с ($p < 0,001$). AMG-517 не змінював теплової відповіді порівняно з контрольною стимуляцією ($0,70 \pm 0,15$ імп/с; $p = 1$). Отже, теплова активація полімодальних ноцицепторів при нагріванні до 50 °С може реалізовуватися за участю TRPV1-незалежних механізмів.

2.3. AMG-517 блокує збудження ноцицепторів, індуковане капсаїцином.

Капсаїцин (20 мкМ) активував 20 із 28 досліджених ноцицептивних аферентів (71,4 %), підвищуючи частоту імпульсації з $0,038 \pm 0,013$ до $0,217 \pm 0,043$ імп/с ($p < 0,001$; рис. 6А, Б). AMG-517 (5 мкМ) не впливав на базальну активність, але достовірно пригнічував капсаїцин-індуковану активацію ($p < 0,001$), яка повністю відновлювалася після відмивання антагоніста. Отже, AMG-517 специфічно та зворотно пригнічує капсаїцин-індуковану активацію ноцицептивних аферентів шкіри *ex vivo*.

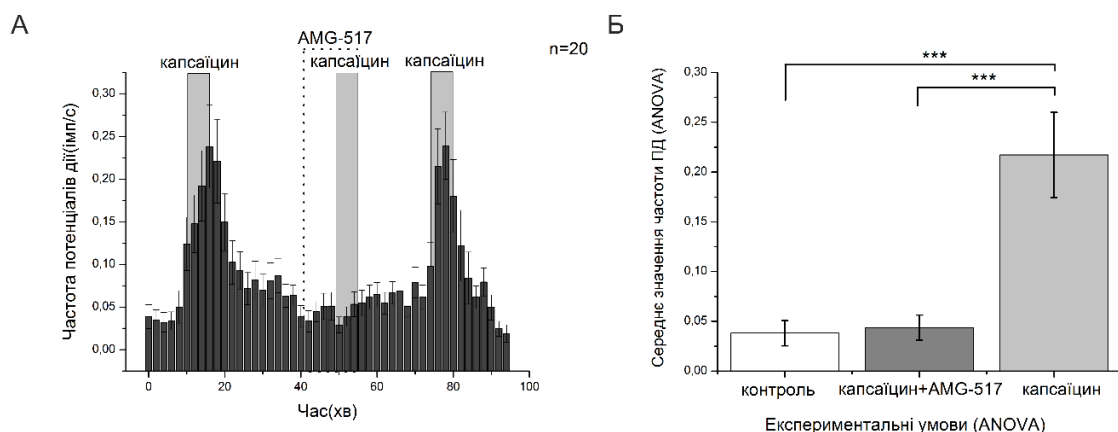


Рис. 6. (А) Гістограма частоти ПД, усереднена за 2-хвилинні інтервали. (Б) Діаграма частоти ПД що відображає результати дисперсійного аналізу (ANOVA) для повторних вимірювань.

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

Диміназен у концентраціях 10 та 25 мкМ не впливав на протон-індуковану активацію СМН-волокон шкіри миші *ex vivo* (рН 6,1; $n = 8$). Для з'ясування механізмів отриманого результату його вплив на нативні протон-чутливі іонні канали досліджували методом *patch-clamp* у первинних DRG-нейронах миші *in vitro*.

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

миші. Диміназен дозозалежно пригнічував ASIC-струми, індуковані зниженням рН з 7,4 до 6,0, з $IC_{50} = 16,9 \pm 4,4$ мкМ, а при концентрації 100 мкМ майже повністю їх блокував (рис. 7А). Отже, диміназен ефективно пригнічує нативні ASIC-канали у сомах сенсорних DRG-нейронів у високих мікромольних концентраціях.

3.2. Диміназен у концентрації 100 мкМ посилює протон-індуковану електричну активність полімодальних СМН-аферентів шкіри миші. З огляду на виражене пригнічення ASIC-струмів диміназином *in vitro*, його дію у концентрації 100 мкМ досліджували у препараті «шкіра–нерв» *ex vivo*. Заміна контрольного розчину з рН 7,4 на кислий розчин із рН 6,1 достовірно підвищувала активність СМН-волокон з $0,05 \pm 0,02$ до $0,40 \pm 0,11$ імп/с ($n = 13$; $p = 0,003$), тоді як диміназен сам по собі не змінював спонтанної активності. Водночас одночасна аплікація диміназену з кислим розчином достовірно посилювала протон-індуковану імпульсацію порівняно з відповіддю на кислий розчин до $1,81 \pm 0,42$ імп/с ($p = 0,0003$; рис. 7Б), що відповідало підвищенню чутливості СМН-волокон до ацидозу на 352,5 %. Таким чином, у високій концентрації диміназен, попри блокування ASIC-струмів у сомах DRG-нейронів, посилює протон-індуковану активність периферичних СМН-аферентів.

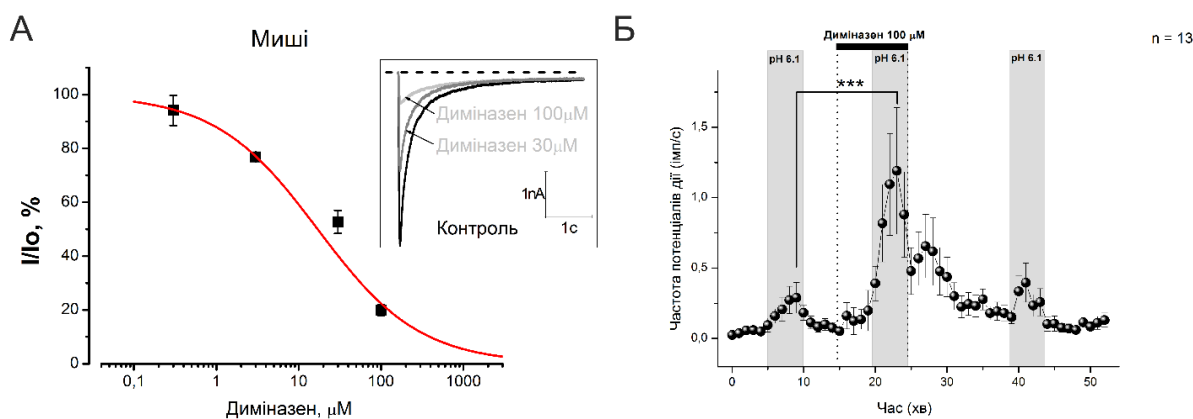


Рис. 7. (А) Дозозалежність протон-активованих трансмембранних катіонних струмів від концентрації диміназену у первинній культурі сенсорних DRG-нейронів. Вставка показує приклади протон-активованих струмів на DRG-нейроні: відповідь на стимул із рН 6,0 та їх пригнічення диміназеном у концентраціях 30 і 100 мкМ. (Б) Частота ПД аферентних нервових волокон шкіри, усереднена за 1-хвилинними інтервалами, під час дослідження впливу диміназену (100 мкМ) на протон-індуковане збудження ноцицептивних закінчень (***) ($p < 0,001$).

4. Блокатори Na^+/H^+ -обмінника NHE1 EIPA і зоніпорид підвищують протон-індуковану електричну активність СМН-волокон шкіри.

4.1. Неселективний блокатор сімейства Na^+/H^+ -обмінників (NHE) EIPA (10 мкМ) підвищує протон-індуковану електричну активність полімодальних СМН-волокон шкіри. EIPA у концентрації 10 мкМ не впливав на спонтанну активність СМН-волокон, але достовірно посилював протон-індуковану імпульсацію: частота ПД зростала з $0,11 \pm 0,03$ до $0,41 \pm 0,06$ імп/с ($n = 14$; $p < 0,001$; рис. 8А), що відповідало зростанню відповіді до 376,4 % від контрольного рівня.

4.2. Зоніпорид, селективний інгібітор NHE1, посилює протон-індуковану активність СМН-волокон шкіри. Зоніпорид у концентрації 0,5 мкМ не впливав на спонтанну активність СМН-волокон, але достовірно посилював протон-індуковану імпульсацію: частота ПД зростала з $0,66 \pm 0,27$ до $1,68 \pm 0,58$ імп/с ($n = 17$; $p = 0,012$; рис. 8Б), що відповідало зростанню відповіді до 253,8 % від контрольного рівня.

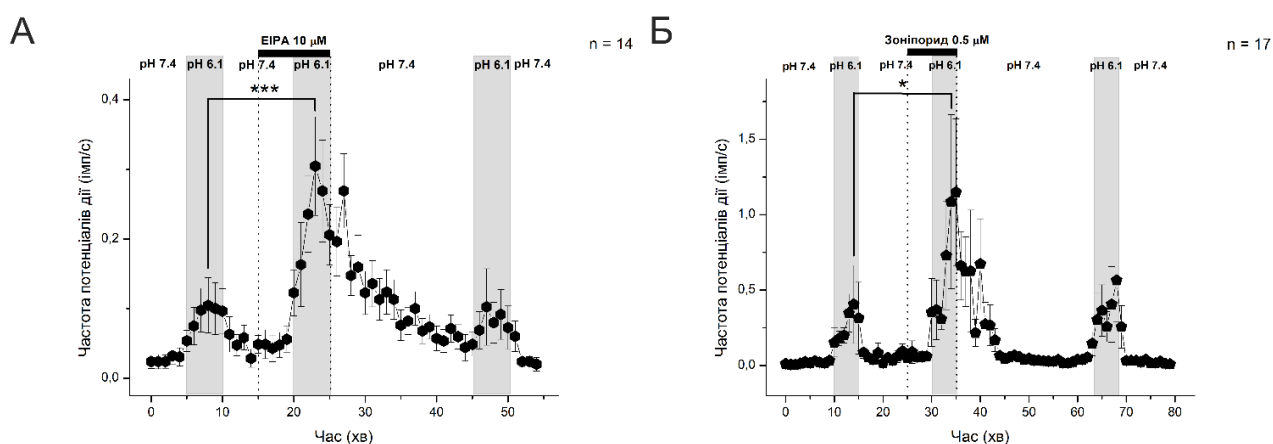


Рис. 8. (А) Частота потенціалів дії (ПД) ноцицептивних аферентів шкіри *ex vivo*, усереднена за 1-хвилинними інтервалами, під час впливу EIPA (10 мкМ) на протон-індуковану активацію СМН-волокон. (Б) Частота ПД ноцицептивних аферентів шкіри *ex vivo*, усереднена за 1-хвилинними інтервалами, під час впливу зоніпориду в концентрації 0,5 мкМ на протон-індуковану активацію СМН-волокон (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.3. Зоніпорид у концентрації 1 мкМ не впливає на протон-активовані струми ASIC у DRG-нейронах і клітинах HEK293. Зоніпорид у концентрації 1 мкМ, ефективний для інгібування NHE1, не змінював амплітуди протон-активованих струмів у сенсорних DRG-нейронах мишей і щурів *in vitro* та клітинах HEK293 з гетерологічною експресією ASIC1a. Отримані дані свідчать про відсутність прямого впливу зоніпориду в цій концентрації на функціональну активність ASIC-каналів.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Залежність збудливості ноцицептивних рецепторів від температури. Підвищення температури в межах фізіологічного діапазону (30–40 °C) значно посилювало відповіді ноцицептивних аферентів на протони та АТФ ($Q_{10} \approx 3$), тоді як температурна залежність базальної та K^+ -індукованої активності була

меншою ($Q_{10} \approx 1,9$). Це свідчить про специфічну температурну модуляцію хімічно індукованої ноцицептивної активності. Імовірно, одним із механізмів цього ефекту є участь пуринергічних $P2X_3$ -рецепторів, чутливість і кінетика яких істотно залежать від температури. Отримані дані свідчать, що фізіологічне підвищення температури може посилювати ноцицептивні відповіді на хімічні стимули та сприяти розвитку гіпералгезії.

Диференційна дія антагоніста TRPV1 AMG-517 на активацію ноцицептивних закінчень шкіри. Вперше показано, що AMG-517 ефективно пригнічує капсаїцин-індуковане збудження ноцицептивних аферентів, що підтверджує його здатність блокувати TRPV1. Водночас антагоніст не впливав на теплову активацію ноцицепторів та збудження, індуковане зниженням рН, що відрізняється від результатів, отриманих на клітинних моделях, і свідчить про багатокомпонентний характер периферичного кодування температурної та кислотної чутливості у ноцицептивних закінченнях.

Роль внутрішньо- та позаклітинного рН у регуляції збудливості первинних ноцицепторів. Зміни внутрішньо- та позаклітинного рН впливають на збудливість ноцицепторів через модифікацію активності іонних каналів та систем регуляції кислотно-лужного стану. Внутрішньоклітинний ацидоз сприяє деполяризації мембрани та підвищує збудливість за рахунок пригнічення калієвих струмів і зміни кінетики потенціалзалежних натрієвих каналів. Важливу роль у підтриманні рН_i відіграє Na^+/H^+ -обмінник NHE1, пригнічення якого сприяє внутрішньоклітинному закисленню та підвищенню збудливості ноцицепторів.

Позаклітинний ацидоз активує низку протон-чутливих каналів із різними властивостями. ASIC забезпечують швидку деполяризацію у відповідь на позаклітинні протони, однак за тривалого їхній внесок обмежується десенситизацією. TRPV1 активується переважно за сильнішого ацидозу та формує триваліший катіонний струм, тоді як TRPA1 реагує переважно на внутрішньоклітинне закислення. Додатково зміни рН можуть модулювати фонові калієві струми через рН-чутливі K_2P -канали, зокрема TASK-2, що впливає на мембранний потенціал і збудливість сенсорних нейронів.

Таким чином, кислотна чутливість ноцицепторів має багатокомпонентний характер і визначається узгодженою дією протон-чутливих каналів та систем регуляції внутрішньоклітинного рН. За патологічного ацидозу, характерного для запалення та ішемії, порушення цих механізмів може сприяти периферичній сенситизації та гіпералгезії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати власного експериментального дослідження електричної активності первинних аферентів шкіри. Проаналізовано вплив змін температури в межах фізіологічного діапазону на активацію ноцицептивних аферентів під дією аллогенних 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 склад розчину на поверхні 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 хімічної чутливості нервових закінчень.

2. Встановлено, що температурна залежність активації шкірних ноцицепторів значною мірою визначається типом аллогенного стимулу. Відповідь на АТФ і помірне зниження рН (до 6,7) має високу температурну чутливість (коефіцієнти $Q_{10} \approx 3,0$ та $3,1$, відповідно), тоді як для підвищеної концентрації калію температурна залежність є слабкою ($Q_{10} \approx 1,84$), 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 °C 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 Na^+/H^+ 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 диміназеноу. 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⁺-обмінника 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 помірної 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 ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті у фахових виданнях:

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. Vol. 17. 1131643. URL: <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. Vol. 17. 1131661. URL: <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. Vol. 71, No 2. P. 34–39. URL: <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. No 100. P. 66–71. URL: <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. Vol. 55. P. 96–102. URL: <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).

Тези доповідей та матеріали конференцій:

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* (м. Київ, 4–8 черв. 2014 р.). Київ, 2014.
2. **Tkachenko Y. M.**, Buta A. Z., Khmyz V. V., Krishtal O. O., Maximyuk O. P. 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* (Kyiv, 25–27 July 2022). *Fiziol. Zh.* 2022. Vol. 68, No 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, 30 Oct.–2 Nov. 2023). Київ, 2023.
4. **Ткаченко Ю. М.**, Хмиз В. В., Єгорова О. В., Максимюк О. П., Ісаєв Д. С., Кришталь О. О. 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. **Ткаченко Ю. М.**, Максимюк О. П., Єгорова О. В., Ісаєв Д. С., Кришталь О. О. Методика запису активності аферентних нервових волокон шкіри миші *ex vivo* для дослідження сенсорної чутливості. *Фізіол. журн.* 2024. Т. 70, № 5 (додаток). С. 129–130.

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: $Q_{10} \approx 2,9\text{--}3,1$ (АТФ) та $Q_{10} \approx 3,0\text{--}3,3$ (рН 6,7). Водночас підвищення частоти ПД, зумовлене зміщенням мембранного потенціалу у бік деполяризації внаслідок збільшення позаклітинної концентрації K^+ , залишається слабо залежним від температури ($Q_{10} \approx 1,8\text{--}1,9$), подібно до спонтанної активності в контрольних умовах ($Q_{10} \approx 1,9\text{--}2,0$). 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 мкМ), а також селективний інгібітор NHE1 зоніпорид (0,5 мкМ) 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 мкМ не впливав на протон-індуковану генерацію ПД у відповідь на зниження рН із 7,4 до 6,1. Збільшення концентрації диміназену до 100 мкМ 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: $Q_{10} \approx$

2.9–3.1 (ATP) and $Q_{10} \approx 3.0$ –3.3 (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 ($Q_{10} \approx 1.8$ –1.9), similar to spontaneous activity under control conditions ($Q_{10} \approx 1.9$ –2.0). 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 μ M), as well as the selective NHE1 inhibitor zoniporide (0.5 μ M), 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 μ M, 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 μ M 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 ($pH \geq 6.1$) 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.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ASIC – Acid-Sensing Ion Channel (протончутливий іонний 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^+ -обмінник)
 P2X₃ – третій підтип підродини 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 транзйєтного потенціалу першого типу)
 ЦНС – центральна нервова система
 ПД – потенціал дії
 ПНС – периферична нервова система