

Введення аденоасоційованих вірусних векторів у сідничний нерв щура для оптогенетичного дослідження

Валерія УСТИМЕНКО ¹, Руслана ФИЛИМОНОВА ², Валентин ЯРИНКА ³,
Нана ВОЙТЕНКО ⁴

- 1) Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;
Приватний заклад вищої освіти “Академія Добробут”, Київ, Україна
E-mail: valusty@biph.kiev.ua
ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2241-435X>
- 2) Київський академічний університет, Київ, Україна
E-mail: r.fylymonova@kau.edu.ua
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-5528-488X>
- 3) Київський академічний університет, Київ, Україна
E-mail: v.yarynka@kau.edu.ua
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-4905-3043>
- 4) Київський академічний університет;
Приватний заклад вищої освіти “Академія Добробут”, Київ, Україна

Отримано 19 квітня 2025, у фінальній формі 7 червня 2025

<https://doi.org/10.3842/confKAU.2025.biol.03>

Анотація. Травми периферичних нервів нерідко супроводжується значними фізіологічними порушеннями або втратою функціональності кінцівки і є значною клінічною проблемою сучасності, особливо в умовах ведення бойових дій. За статистикою пошкодження периферичних нервів у цивільних пацієнтів із травмою становить близько 2,8%, а актуальні чисельні дані серед військовослужбовців відсутні. На жаль, сучасні методи встановлення морфофункціонального відновлення нервів не дають стабільних результатів та все ще потребують подальшого розвитку. У цьому дослідженні ми перевіряли ефективність введення аденоасоційованих вірусних векторів, що забезпечують експресію світлочутливого йонного каналу каналродопсину, як потенційного методу для відстеження регенераційного процесу пошкодженого периферичного нерва. Фотоактивація цих йонних каналів у відновлених периферичних рецепторах потенційно може дозволити картувати зони відновлення іннервації. Спершу було проведено оперативне втручання з ін'єкцією векторів AAV1-CAG-ChR2-mCherry під епіневральну оболонку у проксимальному кінці сідничного нерва в напрямку спинного мозку. Через п'ять тижнів після операції експресію каналродопсину в периферичних закінченнях було перевірено за допомогою стимуляції світлом довжиною хвилі 450 нм, яка викликала відсмикування оперованої кінцівки від скляної поверхні. Результати свідчать про те, що введення аденоасоційованих вірусних векторів має діагностичний потенціал у дослідженні відновлення периферичних нервів після травм.

Ключові слова: травма периферичного нерву; сідничний нерв; каналродопсин 2; аденоасоційовані вірусні вектори; іннервація; регенерація

1 Вступ

Травми периферичних нервів (ТПН) можуть мати різні причини, які можна поділити на дві основні групи — нещасні випадки або бойові травми та медичні помилки, спричинені людським фактором. Такі патологічні зміни супроводжуються порушенням сенсорних

та рухових характеристик або повною втратою функціональності кінцівки [12]. Основна проблематика ТПН наразі полягає у низькому рівні регенерації без можливості повного відновлення основних функцій, що становить значну проблему у сфері громадського здоров'я [19]. Наслідками неповного відновлення нерва є фізична слабкість, м'язова атрофія, хронічний больовий синдром та інвалідність [18, 19]. Незважаючи на новітні терапевтичні розробки та низьку статистику виявлення (від 1,5 до 3% від усіх травм), ТПН має нестабільні результати лікування [1, 22].

У дослідженнях травм нервової системи широко використовуються тваринні моделі, зокрема гризуни. Однією з найбільш поширених є щури, у яких для оцінки посттравматичної ноцицепції використовується низка стандартизованих поведінкових тестів [14]. Наприклад, тест Хагрівса спрямований на оцінку больової сенситизації шляхом термічного впливу [5]. Ще одним поведінковим тестом, що спрямований на перевірку ноцицепції, є сенсорний тест фон Фрея, який дозволяє оцінити механічну чутливість кінцівки до стимулів різної сили [23].

Водночас дослідження функціональної регенерації привернули значну увагу через відсутність оптимального підходу до її оцінки. Це спричинило пошук нового шляху для чіткого визначення схеми іннервації окремих шкірних зон кінцівок різними периферичними нервами та уникнення нечіткої оцінки стану через ділянки перекриття [11]. Для створення оптимального підходу досліджується можливість застосування оптогенетичних методик для оцінки ступеня та швидкості морфофункціонального відновлення нерву після травми [21]. Загалом, оптогенетика — це методика, яка ґрунтується на введенні в клітини світлочутливих білків, таких як каналродопсин 2 (channelrhodopsin 2, ChR2) [10]. ChR2 є світлозалежним йонним каналом. Внаслідок дії світла з довжиною хвилі в межах 463–590 нм ChR2 активується, та змінює свою конформацію таким чином, що це спричиняє відкриття йонної пори [10, 16]. ChR2 є неселективним, а тому пропускає йони за градієнтом концентрації, та сприяє надходженню катіонів всередину клітини [16]. Коли ChR2 локалізується в мембранах нейронів, його активація викликає деполяризацію мембрани, що може призвести до генерації потенціалу дії.

Для доставки генетичного матеріалу в цільові клітини використовуються вірусні вектори, зокрема аденоасоційовані (adeno-associated virus, AAV) [21]. Вони модифіковані для мінімізації токсичності та патогенності, а їхня безпека досягається шляхом видалення генів, необхідних для реплікації генетичного матеріалу та синтезу капсидних білків, що робить вектори нездатними для автономного розмноження [20]. Окрім цього, AAV навіть у немодифікованому стані не здатні до самостійної реплікації, адже для цього їм потрібна експресія додаткових генів, яка в природі досягається у випадку супутнього зараження адено- або герпесвірусами, що збільшує їхній профіль безпеки [13].

Специфічність трансдукції AAV залежить від серотипу. Вона обумовлена різницею у структурі капсидів, що дає їм можливість зв'язуватися з різними типами рецепторів на поверхні клітин, за рахунок чого такі вектори можна використовувати для трансдукції генетичного матеріалу в різні типи клітин організму *in vivo* [17]. Зокрема AAV вектори 1-го серотипу (AAV1) характеризуються високою ефективністю при використанні для трансдукції периферичних нейронів, гліальних та м'язових клітин [3]. Введення даного типу векторів шляхом субепіневральної ін'єкції має забезпечити таргетовану експресію цільового білка у нервовій тканині.

Продуктом гену, що переноситься обраним вектором, був ChR2 злитий з флуоресцентним білком mCherry. Коекспресія ChR2 з mCherry потенційно забезпечить як контроль активності нейронів шляхом оптогенетичної стимуляції ChR2 для підтвердження відновлення іннервації після травми периферичного нерва, так і дозволить візуалізувати шляхи реіннервації трансдукованих нейронів за допомогою флуоресценції mCherry, що критично важливо для оцінки регенерації після травми.

2 Матеріали та методи

Об'єкт дослідження

В експериментах використовували 3 щурів-самців лінії Wistar, масою 240–280 грам, віком два місяці. Тварини були утримані у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за стандартних умов у клітках по 1–3 особини, за температури 20–23 °C та режимом освітлення 12:12 годин день/ніч зі світлом з 9:00. Усі маніпуляції з тваринами проводились згідно з положеннями Європейської конвенції із захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006) та Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах (2012).

Проведення субепіневральних ін'єкцій

Для проведення субепіневральних ін'єкцій використовували 2 мМ розчин флуоресцеїну в 0,9% NaCl (Юрія-Фарм, Україна) та аденоасоційовані вірусні вектори AAV1-CAG-hChR2 (H134R)-mCherry-WPRE.SV40 (Addgene, 100054-AAV1). Шприц (Hamilton, 7635-01) заповнювали вазеліновою олією, фіксували голку та під'єднували попередньо заповнену вазеліновою олією магістраль (Intramedic, 427406). Систему фіксували на мікроманіпуляторі (Starrett, 262M) та дозаповнювали вільний об'єм розчином аденовірусних векторів, змішаним з попередньо заготовленою аліквоти флуоресцеїну, після чого надягали голку (World Precision Instruments, NF33BV).

Тварину анестезували 3% ізофлураном зі швидкістю подачі 1,5 л/хв, після чого переносили на підігрівачий килимок із підтримкою температури на рівні 35 °C з продовженням подачі ізофлурану у концентрації від 1,5 до 2,5%, постійно слідкуючи за диханням та загальним станом тварини. Ліве стегно голили та обробляли 10% розчином Бетадину (EGIS, Угорщина) перед наступними діями, які виконувались з використанням стереомікроскопа зі збільшенням 8x (Olympus, SZX7). Скальпелем розрізали шкіру та розводили м'язи за допомогою ретрактора. Після візуалізації сідничного нерва та відділення його від навколишніх тканин проводили ін'єкцію під епіневральну оболонку у проксимальному кінці в напрямку до спинного мозку. Вводили 2 мкл розчину вірусних векторів та флуоресцеїну зі швидкістю подачі 1 мкл/хв, після чого утримували голку у точці ін'єкції впродовж 5 хвилин. Для перевірки поширення розчину іпсилатеральним нервом за допомогою ультрафіолетового випромінювання у темній кімнаті.

За допомогою атраumaticьної голки та шовного матеріалу розміром 2/0 накладали по 2–4 вузлові шви на м'язи та шкіру. Після зшивання проводили повторну обробку 10% розчином Бетадину. У контрлатеральну кінцівку підшкірно вводили антибіотик Біцилін-5 (150 тис. одиниць; Київмедпрепарат, Україна) та протизапальний та імуносупресивний засіб дексаметазону (2 мг/мл; KRKA, Словенія). Після проведення оперативного втручання тварину впродовж 5 хвилин залишали під наглядом на термокилимку для відходу від анестезії. Після цього тварина перебувала ще 10 хвилин у чистому контейнері для повного виходу з анестезованого стану. Наприкінці тварину повертали до клітки з постійним доступом до їжі та води.

Тестування тварин на термічну чутливість методом Хаґрівса

Для кількісного визначення термічного порогу за 30–40 хвилин до початку тестування для звикання тварин розміщували в камері з прозорим дном з органічного скла, що розсіює інфрачервоне випромінювання [9]. Під час тесту впевнювалися, що щур перебуває у стані неспання і не під час грумінгу. Сенсор із джерелом випромінювання (Ugo Basile, 37370UB) направляли на підшовну поверхню задньої кінцівки. Інтенсивність теплового стимулу була

встановлена на 70 одиниць. Тестування проводили на контрольній та оперованій задній кінцівці по 5 разів з інтервалом від 3 до 5 хвилин. Латентний період реакції фіксувався приладом автоматично. Поведінкове тестування проводили щотижня з моменту проведення операції.

Тестування тварин на механічну чутливість методом фон Фрея

Для оцінки механічної чутливості тварин розміщували окремо у клітки з сітчастим дном з попереднім звиканням впродовж 30 хвилин до початку тестування. Для уникнення хибнонегативної відповіді на подразник контролювали, що щур перебуває у стані неспання і не в процесі грумінгу. Для тестування використовували набір каліброваних монофіламентів Touch-Test (Stoelting, 58011), які підводили до підшовної поверхні задньої лапи під прямим кутом до моменту згинання, прикладаючи визначену силу протягом 2 секунд. У тесті використовували методику “up-down”, починаючи з філаменту 26 грамів, який був обраний завчасно як визначений середній поріг для щурів [4, 8]. Прикладання монофіламенту проводили з латерального боку стопи задньої кінцівки [6]. За позитивної реакції (відсмикування лапи, облизування, вокалізація під час подразнення або відразу після) використовували філамент з меншою жорсткістю, за негативної — з більшою. Після першої зміни реакцій (позитивна змінилась на негативну, або навпаки) тест тривав до реєстрації 4 послідовних відповідей. Проводили мінімум 6 вимірювань для оптимального розрахунку значення, при якому в 50% випадків піддослідна тварина реагує на подразник, використовуючи модифіковану формулу LD50 [2, 7]. Поведінкове тестування проводили щотижня з моменту проведення операції.

Оптогенетичне тестування тварин

Тварин поміщали в контрольоване середовище для тестування для акліматизації перед тестом на 15–30 хвилин. Кінчик оптоволокна (200 нм, $NA = 0,22$), під'єданого до лазерного діодного волоконного світловоду (Doric, LDFLS 450/07–520/060), розміщували поруч з задньою кінцівкою, що досліджувалася під час експерименту. Стимуляція здійснювалася за довжини світла 450 нм та за виставленої інтенсивності від 60 до 110 мА (у шкалі приладу; інтенсивність світла була в діапазоні 50–120 мВт) з кроком 5 мА. Міжстимульний інтервал становив не менше однієї хвилини. Для уникнення помилкової інтерпретації через термічний вплив замість оптичної активації максимальна тривалість стимулу складала одну секунду. Контроль за тривалістю стимулу здійснювався з використанням TTL мікроконтролера (<https://github.com/Belan-Lab/TTL-trigger-timer>). У разі відсутності реакції інтенсивність збільшували до наступного рівня. Якщо реакція спостерігалася, лазер завчасно деактивували та повторювали тестування ще чотири рази. У випадку відсутності реакції у щонайменше 50% випадків, інтенсивність збільшували з кроком в 5 мА.

Статистична обробка даних

Статистичний аналіз результатів поведінкових тестів проводився з використанням мови програмування R та інтегрованого середовища програмування RStudio. Аналіз проводили з урахуванням фактора часу, експериментальної групи та кінцівки тварини (оперована, L або контрлатеральна, R). Для перевірки нормальності розподілу даних використовували тест Шапіро–Вілка. Дані в усіх групах були розподілені нормально ($p > 0,05$), проте, зважаючи на величину вибірки ($n = 3$) надалі використовували непараметричні методи для уникнення помилки I роду. Для оцінки статистичних відмінностей між групами та кінцівками тварини (оперована, L або контрлатеральна, R) використовували непараметричний тест Вілкоксона; різницю вважали значущою за $p < 0,05$.

Кореляційний аналіз проводили з використанням методу Спірмена. Силу кореляції визначали наступним чином: дуже слабка кореляція — 0,00–0,19; слабка кореляція — 0,20–0,39; помірна кореляція — 0,40–0,59; сильна кореляція — 0,60–0,79; дуже сильна кореляція — 0,80–1,00.

3 Результати дослідження

На етапі відлагодження методу було перевірено успішність проведення ін'єкцій та дослідження поширення вірусного вектору під зовнішньою оболонкою нерва (епіневрієм). Візуалізація розподілу вектору була проведена за допомогою додавання флуоресцеїну до аліквоти AAV вектору. Було виявлено, що розчин широко поширюється під епіневральною оболонкою нерва не тільки в напрямку введення вірусу (проксимальному, до спинного мозку), але й у протилежному (дистальному) напрямку (рис. 1 (А)).

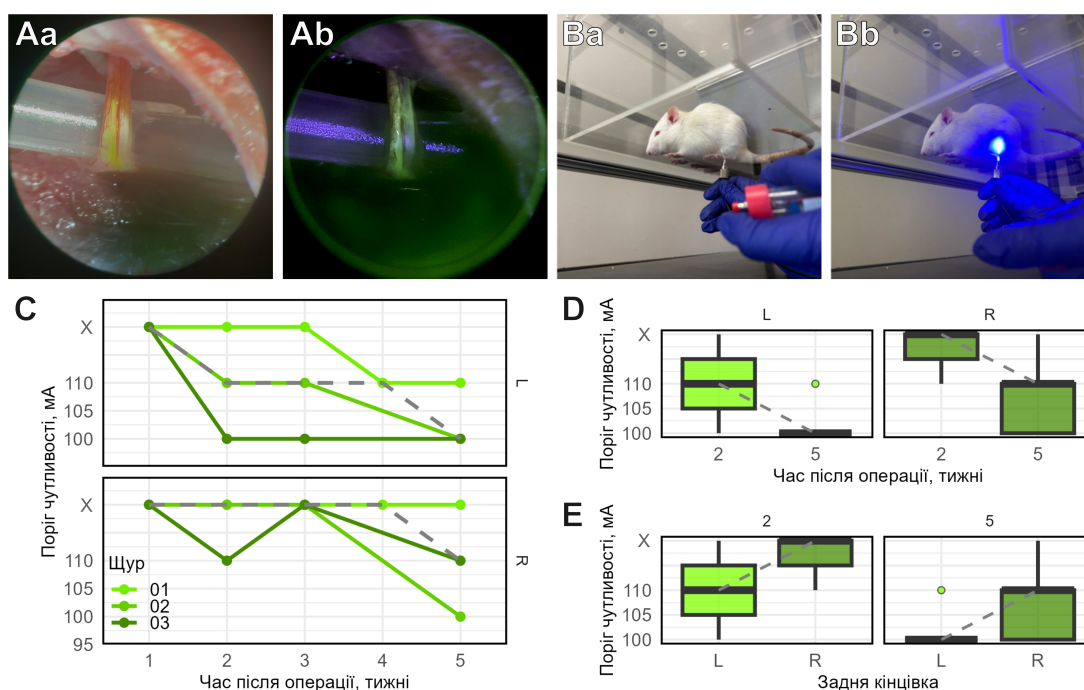


Рис. 1. Зміни чутливості кінцівок піддослідних тварин до світла з довжиною хвилі 450 нм після ін'єкції AAV вектора в нерв. (А) Візуалізація поширення розчину 2 мМ флуоресцеїну після субепіневральної ін'єкції в сідничний нерв щура. (Аа) За видимого світла. (Аб) За УФ-випромінювання. (В) Проведення оптогенетичного тестування у щурів. (Ва) Підведення оптоволоконка до задньої кінцівки щура. (Вб) Стимуляція кінцівки світлом з довжиною хвилі 450 нм. (С) Зміни порогу чутливості (мА) до світлового стимулу досліджуваних тварин ($n = 3$) в прооперованій та контралатеральній кінцівках впродовж експерименту. (D) Порівняння порогу чутливості (мА) до світлового стимулу прооперованої лівої та контралатеральної правої кінцівок на початку (2-й тиждень) та в кінці (5 тиждень) експерименту ($n = 3$). (E) Порівняння порогу чутливості (мА) до світлового стимулу на початку (2 тиждень) та в кінці (5-й тиждень) експерименту для прооперованої лівої та контралатеральної правої кінцівок. L — прооперована ліва кінцівка; R — контралатеральна права кінцівка; X — відсутність реакції; сіра пунктирна лінія — медіана.

Для підтвердження експресії ChR2 нами було перевірено реакцію тварини на оптогенетичну стимуляцію у різні часові проміжки після операції. Для цього щура розміщали на скляній платформі та підводили оптичне волокно під нижню поверхню його стопи (рис. 1 (Ba)),

контролюючи, що тварина перебуває у стані спокою. Далі проводили стимуляцію світлом із довжиною хвилі 450 нм впродовж 1 секунди за різних інтенсивностей (рис. 1 (Bb)). У результаті було виявлено, що показники оптогенетичного дослідження на обох кінцівках піддослідних тварин мають відмінні результати за реакцією залежно від інтенсивності стимуляції (рис. 1 (C)). Тим не менш, спостерігалася загальна тенденція до поступового зниження порогових значень, що може свідчити про підвищення чутливості до світлового стимулу, спричинене поступовою експресією ChR2 та його вбудовуванням в мембрани аксонів.

Додатково порівнювали пороги чутливості між другим тижнем після операції, коли вперше спостерігалася реакція у щурів, та фінальним, п'ятим, тижнем для прооперованої лівої та контрлатеральної правої кінцівок (рис. 1 (D–E)). Для оперованої кінцівки реакція в більшості випадків спостерігалася вперше на другий післяопераційний тиждень за стимуляції за інтенсивності 110 мА за шкалою приладу і на п'ятий тиждень проявлялась за інтенсивності 100 мА, різниця не є статистично значимою ($p > 0,05$, $n = 3$). Водночас у більшості випадків права контрлатеральна кінцівка демонструвала несуттєві зміни порогового значення та реакцію за 110 мА лише на п'ятий тиждень, різниця також не є статистично значимою ($p > 0,05$, $n = 3$). Отже, статистично значущих змін порогів чутливості між другим та п'ятим тижнями після операції як для оперованої, так і для контрлатеральної кінцівки щурів, немає.

З метою валідації розробленої методики для обстеження сенсорної функції тварин також було проведено поведінкові тести для дослідження термічної чутливості методом Хагрівса (рис. 2 (A)). Спочатку проводили порівняння значень порогів теплової чутливості для оперованої лівої та контрлатеральної правої кінцівок на другому та п'ятому тижнях (рис. 2 (A)). Було виявлено, що для оперованої кінцівки на другому тижні медіанне значення порогу становило 15,0 [12,1; 17,9] секунд, до п'ятого тижня воно знизилось до 12,7 [12,0; 17,8] секунд, різниця не є статистично значимою ($p > 0,05$) (рис. 2 (Aa)). Для контрлатеральної кінцівки на другому тижні поріг був на рівні 13,7 [11,7; 17,1] секунд і до п'ятого тижня незначно ($p > 0,05$) знизився до 12,7 [12,3; 14,4] секунд. Порівняння значень порогу для лівої та правої кінцівок в різних часових точках показало відсутність значущої різниці впродовж всього періоду тестування ($p > 0,05$) (рис. 2 (Ab)). Ці результати вказують на відсутність значних змін чутливості тварини до теплових стимулів як для оперованої, так і для контрлатеральної кінцівки протягом всього періоду дослідження, та свідчать про те, що операційне втручання не призвело до розвитку патологічних змін та супутньої гіпералгезії, яка могла вплинути на результати оптогенетичного тестування.

Для оцінки впливу оперативного втручання на функціональний стан кінцівки використано тест фон Фрея (рис. 2 (B)). Було визначено, що медіанне значення порогу тактильної чутливості для лівої кінцівки на другому тижні експерименту становило 24,4 [22,1; 27,7] грама і на п'ятому тижні було на рівні 22,8 [14,3; 31,1] грама, проте ця різниця є статистично незначимою ($p > 0,05$, $n = 3$) (рис. 2 (Ba)). Для контрлатеральної кінцівки даний показник досягав 30,9 [27,7; 35,2] грама на другому тижні і на п'ятому фіксувався на рівні 21,21 [16,4; 26,0] грама ($p > 0,05$, $n = 3$). Як і в випадку з тестом Хагрівса, порівняння значень порогу для лівої та правої кінцівок в різних часових точках (рис. 2 (Bb)) не вказало на наявність значимої різниці впродовж усього терміну тестування ($p > 0,05$, $n = 3$).

Додатково було досліджено можливі кореляції між нормалізованими результатами оптогенетичного (О) тесту з тестами Хагрівса (оцінка термочутливості, ТЧ) і фон Фрея (оцінка механочутливості, МЧ) (рис. 2 (C)). Результати тесту Хагрівса демонструють розбіжності з іншими методами, що вказує на оцінку відмінних сенсорних механізмів. Одночасно спостерігалася схожість динаміки між оптогенетичним тестом та тестом фон Фрея для обох кінцівок.

Для підтвердження цих спостережень було додатково застосовано кореляційний аналіз методом Спірмена (рис. 2 (D)). Виявили помірну позитивну кореляцію ($r = 0,53$) між результатами оптичної та механічної стимуляції прооперованої кінцівки (рис. 2 (Da)). Це може

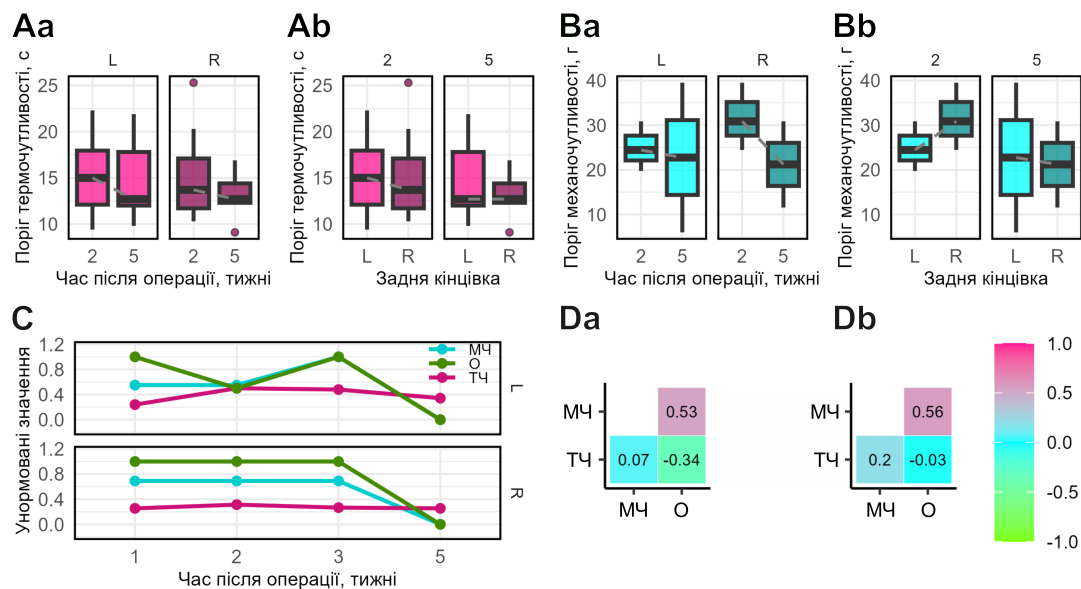


Рис. 2. Порівняння змін чутливості кінцівок піддослідних тварин з другого по п'ятий тиждень після ін'єкції. (А) Порівняння порогу чутливості до термічного стимулу за результатами тесту Хагрівса ($n = 3$). (Аа) Зміни порогу термочутливості на початку (2 тиждень) та в кінці (5 тиждень) експерименту між прооперованою лівою та контрлатеральною правою кінцівками. (Аб) Поріг термочутливості для прооперованої лівої та контрлатеральної правої кінцівок на початку (2 тиждень) та в кінці (5 тиждень). (В) Порівняння порогу чутливості до механічного стимулу за результатами тесту фон Фрея ($n = 3$). (Ва) Зміни порогу механочутливості на початку (2 тиждень) та в кінці (5 тиждень) експерименту між прооперованою лівою та контрлатеральною правою кінцівками. (Вб) Поріг механочутливості для прооперованої лівої та контрлатеральної правої кінцівок на початку (2 тиждень) та в кінці (5 тиждень). (С) Зведене порівняння порогів чутливості за оптогенетичним тестуванням, тестами фон Фрея та Хагрівса. (D) Кореляційні матриці взаємозв'язку між показниками механочутливості, термочутливості та оптогенетичних досліджень. L — прооперована ліва кінцівка; R — контрлатеральна права кінцівка; МЧ — поріг механочутливості; О — поріг чутливості до оптичного стимулу; ТЧ — поріг термочутливості; сіра пунктирна лінія — медіана.

свідчити про активацію однакових типів ноцицепторів у відповідь на різні стимули, проте відсутність статистичної значущості ($p > 0,05$) не дозволяє робити впевнені висновки щодо цього. Водночас кореляція між результатами тестів Хагрівса та фон Фрея є дуже слабкою ($r = 0,07$, $p > 0,05$), що підтверджує незалежність механізмів термо- та механочутливості. Для оптичного тесту та тесту Хагрівса кореляція була слабко негативною ($r = -0,34$, $p > 0,05$).

Результати тестування контрлатеральної кінцівки схожі: спостерігалася помірна позитивна кореляція ($r = 0,56$, $p > 0,05$) між результатами оптогенетичного тесту та фон Фрея для прооперованої кінцівки, та дуже слабка кореляція за порівняння результатів тестів Хагрівса та фон Фрея ($r = 0,02$, $p > 0,05$) (рис. 2 (Db)). Єдина суттєва відмінність відзначалась у порівнянні результатів оптогенетичного підходу та тесту Хагрівса: було виявлено дуже слабку негативну кореляцію ($r = -0,03$, $p > 0,05$) тоді як для лівої кінцівки цей показник був слабко негативним ($r = -0,34$, $p > 0,05$), що може бути пов'язано з експресією та подальшою активацією ChR2, але це потребує додаткових досліджень через відсутність статистичної значимості. Таким чином, отримані результати свідчать про наявність часткових кореляційних зв'язків між різними типами ноцицептивних стимуляцій, проте відсутність статистичної значущості ($p > 0,05$) усіх виявлених коефіцієнтів не дозволяє робити кате-

горичні висновки щодо спільних механізмів активації та потребує дослідження на більшій вибірці.

4 Висновки

Під час проведення дослідження було розроблено методику для проведення субепіневральних ін'єкцій в проксимальну частину периферичного нерва. Такий спосіб ін'єктування AAV векторів сприяє їх ефективному поширенню уздовж нерва під епіневрієм як у проксимальному, так і дистальному напрямках з мінімізацією супутнього пошкодження.

Водночас поведінкові тести, що спрямовані на виявлення термічної та механічної чутливості, демонструють відсутність статистично значимої різниці між оперованою та контрлатеральною кінцівками, що вказує на відсутність розвитку патологічних змін після хірургічного втручання. Помірна кореляція між результатами оптогенетичного тесту та тесту фон Фрея на обох кінцівках може вказувати на активацію однакових типів ноцицепторів у відповідь на різні стимули, проте відсутність статистичної значущості цих кореляцій не дозволяє робити остаточних висновків щодо співіннервації — для підтвердження необхідні додаткові дослідження з розширеною вибіркою та альтернативними методами оцінки.

Також було підібрано умови для проведення сенсорного тесту для таргетованого дослідження сідничного нерва, який у перспективі може бути використано для оцінки відновлення нерва після травми. Оптогенетичне дослідження виявило гетерогенні реакції на стимули залежно від їхньої інтенсивності, проте має загальну тенденцію до зниження порогів чутливості, що відповідає поступовій експресії та вбудовуванню ChR2 в мембранах сенсорних нейронів, досягаючи свого максимуму на п'ятий тиждень після ін'єкції.

Таким чином запропонований підхід із використанням AAV-векторів та оптогенетичної стимуляції демонструє потенціал як інструмент для діагностики та моніторингу регенераційних процесів у периферичній нервовій системі. Цей метод може слугувати основою для розробки нових діагностичних та оцінки нових терапевтичних підходів.

Подяки

Щиро вдячні керівнику відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця Павлу Білану та інженеру Борису Оліфірову за їхній внесок у розробку дизайну експерименту.

Фінансування

Дослідження було здійснено за підтримки гранту Національного фонду досліджень України (проект № 2021.01/0328), наданого Нані Войтенко.

Список використаних джерел

- [1] Althagafi A., Nadi M., Acute nerve injury, in *StatPearls*, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023.
- [2] Bonin R.P., Bories C., De Koninck Y., [A simplified up-down method \(SUDO\) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments](#), *Mol. Pain* **10** (2014), 26.
- [3] O'Carroll S.J., Cook W.H., Young D., [AAV targeting of glial cell types in the central and peripheral nervous system and relevance to human gene therapy](#), *Front. Mol. Neurosci.* **13** (2021), 618020.
- [4] Chaplan S.R., Bach F.W., Pogrel J.W., Chung J.M., Yaksh T.L., [Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw](#), *J. Neurosci. Methods* **53** (1994), 55–63.
- [5] Cheah M., Fawcett J.W., Andrews M.R., [Assessment of thermal pain sensation in rats and mice using the Hargreaves test](#), *Bio-Protocol*. **7** (2017), no. 16, e2506, 2017.

- [6] Cobianchi S., de Cruz J., Navarro X., [Assessment of sensory thresholds and nociceptive fiber growth after sciatic nerve injury reveals the differential contribution of collateral reinnervation and nerve regeneration to neuropathic pain](#), *Exp. Neurol.* **255** (2014), 1–11.
- [7] Deuis J.R., Dvorakova L.S., Vetter I., [Methods used to evaluate pain behaviors in rodents](#), *Front. Mol. Neurosci.* **10** (2017), 284.
- [8] Dixon W.J., [Efficient analysis of experimental observations](#), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20** (1980), 441–462.
- [9] Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., Joris J., [A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia](#), *Pain* **32** (1988), no. 1, 77–88.
- [10] Hegemann P., Nagel G., [From channelrhodopsins to optogenetics](#), *EMBO Mol. Med.* **5** (2013), no. 2, 173–176.
- [11] Kambiz S., Baas M., Duraku L.S., Kerver A.L., Koning A.H., Walbeehm E.T., Ruigrok T.J., [Innervation mapping of the hind paw of the rat using Evans Blue extravasation, optical surface mapping, and CASAM](#), *J. Neurosci. Methods* **229** (2014), 15–27.
- [12] Lopes B., Sousa P., Alvites R. et al., [Peripheral nerve injury treatments and advances: One health perspective](#), *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2022), no. 2, 918.
- [13] Penaud-Budloo M., François A., Clément N., Ayuso E., [Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production](#), *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **8** (2018), 166–180.
- [14] Rayner M.L.D., Brown H.L., Wilcox M., Phillips J.B., Quick T.J., [Quantifying regeneration in patients following peripheral nerve injury](#), *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* **73** (2020), 201–208.
- [15] Ronchi G., Fregnan F., Muratori L., Gambarotta G., Raimondo S., [Morphological methods to evaluate peripheral nerve fiber regeneration: A comprehensive review](#), *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023), no. 3, 1818.
- [16] Schneider F., Grimm C., Hegemann P., [Biophysics of channelrhodopsin](#), *Ann. Rev. Biophys.* **44** (2015), 167–186.
- [17] Srivastava A., [In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors](#), *Curr. Opin. Virol.* **21** (2016), 75–80.
- [18] Wang M.L., Rivlin M., Graham J.G., Beredjiklian P.K., [Peripheral nerve injury, scarring, and recovery](#), *Connect. Tissue Res.* **60** (2019), 3–9.
- [19] Wojtkiewicz D.M., Saunders J., Domeshek L., Novak C.B., Kaskutas V., Mackinnon S.E., [Social impact of peripheral nerve injuries](#), *HAND* **10** (2015), no. 2, 161–167.
- [20] Xia K., Liu S., Wu Z., Jiang J.H., [Research status and applications of adeno-associated virus](#), *Chembiochem.*, to appear.
- [21] Xu X., Mee T., Jia X., [New era of optogenetics: from the central to peripheral nervous system](#), *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **55** (2020), no. 1, 1–16.
- [22] Yegiyants S., Dayicioglu D., Kardashian G., Panthaki Z., [Traumatic peripheral nerve injury: A wartime review](#), *J. Craniofac. Surg.* **21** (2010), no. 4, 998–1001.
- [23] Zumbusch A.S., McEachern E.L.F., Morgan O.B., Nickner E., Mogil J.S., [Normative preclinical algesimetry 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.* **25** (2024), no. 7, 104468.

Introduction of adeno-associated viral vectors into the rat sciatic nerve for further optogenetic study

Valeriia USTYMENKO ¹, Ruslana FYLYMONOVA ², Valentyn YARYNKA ³,
Nana VOITENKO ⁴

¹) *Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine;
Dobrobut Academy Medical School, Kyiv, Ukraine*
E-mail: valusty@biph.kiev.ua
ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2241-435X>

²) *Kyiv Academic University, Kyiv, Ukraine*
E-mail: r.fylymonova@kau.edu.ua
ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-5528-488X>

³) *Kyiv Academic University, Kyiv, Ukraine*
E-mail: v.yarynka@kau.edu.ua
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-4905-3043>

⁴) *Kyiv Academic University; Dobrobut Academy Medical School, Kyiv, Ukraine*

Received April 19, 2025, in the final form June 7, 2025

<https://doi.org/10.3842/confKAU.2025.biol.03>

Abstract. Peripheral nerve injuries are a significant clinical problem of our time, especially in the context of wartime, which is often accompanied by significant physiological disorders or loss of limb functionality. According to statistical data, peripheral nerve injury in civilian patients with trauma is about 2.8%, and there are no relevant data regarding military personnel. Unfortunately, the current conventional morphological and functional nerve repair approaches do not provide stable results and still require further improvement. In this study, we assessed the efficacy of introducing adeno-associated viral vectors that provide expression of the light-sensitive ion channel channelrhodopsin as a potential method for monitoring the regeneration process of the damaged peripheral nerve. The photoactivation of such ion channels in the recovered peripheral nerves could potentially allow the mapping of the areas of innervation recovery. First, we performed surgery with the injection of AAV1-CAG-ChR2-mCherry vectors under the epineural membrane at the proximal end of the sciatic nerve towards the spinal cord. Five weeks after surgery, the expression of channelrhodopsin in the peripheral terminals was tested by stimulation with 450 nm light, resulting in the withdrawal of the operated limb from the glass surface. The results showed that the injection of adeno-associated viral vectors has diagnostic potential in the field of peripheral nerve injury.

Keywords: peripheral nerve injury; sciatic nerve; channelrhodopsin 2; adeno-associated viral vectors; innervation; regeneration