

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

Кваліфікаційна наукова праця на  
правах рукопису

**РОМАНОВ Артур Костянтинович**

УДК 612.82:576.54:577.3

**РОЛЬ ПРОТОН-ЧУТЛИВИХ ІОННИХ КАНАЛІВ У МОДУЛЯЦІЇ  
АКТИВНОСТІ НЕЙРОННИХ МЕРЕЖ ГІПОКАМПА ЩУРІВ У  
НОРМІ ТА ЗА УМОВ ПАТОЛОГІЧНОЇ СИНХРОНІЗАЦІЇ**

Спеціальність 03.00.02 Біофізика

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 \_\_\_\_\_ Романов А.К.

**Науковий керівник**

Академік НАН України Кришталь Олег Олександрович

**Київ 2020**

**Анотація**

**Романов А.К. Роль протон-чутливих іонних каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів у нормі та за умов патологічної синхронізації. – Рукопис**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженню ролі протон-чутливих іонних каналів (ASIC) у модуляції нейронних мереж гіпокампа щурів в фізіологічних умовах та в умовах викликаної епілептиформної активності мереж гіпокампа.

Епілептичні напади присутні у симптоматиці більше ніж 40 відомих хвороб, що в свою чергу в залежності від характеру нападу та осередку епілептичного фокусу в головному мозку може мати різноманітні наслідки для хворого. Нажаль, на сьогодні антиепілептичні препарати мають значний спектр протипоказань та побічних ефектів, що визначає пошук нових фармакологічних мішеней щодо лікування епілепсії як один з найперспективніших напрямів сучасних досліджень.

Незважаючи на поширеність епілепсії, у більшості випадків доволі важко діагностувати причини її появи та розвитку. За статистичними даними, у близько 70% випадків пацієнту діагностують ідіопатичну епілепсію. Вважається, що найчастіше епілепсія виникає внаслідок генетичних причин або розвивається як наслідок інших захворювань або фізичного чи функціонального ушкодження цілісності головного мозку: наприклад, як наслідок черепно-мозкової травми, розвитку пухлин, ішемічного ушкодження, тощо. Одиначний випадок епілептичних нападів,

який було спровоковано зовнішніми чинниками, не є показанням до діагностування епілепсії, але в той ж час навіть одиничний епілептичний напад може призвести до незворотних патологічних змін, які можуть провокувати патогенез епілепсії.

Суттєвим викликом до сучасної науки є також і те, що ефективне фармакологічне лікування епілептичного синдрому часто є ускладненим або навіть неможливим. Існуючі протиепілептичні препарати часто мають суттєві протипоказання та побічні ефекти, з огляду на які, наприклад, може бути неможливим їх використання для дітей. Частими є випадки фармакорезистентної епілепсії (30-40%).

Літературні джерела демонструють, що велика кількість неврологічних захворювань супроводжується закисненням зовнішньоклітинного середовища, що в свою чергу призводить до активації ASIC каналів. Показано участь цих каналів у патогенезі багатьох нейродегенеративних захворювань., наприклад, уже було запропоновано використання блокади ASIC1a для мієлопротекції при розсіяному склерозі та нейропротекції при енцефаломієліті.

Тому актуальним постає дослідження ASIC1a каналів в якості фармакологічної мішені для лікування епілептичних розладів. Розуміння ролі цих каналів у фізіологічних та патологічних процесах, що супроводжують патогенез та перебіг епілепсії будуть слугувати неоціненним джерелом можливостей для створення інноваційних антиепілептичних препаратів.

Для багатьох моделей неврологічних захворювань було показано участь ASIC каналів у їх патогенезі. Наприклад для експериментальної моделі аутоімунного енцефаломієліта з використанням мишей, нокаутних за геном, що кодує експресію ASIC1a, було продемонстровано, зниження рівня аксональної дегенерації у порівнянні з контролем без нокауту. Таким

чином ASIC1a чинять суттєвий внесок у сприйняття ушкоджуючих стимулів. Схожий ефект було продемонстровано з використанням моделей гострого болю: фармакологічна блокада ASIC1 амілоридом мала нейропротекторний ефект, захищаючи як мієлін, так і власне нейрони. Було запропоновано гіпотетичне використання блокаторів ASIC1a для нейро- та мієлопротекції при розсіяному склерозі.

Було зроблено висновок, що ASIC1a відіграють роль у процесах аксональної нейродегенерації та є перспективною мішенню для розробки фармакологічних засобів для лікування неврологічних захворювань, але в той же час безпосередня роль ASIC1a у їх патогенезі залишається значною мірою невивченою.

Метою роботи було визначення ролі ASIC1a каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів з використанням таких методик, як електрофізіологічна реєстрація у зрізах гіпокампа з використанням методик петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» та селлатгач, реєстрація потенціалів дії та електрофізіологічна реєстрація польових потенціалів нейронів гіпокампа.

Вивчення ролі ASIC1a каналів у модуляції епілептиформної активності дає змогу зрозуміти механізми розвитку і поширення нападів у структурах гіпокампа як одного з головних фокусів епілептичної активності. Це дослідження дає більш глибоке розуміння клітинних механізмів роботи ASIC каналів під час епілептичних нападів, підтверджуючи їх роль в системі синаптичної провідності.

Практична цінність роботи полягає у встановленні впливу ASIC каналів на генерацію спонтанної синапатичної активності у пірамідних нейронах гіпокампа. Цей факт має обов'язково враховуватися при розробці нових стратегій та прийомів у роботі з патологічними процесами, які пов'язані зі змінами рівня зовнішньоклітинного рН. Також, встановлення

ролі ASIC у проепілептичних системах може бути використано у розробці протиепілептичних препаратів.

В роботі вперше досліджено вплив блокування ASIC каналів у епілептичних моделях гіпокампа з використанням новітнього селективного блокатора ASIC1a каналів 5b. Робота починається з визначення оптимальних умов перфузування та карбогенації зрізів мозку, що є критично важливим для проведення достовірних досліджень. Показано, що зміна швидкості перфузії та рівня оксигенації зрізів модифікує потужність викликаної епілептиформної активності. Вперше показано функціональні відмінності розвитку епілептиформної активності в вентральній та дорзальній частинах гіпокампа. У роботі вперше продемонстровано, що блокада ASIC1a в умовах низько-магнієвої та 4-ар моделей індукції епілептиформної активності призводить до зниження частотних характеристик епілептиформної активності та знижує частоту спонтанної генерації потенціалів дії у гіпокампі. Також було досліджено можливі механізми, які опосередковують вищеназвані зміни.

У роботі вперше було продемонстровано, що вилучення ASIC каналів з каскаду синаптичної провідності не має впливу на збуджуючу синаптичну активність, в той же час достовірно підвищуючи частотні характеристики гальмівної активності, таким чином зміщення балансу між гальмуванням та збудженням внаслідок блокади ASIC1a призводить до зменшення загальної збудливості та має протиепілептичний ефект.

Підсумовуючи отримані результати, можна сказати, що дана робота підтверджує ідею пресинаптичного впливу ASIC каналів на ймовірність активації ГАМК рецепторів, з огляду на те, що блокада ASIC1a не впливає на амплітудні характеристики збуджуючих постсинаптичних струмів.

Використовуючи новітній селективний блокатор ASIC1a, у роботі продемонстровано роль цих каналів у регуляції гальмівної синаптичної активності у ЦНС та їх важливість як мішені для майбутніх протиепілептичних препаратів.

**Ключові слова:** гіпокамп, епілептиформна активність, протон-чутливі іонні канали, ASIC, спонтанна гальмівна активність, спонтанна збуджуюча активність, синаптична провідність

## Summary

**Romanov A.K. The role of acid-sensitive ion channels in the rat hippocampus neural networks' activity modulation under normal conditions and in pathological synchronization – Manuscript.**

The dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty – 03.00.02 – Biophysics – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of the role of acid-sensitive ion channels (ASIC) in the modulation of rat hippocampal neural networks in physiological conditions and while generating the epileptiform activity.

The epileptic seizures are present in symptomatology more than 40 known diseases, and depending on the epileptic focus it can lead to the different impairments. Unfortunately, antiepileptic drugs by itself also can provoke a spectrum of side-effects. So finding the new pharmacological approaches for epilepsy treatment becomes one of the most promising areas of modern research. Despite the prevalence of epilepsy, in most cases, it is difficult to diagnose the causes of its occurrence and development. According to statistics, about 70% of cases are diagnosed with idiopathic epilepsy. It is known that often epilepsy occurs due to genetic causes or develops as a comorbidity of other diseases, and physical or functional damage to the integrity of the brain: for example, as a result of

traumatic brain injury, tumor development, ischemic injury, and so on. A single case of epileptic seizures, which was provoked by external factors, is not an indication for the diagnosis of epilepsy, but, at the same time, even a single epileptic seizure can lead to irreversible pathological changes that can provoke the epileptogenesis.

A significant challenge to modern science is the fact that effective pharmacological treatment of epilepsy is often complicated or even impossible. Existing antiepileptic drugs often have significant side effects, which, for example, may make it impossible for children to use them. There are frequent cases of drug-resistant epilepsy (30-40%).

Literature sources show that a large number of neurological diseases are accompanied by acidification of the extracellular environment, which in turn leads to the activation of ASIC channels. The involvement of these channels in the pathogenesis of many neurodegenerative diseases has been shown previously. For example, the ASIC1a blockage was proposed for myeloprotection in multiple sclerosis and neuroprotection in encephalomyelitis.

Therefore, the study of ASIC1a channels as a pharmacological target for the treatment of epileptic disorders is relevant. Understanding the role of these channels in the physiological and pathological processes that accompany the pathogenesis of epilepsy can become the source for the development of innovative antiepileptic drugs.

For many models of neurological diseases, the participation of ASIC channels in their pathogenesis has been shown. For example, an experimental model of autoimmune encephalomyelitis ASIC1a knockout mice showed a reduction in the level of axonal degeneration compared to control. Thus, ASIC1a makes a significant contribution to the perception of damaging stimuli. A similar effect was demonstrated using acute pain experimental models. ASIC1 pharmacological blockade with amiloride had a neuroprotective effect protecting both myelin and

the neurons themselves. It was proposed usage of ASIC1a blockers for neuro- and myeloprotection for multiple sclerosis.

ASIC1a plays a role in the processes of axonal neurodegeneration, and therefore, it is a promising target for neurological disease treatment. At the same time, the direct role of ASIC1a in their pathogenesis remains largely unexplored.

The study aimed to determine the role of ASIC1a channels in the modulation of the rat hippocampal neural networks activity using whole-cell and cell attach patch-clamp techniques.

The study of the role of ASIC1a channels in the modulation of epileptiform activity makes it possible to understand the mechanisms of the development of seizures in the hippocampus as one of the main foci of epileptic activity. The study provides a deeper understanding of the cellular mechanisms of ASIC channels involvement in epileptic seizures development, providing new insights about their role in the synaptic system.

The study describes the influence of ASIC channels on the generation of spontaneous synaptic activity in the pyramidal neurons of the hippocampus. This fact must be taken into account for the development of the new strategies and techniques for therapy pathological processes associated with changes in the extracellular pH. Due to the showed role of ASIC in the epileptogenic system the results can be used in the development of antiepileptic drugs.

We studied for the first time the effect of ASIC channel blocking in epileptic models of the hippocampus using the latest selective ASIC1a channel blocker 5b. We determine the optimal conditions for perfusion and the carbogenization of the brain slices, which is critical for reliable research. Here we show that perfusion rate and the level of slices' oxygenation modifies the power of the induced epileptiform activity. For the first time, we show functional differences in the development of epileptiform activity in the ventral and dorsal parts of the hippocampus. We studied that ASIC1a blockade using low-magnesium and 4-ap models of epileptiform



activity induction leads to a decrease in the frequency characteristics of epileptiform activity and reduces the frequency of spontaneous generation of action potentials in the hippocampus. Possible mechanisms that mediate the above changes also have been investigated.

It was first demonstrated that the removal of ASIC channels from the synaptic conduction cascade does not affect the excitatory synaptic activity, while significantly increasing the frequency characteristics of inhibitory activity, thus shifting the balance between inhibition and excitation due to ASIC1a blockade leads to a decrease in total excitation and leads to antiepileptic effect.

Summarizing the results, we can say that this work confirms the idea of the presynaptic effect of ASIC channels on the probability of activation of GABA receptors, given that the blockade of ASIC1a does not affect the amplitude characteristics of excitatory postsynaptic currents. Using the latest selective ASIC1a blocker, we demonstrate the role of these channels in the regulation of inhibitory synaptic activity in the central nervous system and their importance as targets for future antiepileptic drugs.

**Keywords:** hippocampus, epileptiform activity, acid-sensitive ion channels, ASIC, spontaneous inhibitory activity, spontaneous excitatory activity, synaptic transmission

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### В яких опубліковані основні результати роботи:

1. Ievglevskiy, D Isaev, O Netsyk, **A Romanov**, M Fedoriuk, O Maximyuk, E Isaeva, N Akaike, O Krishtal Acid-sensing ion channels regulate spontaneous inhibitory activity in the hippocampus: possible implications for epilepsy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016; 371(1700):20150431. doi:10.1098/rstb.2015.0431
2. Sydorenko V.G., Komarov O.S., Sushko B.S., **Romanov A.K.**, Isaeva E.V. Isaev D.S. Modulation of 4-aminopyridine-induced neuronal activity and local pO<sub>2</sub> in rat hippocampal slices by changing the flow rate of the superfusion medium *Fiziol. Zh.* 2016; 62(4): 3-11. DOI: 10.15407/fz62.04.003
3. A.Vlasiuk, **A. Romanov**, D. Isaev, E. Isaeva Effect of altered extracellular magnesium concentration on the neuronal activity in different hippocampal regions of immature rats *Fiziol. Zh.* 2017; 63(2): 10-16. DOI: 10.15407/fz63.02.010
4. Isaeva E, **Romanov A**, Holmes GL, Isaev D. Status epilepticus results in region-specific alterations in seizure susceptibility along the hippocampal longitudinal axis. *Epilepsy Res.* 2015; 110:166-170. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2014.12.009
5. **A.K. Романов**, О.В. Ісаєва Експериментальні моделі у вивченні механізмів і наслідків епілептичних нападів у неонатальний період життя *Fiziol. Zh.* 2020; 66(2-3): 93-100

### Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. M. Semenikhina, **A. Romanov**, M. Fedoriuk, M. Stefanenko, D. Isaev, O Isaeva, O. Maximyuk, and O. Krishtal Regulation of spontaneus

synaptic activity in the lateral amygdala by acid-sensing ion channels, 100 Years of microglia symposium, Lausanne, Switzerland, 2019

2. M. Semenikhina, **A. Romanov**, M. Fedoriuk, M. Stefanenko, D. Isaev, O. Maximyuk, and O. Krishtal Acid-sensing ion channels regulate spontaneous activity in the amygdala. VIII annual meeting of Ukrainian Biophysical Society, Kyiv, Ukraine, 2019

3. Netsyk O., Zapukhliak O., **Romanov A.**, Isaeva E., Krishtal O., Isaev D Synchronization of epileptiform activity between CA1 and CA3 rat hippocampus in nonsynaptic models of epilepsy. The Queen Elizabeth II Conference Centre, London, UK Physiology 2014

4. **Romanov A.**, Kondratskaya E., Isaev D., Krishtal O ASIC currents in mouse amygdala neurons Міжнародна наукова конференція, «Механізми функціонування фізіологічних систем» Львівський Національний Університет імені Івава Франка, Львів, 15 – 17 жовтня 2014 р.

5. **Romanov A**, Zapukhliak O., Isaeva E, Krishtal O. Effect of acid-sensing ion channels inhibition in the low magnesium model of epilepsy in the rat hippocampus. V1 Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kiev, June 4-8, 2014

## ЗМІСТ

<b>Перелік умовних скорочень .....</b>	<b>14</b>
<b>Вступ .....</b>	<b>16</b>
<b>Актуальність .....</b>	<b>17</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>22</b>
1.1. Сучасні концепції розуміння епілепсії .....	22

	12
1.1.1. Гіпокамп та його роль у розвитку епілепсії .....	25
1.2. Патогенез та наслідки розвитку епілепсії.....	29
1.3. Позаклітинне підкислення та епілепсія .....	34
1.4. Кислоточутливі канали та їх модулятори в ЦНС .....	35
1.5. ASIC1a, їх функції та електрофізіологічні властивості.....	39
1.6. Роль ASIC1a у розвитку патологічних станів .....	42
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....</b>	<b>45</b>
2.1 Експериментальні тварини.....	45
2.2 Отримання свіжоізольованих зрізів гіпокампа щурів .....	45
2.3 Реєстрація епілептиформної активності .....	47
2.4 Методика фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» .....	56
2.4 Оптична система.....	58
2.5 Електрофізіологічне обладнання .....	61
2.6 Детектування і аналіз отриманих даних .....	62
2.7. Статистичний аналіз результатів.....	63
2.8. Розчини та реактиви.....	64
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>68</b>
3.1. Визначення параметрів перфузування та оксигенації для дослідження епілептиформної активності гіпокампа .....	68

3.2. Дослідження епілептиформних подій, генерованих у гіпокампі .....	72
3.3. Дослідження генерації іктальних та інтеріктальних явищ у СА3, СА1 зонах та зубчастій звивині вентральної частини гіпокампа .....	78
3.4. Ефект фармакологічної блокади ASIC на епілептиформні явища в умовах низько-магнієвої моделі індукції епілептиформної активності .....	81
3.5. Блокування ASIC в умовах 4-амінопіридинової моделі індукції епілептиформної активності .....	83
3.6. Дослідження ролі ASIC у генерації потенціалів дії.....	85
3.7. Визначення ролі ASIC у генерації спонтанної збуджуючої синаптичної активності нейронів гіпокампа .....	87
3.8. Ефект блокування ASIC на генерацію спонтанної гальмівної синаптичної активності нейронів гіпокампа .....	89
<b>РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ .....</b>	<b>93</b>
4.1. Дослідження впливу рівня оксигенації та перфузування зрізів на епілептиформну активність гіпокампа.....	93
4.2. Дослідження епілептиформних подій в гіпокампі .....	96
4.3. Ефект блокування ASIC на генерацію епілептиформних подій в гіпокампі.....	98
4.4. Вплив пригнічення функції ASIC на генерацію потенціалів дії в гіпокампі.....	99
4.5. Роль ASIC в генерації збуджуючої та гальмівної спонтанної активності гіпокампа .....	101

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

<b>ACSF</b>	–	штучна спинно-мозкова рідина
<b>ASIC</b>	–	протон-чутливі іонні канали
<b>ASIC1a</b>	–	1a субодиниця протон-чутливих іонних каналів
<b>ASIC1b</b>	–	1b субодиниця протон-чутливих іонних каналів
<b>ASIC1a/2b</b>	–	1a/2b субодиниця протон-чутливих іонних каналів
<b>ПДЗ</b>	–	пароксизмальний деполяризаційний зсув
<b>AMPA</b>	–	$\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
<b>ГАМК</b>	–	$\gamma$ -аміномасляна кислота
<b>НМДА</b>	–	N-метил-D-аспартат
<b>ЦНС</b>	–	центральна нервова система
<b>NR2A</b>	–	2A субодиниця НМДА-рецептора
<b>NR2B</b>	–	2B субодиниця НМДА-рецептора
<b>NR1</b>	–	N1 субодиниця НМДА-рецептора
<b>ПД</b>	–	потенціал дії
<b>ЕЕГ</b>	–	електроенцефалограма
<b>ЕА</b>	–	епілептиформної активності
<b>ЧМТ</b>	–	черепно-мозкова травма
<b>ЦНС</b>	–	центральна нервова система
<b>ПНС</b>	–	периферійна нервова система
<b>ВГ</b>	–	вентральна частина гіпокампа
<b>ДГ</b>	–	дорзальна частина гіпокампа

<b>сЗПС</b> потенціал	–	спонтанний	збуджуючий	постсинаптичний
<b>ГПС</b>	–	гальмівні постсинаптичні струми		
<b>D-APV</b>	–	D-(2)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid		
<b>ДП</b>	–	довготривала потенціація		
<b>ЗПСП</b>	–	збуджуючий постсинаптичний потенціал		
<b>GPCR</b>	–	G-білок-зв'язаний рецептор		
<b>ГАМК-А</b>	–	А субодиниця ГАМК-рецептора		
<b>ГАМК-В</b>	–	В субодиниця ГАМК-рецептора		
<b>ГАМК-С</b>	–	С субодиниця ГАМК-рецептора		

## Вступ

Епілепсія є одним з найпоширеніших неврологічних захворювань, яке характеризується спонтанним виникненням епілептичних нападів. За даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я, хоча б раз у житті епілептичні напади переживав приблизно 1% людей у світі (що складає більше 70-ти мільйонів). Суттєвою проблемою для діагностування та вивчення патогенезу цього захворювання є те, що воно може мати різноманітні характер та етіологію: прояви епілепсії можуть бути майже непомітними, як при абсансній епілепсії, а можуть проявлятися як тяжкі та довготривалі судоми. Незважаючи на поширеність епілепсії, у більшості випадків доволі важко діагностувати причини її появи та розвитку. За статистичними даними, у близько 70% випадків пацієнту діагностують ідіопатичну епілепсію.

Вважається, що найчастіше епілепсія виникає внаслідок генетичних причин або розвивається як наслідок інших захворювань або фізичного чи функціонального ушкодження цілісності головного мозку: наприклад, як наслідок черепно-мозкової травми, розвитку пухлин, ішемічного ушкодження, тощо. Одиничний випадок епілептичних нападів, який було спровоковано зовнішніми чинниками, не є показанням до діагностування епілепсії, але в той ж час навіть одиничний епілептичний напад може призвести до незворотних патологічних змін, які можуть провокувати патогенез епілепсії.

Суттєвим викликом для сучасної науки є також і те, що ефективне фармакологічне лікування епілептичного синдрому часто є ускладненим або навіть неможливим. Наявні протиепілептичні препарати часто мають протипоказання та суттєві побічні ефекти, з огляду на які, наприклад, може бути неможливим їх використання для дітей. Частими є випадки фармакорезистентної епілепсії (30-40%). Зважаючи на це, актуальним



залишається пошук нових перспективних мішеней для створення протиепілептичних препаратів. Однією з таких мішеней можуть бути протон-чутливі іонні канали, а саме їх підтип 1a (ASIC1a), дослідженню ролі якого в патогенезі епілепсії присвячена дана робота.

Літературні джерела демонструють, що значна кількість неврологічних захворювань супроводжується закисненням зовнішньоклітинного середовища, що, в свою чергу, призводить до активації ASIC каналів. Показано участь цих каналів у патогенезі багатьох нейродегенеративних захворювань. Наприклад, уже було запропоновано використання блокади ASIC1a для мієлопротекції при розсіяному склерозі та нейропротекції при енцефаломієліті.

### **Актуальність**

Сучасні дослідження вказують на те, що епілептичні напади присутні у симптоматиці більше ніж 40 відомих хвороб, що, в свою чергу, в залежності від характеру нападу та осередку епілептичного фокусу в головному мозку, може мати різноманітні наслідки для хворого. На жаль, на сьогодні антиепілептичні препарати мають значний спектр протипоказань та побічних ефектів, що визначає пошук нових фармакологічних мішеней щодо лікування епілепсії як один з найперспективніших напрямів сучасних досліджень.

Наразі актуальним є дослідження ASIC1a каналів в якості такої мішені. Розуміння ролі цих каналів у фізіологічних та патологічних процесах, що супроводжують патогенез та перебіг епілепсії, будуть слугувати неоціненним джерелом можливостей для створення інноваційних антиепілептичних препаратів.

Для багатьох моделей неврологічних захворювань було показано участь ASIC каналів у їх патогенезі. Наприклад для експериментальної моделі аутоімунного енцефаломієліта з використанням мишей, нокаутних

за геном, що кодує ASIC1a, було продемонстровано зниження рівня аксональної дегенерації у порівнянні з контролем. Таким чином, ASIC1a забезпечують суттєвий внесок впливу ушкоджуючих стимулів. Схожий ефект було продемонстровано з використанням моделей гострого болю: фармакологічна блокада ASIC1 амilorидом мала нейропротекторний ефект, захищаючи як мієлінові волокна, так і власне нейрони. Було запропоновано використання блокаторів ASIC1a для нейро- та мієлопротекції при розсіяному склерозі.

Було зроблено висновок, що ASIC1a відіграють роль у процесах аксональної нейродегенерації та є перспективною мішенню для розробки фармакологічних засобів для лікування неврологічних захворювань, але в той же час безпосередня роль ASIC1a у їх патогенезі залишається значною мірою невивченою.

#### **Мета дослідження.**

Мета роботи полягала у визначенні ролі протон-чутливих іонних каналів типу 1a у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів.

#### **Завдання дослідження**

1. Визначити експериментальні параметри швидкості перфузії та карбогенізації зрізів для досягнення оптимальних умов при дослідженні протон-чутливих каналів.
2. Дослідити ймовірність та характеристики поширення епілептиформної активності в вентральному та дорзальному відділах гіпокампа.
3. З'ясувати ефект фармакологічної блокади ASIC1a на характеристики епілептиформної активності в умовах умов низько-магнієвої та 4-ар моделей індукції епілептиформної активності.

4. Встановити ефект блокування ASIC1a на процес генерації потенціалів дії в пірамідних нейронах гіпокампа.
5. Визначити роль ASIC1a у процесах спонтанної збуджуючої та гальмівної синаптичної активності.

**Об'єкт дослідження:** збуджуюча та гальмівна синаптична активність нейронів гіпокампа.

**Предмет дослідження:** зміни збуджуючої та гальмівної синаптичної активності гіпокампа в нормі та в умовах моделювання епілептиформної активності *in vitro*.

#### **Методи дослідження**

Електрофізіологічна реєстрація у зрізах гіпокампа з використанням методик петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» та селлаттач, реєстрація потенціалів дії нейронів гіпокампа та електрофізіологічна реєстрація польових потенціалів гіпокампа, оцінка впливів фармакологічних агентів, статистична обробка результатів.

#### **Наукова новизна**

В роботі вперше досліджено вплив блокування ASIC каналів у епілептичних моделях гіпокампа з використанням новітнього блокатора ASIC1a каналів 5b. У роботі вперше було продемонстровано, що вилучення ASIC каналів з каскаду синаптичної провідності не має впливу на збуджувальну синаптичну активність, але достовірно підвищує частотні характеристики гальмівної активності.

Вперше продемонстровано, що зміщення балансу між гальмуванням та збудженням внаслідок блокади ASIC1a призводить до зменшення загальної збудливості та має протиепілептичний ефект.

## **Теоретичне та практичне значення отриманих у роботі результатів**

Вивчення ролі ASIC1a каналів у модуляції епілептиформної активності дає змогу зрозуміти механізми розвитку і поширення нападів у структурах гіпокампа як одного з головних фокусів епілептичної активності. Це дослідження дає більш глибоке розуміння клітинних механізмів роботи ASIC каналів під час епілептичних нападів, підтверджуючи їх роль в системі синаптичної провідності.

Практична цінність роботи полягає у встановленні впливу ASIC каналів на генерацію спонтанної синапатичної активності у пірамідних нейронах гіпокампа. Цей факт має обов'язково враховуватися при розробці нових стратегій та прийомів у роботі з патологічними процесами, які пов'язані зі змінами рівня зовнішньоклітинного рН.

Також, встановлення ролі ASIC у проепілептичних системах може бути використано у розробці протиепілептичних препаратів.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та в рамках загального плану науково-дослідних робіт відділу ФХБКМ Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

В рамках науково-дослідних робіт: «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011 – 2013; номер державної реєстрації – 0110U004750), «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012 – 2016; номер державної

реєстрації – 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273).

### **Особистий внесок здобувача**

Опрацювання літературних джерел, постановка експериментів та інтерпретація отриманих результатів проводилась здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Електрофізіологічні дослідження, кількісна обробка даних, підготовка наукової роботи до друку та написання всіх розділів дисертації проводились автором особисто.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи доповідались на VI конгресі українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2014), міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Україна, Львів, 2014), британському фізіологічному з'їзді (Велика Британія, Лондон, 2014), VIII щорічному з'їзді біофізичного товариства (Україна, Київ, 2019), симпозиумі «100 Years of microglia symposium» (Швейцарія, Лозанна, 2019), а також на семінарах сектора нейронаук Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця.

### **Публікації**

За результатами роботи було опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, затверджених МОН України, у тому числі одна стаття у науковому виданні, віднесеному до першого квартилю (Q1) та одна стаття у виданні, віднесеному до другого квартилю (Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, та 5 тез доповідей на міжнародних конференціях.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів досліджень,

обговорення результатів, висновків та списку використаних літературних джерел із 215 найменувань.

Робота викладена на 134 сторінках та проілюстрована 32 рисунками і 5 таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Сучасні концепції розуміння епілепсії

У сучасній літературі епілепсія характеризується як функціональний стан, за якого спостерігаються неспровоковані повторювані судоми (Stafstrom and Carmant 2015). Ця хвороба є одним з найбільш розповсюджених неврологічних захворювань - за даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я на епілепсію страждають більше семидесяти мільйонів людей у світі.

Епілепсію класифікують за формою нападів та походженням захворювання. Під терміном «епілептичний напад» розуміють раптову зміну у поведінці у зв'язку з короткочасною патологічною зміною в електричній активності мозку. Зазвичай головний мозок генерує електричні сигнали певної частоти, у залежності від діяльності, віку та стану. Ці сигнали формуються за рахунок роботи нейронів, які генерують електричні імпульси різної сили, що регулюється нейротрансмітерами. Існують такі види судом: генералізовані, тоніко-клонічні, абсансні, міоклонічні, фокальні, атонічні (Falco-walter, Sche, and Fisher 2018; C. Stafstrom and Carmant 2015).

Судомам передують розвиток вогнища надмірної нейронної активності, і у залежності від локалізації та розвитку такого вогнища їх класифікують як генералізовані або локальні. Якщо вогнище виникає у певній ділянці мозку, то симптоми нападу часто відображають функції цієї області. Наприклад, якщо певна ділянка мозку відповідає за рухи великого пальця правої руки і вогнище виникнення пароксизмальної активності локалізоване у ній, то напад може починатись з посмикувань пальця або руки. Розвиток епілептичного вогнища може бути спровокований як

внутрішніми чинниками, так і зовнішніми. Наприклад, поява судом є одним з типових симптомів внутрішньомозкового крововиливу . Поодиноким випадком судом не є показом до встановлення діагнозу «епілепсія», такий діагноз встановлюють лише у випадку повторюваності та неспровокованості нападів. В той же час, якщо епілептичні напади продовжуються доволі довгий проміжок часу, патологічні процеси, які їх супроводжують, можуть призвести до структурних та функціональних змін у ЦНС, які в свою чергу можуть призвести до епілептогенезу.

Причини виникнення судом є множинними та не завжди такими, які можна легко діагностувати. Термін «симптоматичні епілептичні напади» використовується для судом із відомою етіологією: структурні та метаболічні порушення, запалення, інфекції, отруєння, генетична схильність (Scheffer et al. 2018).

1. Відома етіологія нападу:
  1. Гострий (інсульт, інтоксикація, малярія, енцефаліт)
  2. Відтермінований (посттравматичний, постенцефалітний)
  3. Прогресуючий (пухлина мозку, деменції)
2. Ідіопатична етіологія

Наразі епілептогенез описується як процес розвитку та поширення патологічних змін у мозковій тканині, внаслідок чого вона здатна спонтанно генерувати епілептогенні вогнища, що, в свою чергу, призводить до розвитку епілептичного стану або прогресування епілепсії після її встановлення (Pitka et al. 2015). Такий процес супроводжується низкою патологічних структурних та функціональних змін у першу чергу в лімбічній системі мозку, що провокує не лише власне епілептичні напади, але й низку змін у поведінці та емоційному стані. Так, хворі на епілепсію часто страждають на супутні неврологічні розлади, такі як депресія, тривожність та напади паніки (Hingray et al. 2019). У літературі



продемонстровано двосторонній зв'язок між епілепсією та депресією: так, люди, що хворіли на депресію у минулому мають більше шансів на розвиток набутої епілепсії внаслідок певного зовнішнього чинника, такого як, наприклад, ішемічне ураження мозку або черепно-мозкова травма. За останніми літературними даними, процес розвитку набутої епілепсії є сигмоподібною функцією часу: після появи першого спонтанного епілептичного нападу захворювання продовжує прогресувати (Kadam et al. 2010).

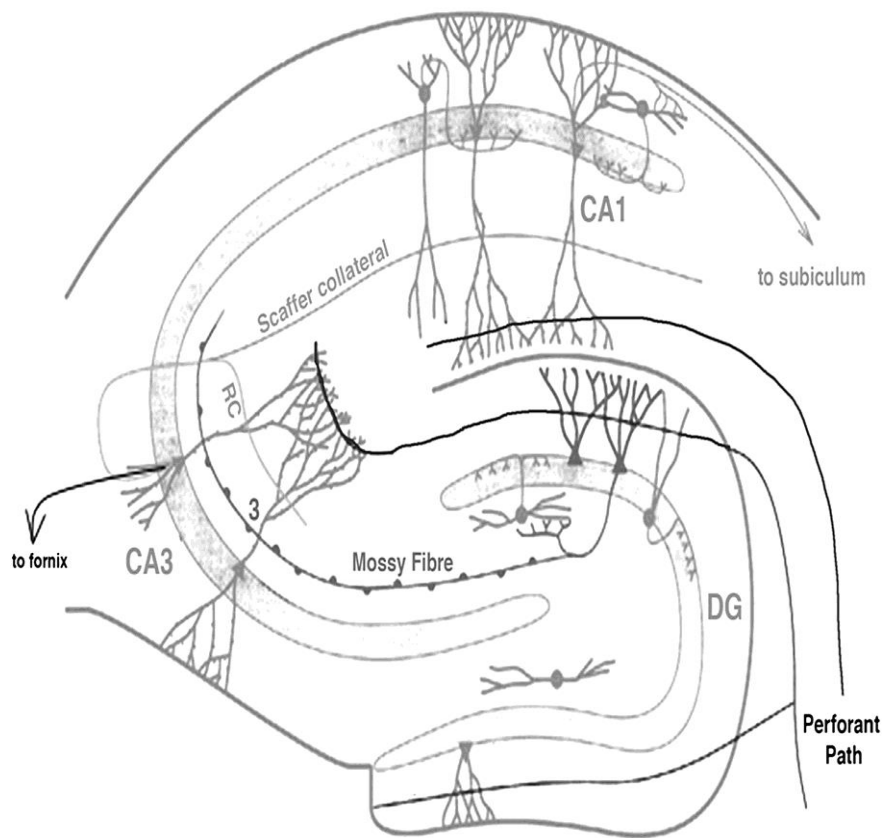
У сучасній нейрофізіології розроблено ряд експериментальних моделей, що відображають розвиток та перебіг епілепсії, що дозволяють глибше зрозуміти молекулярні й нейронні механізми формування цього захворювання. На рівні окремих нейронів епілептична активність складається з початкової стійкої деполяризації клітин, що призводить до потужної генерації серії потенціалів дії (ПД), деполяризації на плато і швидкої реполяризації з подальшою гіперполяризацією. Ця послідовність змін мембранного потенціалу нейронів називається пароксизмальним деполяризаційним зсувом (ПДЗ) (Pitkänen et al. 2015a; Timofeev, Chauvette, and Soltani 2014).

Генераторна активність, яка виникає в результаті відносно тривалої деполяризації мембрани нейронів, зумовлюється надходженням у клітину позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , що призводить до відкриття потенціал-залежних  $\text{Na}^+$  каналів, зростання рівня внутрішньоклітинного  $\text{Na}^+$  і генерації повторюваних імпульсних розрядів. Подальший гіперполяризаційний струм підтримується активацією ГАМК рецепторів і зростанням концентрації  $\text{Cl}^-$  всередині клітини та роботою  $\text{Ca}^{2+}$ - залежних  $\text{K}^+$ - каналів та виходом іонів  $\text{K}^+$  з клітини. ПДЗ у вищих хребетних генерується переважно внаслідок активації АМПА- і НМДА- глутаматних рецепторів,

які передають збуджувальні сигнали в хімічних синапсах (С. Е. Stafstrom 1998).

### 1.1.1. Гіпокамп та його роль у розвитку епілепсії

Основна інформація, отримана у дослідженнях епілептогенезу та епілепсії, базується на дослідженні роботи гіпокампа. Дані, отримані за допомогою комп'ютерного моделювання епілептогенних процесів, яке базувалося на цій інформації, збігаються з концепцією, що збуджувальний позитивний зворотний зв'язок у синапсах гіпокампа є необхідною характеристикою епілептогенних мереж (Dyhrfeld-johnsen et al. 2008). (рис.1.1)



**Рис. 1.1. Схематичне зображення гіпокампальних мереж, зображено зони CA1-3, Зубчасту звивину (DG). (Сесом and France 2009)**

Структурно та функційно гіпокамп займає провідне місце у роботі лімбічної системи і відіграє важливу роль у консолідації пам'яті до довготривалої, обробці просторової пам'яті та формуванні орієнтувальних навиків, що забезпечує можливість навігації у просторі. В той же час, останні дослідження вказують на те, що функційно гіпокамп поділяється на дві частини: вентральну та дорзальну, функції яких дещо різняться (C. Paratheodoropoulos, Moschovos, and Kostopoulos 2005; C. Paratheodoropoulos and Kostopoulos 2000). Дорзальний гіпокамп виконує провідну роль у процесах консолідації пам'яті, в той час як вентральний має відношення до обробки емоційних реакцій. Вентральний гіпокамп структурно є тісно пов'язаним з мигдалеподібним комплексом.

Внаслідок епілепсії у гіпокампі спостерігаються різноманітні патологічні зміни. Гістологічні дослідження зрізів гіпокампа епілептичних щурів демонструють загибель нейронів, а також аксональний спрутинг (Ben-Ari 2008; Bonansco and Fuenzalida 2016; Perez et al. 1996). Функціональні порушення у гіпокампі, які розвиваються як наслідок епілепсії, можуть впливати на збудливість мембрани нейрона та призводити до його надмірної стимуляції.

Хоча в головному мозку існує велика кількість гомеостатичних механізмів, що покликані нормалізувати роботу клітин, у випадку епілепсії такі механізми виявляються нездатними відновити контрольний рівень відповіді клітин, внаслідок чого клітини гіпокампа стають гіперзбудливими. Дослідження останніх років демонструють, що така гіперзбудливість синаптичних мереж спостерігається навіть до розвитку спонтанних нападів, а отже вона може бути як наслідком розвитку епілепсії, так і її попередником (Navidhamidi, Ghasemi, and Mehranfard 2017).

Гіперсинхронні розряди, що виникають в час нападу, далі можуть поширюватися на сусідні області мозку завдяки змінам зовнішньоклітинного іонного балансу, а саме, збільшенню концентрації  $K^+$  та зменшенню концентрації  $Ca^{2+}$ . Це призводить до деполяризації сусідніх нейронів, посилення вивільнення нейромедіаторів та наступної активації глутаматних рецепторів, які посилюють збудження. В такий спосіб утворюється епілептична мережа, активність якої клінічно проявляється спонтанними нападами (Timofeev, Chauvette, and Soltani 2014).

Дегенерація нейронів гіпокампа або гіпокампальний склероз при скроневій епілепсії має неоднорідний характер. Типові гістопатологічні зміни при дегенерації найчастіше спостерігаються у СА1 ділянці гіпокампа та хілусі (Pitkänen and Lukasiuk 2009). Натомість, пірамідні нейрони, інтернейрони зони СА2 та гранулярні клітини зубчастої звивини виявляють більшу стійкість до пошкоджень.

Разом з тим, при склерозі спостерігаються виражені цитологічні зміни в живих нейронах. Методами імуногістохімії, конфокальної та електронної мікроскопії було виявлено істотне збільшення кількості нейрофіламентів в клітинах, потовщення дендритів та їхнє розгалуження. Ці особливості, швидше за все, являють собою вторинні або адаптивні клітинні зміни внаслідок реорганізації зв'язків гіпокампа, а не первинні клітинні аномалії (Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JJ 2006). Подібні патологічні процеси також можуть бути присутніми в сусідніх лімбічних структурах, включаючи мигдалеподібний комплекс, парагіпокампальну звивину та енторинальну кору (Pitkänen et al. 2015b).

Більшість даних про механізми, що лежать в основі нейродегенерації, були отримані на моделях епілептичного статусу у тварин (Ekdahl et al. 2003). Ці дослідження показали, що пошкодження нейронів обумовлено ексайтотоксичністю – патологічним процесом, який

призводить до загибелі нервових клітин при гіперактивації НМДА- і АМПА-рецепторів. Неконтрольоване надходження іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину активує ряд ферментів, які руйнують цитозольні структури і запускають апоптоз.

Описана селективна загибель нейронів призводить до зниження пригнічуючого впливу інтернейронів на збудливість системи (Sharma et al. 2007). Більше того, змінюється характер мережного гальмування. Кошикоподібні клітини, що є ГАМК-ергічними інтернейронами гіпокампа, формують синапси на тілах і проксимальних дендритах пірамідних клітин. При одночасному збудженні пірамідних нейронів навіть одна кошикоподібна клітина здатна синхронізувати їхню активність. Втрата інтернейронів у висхідному і лакунозно-молекулярному шарах зони CA1 призводить до втрати дистального дендритного інгібування, тоді як збереження і збільшення зв'язків з кошикоподібними клітинами може призводити до посилення синхронізації пірамідних клітин (Sharma et al. 2007).

Втрата пірамідних клітин та інтернейронів супроводжується активним гліозом, в результаті чого частина нейронів у синаптичних мережах гіпокампа заміщується астроцитами (Pitkänen et al. 2015b). Також спостерігається підвищена проліферативна активність гранулярних клітин зубчастої звивини.

Показано, що 75 – 90 % новоутворених після епілептичного нападу клітин починають експресувати маркери зрілих нейронів протягом чотирьох тижнів (G L Holmes et al. 1999). Крім того, припускають, що напади прискорюють дозрівання і вбудовування новоутворених нейронів у нейромережі (G L Holmes et al. 1999). Приблизно через 3 – 4 тижні після нападу рівень проліферації повертається до початкових значень. Варто

відмітити, що хронічна скронева епілепсія супроводжується зниженим рівнем нейрогенезу (Hattiangady, Rao, and Shetty 2004).

Функціональна роль нейрогенезу гранулярних клітин зубчастої звивини невідома. В деяких випадках гальмування проліферації зменшує частоту судом і сприяє відновленню когнітивних функцій, що підтверджує припущення щодо проепілептогенної ролі новоутворених клітин. Однак, в інших випадках було показано, що інгібування нейрогенезу, навпаки, сприяє підвищенню судомної реактивності, збільшуючи частоту нападів та їхню тривалість (К.-О. Cho et al. 2015; Iyengar et al. 2015). Припускають, що реорганізація нервових мереж в результаті нейрогенезу призводить до порушення балансу збудження і гальмування, оскільки в них вбудовуються нейрони з різними електрофізіологічними характеристиками (гранулярні клітини з пригнічуючою іннервацією мігрують до хілусу та утворюють синапси з мохоподібними волокнами та ГАМК-нейронами зони СА3).

В такий спосіб формуються циклічні зв'язки, які перезбуджують гіпокамп і посилюють епілептиформну активність (Danzer 2012).

## **1.2. Патогенез та наслідки розвитку епілепсії**

Дисбаланс у збудженні/гальмуванні може впливати на багато функцій у мозку - від активності генів і клітинних сигнальних каскадів до мережної активності. Цей дисбаланс може бути генетично обумовленим або набути. Порушення може проявлятися на будь-якому рівні функціонування мозку: від атипової роботи певного рецептору (генетично обумовленого) до більш серйозних тканинних пошкоджень мозку у результаті травми чи інсульту (набутих) (С.Е. and L. 2015).

Чинниками виникнення епілепсії можуть бути як моногенетичні, так я полігенетичні мутації. Більшість видів епілепсії мають складну генетичну основу з мультигенними дефектами, що ведуть до зміни

потенціалу на мембрані, через що і розвивається або надмірне збудження, або недостатнє гальмування, що і причиною розвитку епілептичного стану (С. Stafstrom and Carmant 2015).

### **Роль ГАМК та його рецепторів у розвитку епілепсії**

Несправність механізму гальмування може бути зумовлена зменшеною кількістю ГАМК, головного гальмівного нейротрансмітеру ЦНС. На цих даних ґрунтується дія антиепілептичних ліків (антиконвульсантів) – барбітуратів та безодиазепинів, які посилюють функції ГАМК (Rudolph and Knoflach 2011).

У організмі людини наявний фермент, що відповідає за синтез ГАМК, – це глутамат декарбоксилаза. Відомо, що він має дві форми, які відрізняються молекулярною масою, амінокислотним складом, клітинною та субклітинною локалізацією і взаємодією з кофактором – піридоксаль фосфатом (вітаміном В<sub>6</sub>). Нестача цього кофактору (через незбалансоване харчування або порушення всмоктування у кишечнику) призводить до зменшення кількості синтезованого ГАМК (Gregory L. Holmes 1995).

У організмі людини є три типи рецепторів до ГАМК: ГАМК-А, ГАМК-В та ГАМК-С. ГАМК може опосередковувати певні процеси у мозку, які реалізуються пре- та постсинаптично: перший полягає у зменшенні вивільнення збуджувального або гальмівного трансмітеру через активацію рецепторів. Так, в постсинаптичній мембрані ГАМК призводить до гіперполяризації, а отже, до зменшення можливості нейрону генерувати потенціали дії (Khazipov, Valeeva, and Khalilov 2015).

ГАМК-А та ГАМК-С рецептори належать до надродини ліганд-керованих іонних каналів. ГАМК-А рецептори є гетероолігомерами, які здатні пропускати іони Сl<sup>-</sup>, вони активуються стероїдами, барбітуратами і бензодиазепінами. Відомо, що під час епілептичного нападу кількість та чутливість ГАМК-А рецепторів змінюється. ГАМК-С рецептори не

зв'язуються з таким ж лігандами як і ГАМК-А, натомість вони активуються цис-4-амінокротоновою кислотою та (1S, 2R) -2-(амінометил)-1-карбоксициклопропаном (Chebib and Johnston 1999).

ГАМК-В рецептори є гетероолігомерними і належать до родини GPCR. Вони селективно активуються баклофеном та CCGP27492, тоді ж як блокуються факлофеном та фосфоновою кислотою (Chebib and Johnston 1999).

### **Роль глутамату та його рецепторів у розвитку епілептичних нападів**

Глутамат є одним із головних збуджувальних нейротрансмітерів у ЦНС. Існує декілька типів рецепторів до цієї сполуки, які можуть знаходитись пре- та постсинаптично на нейронах (як гальмівних, так і збуджувальних), а також на деяких типах гліальних клітин (G. Holmes 1995).

Іонотропний підклас рецепторів до глутамату (табл. 1.1), тобто рецепторів, які опосередковують вхід іонів при активації їх певним лігандом, представлений рецепторами, чутливими до  $\alpha$ -аміно-2,3-дигідро-5-метил-3-оксо-4-ізоксазолепропано-ату ( $\alpha$ -amino-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolepropanoic acid, АМПА), каїнатними рецепторами та НМДА-рецепторами.

У спокійному стані пара НМДА-рецептору заблокована іоном натрію або цинку, який «виштовхується» внаслідок деполяризації мембрани клітини, що уможливорює пропускання іонів натрію та в меншій мірі кальцію.

Потік іонів кальцію посилює деполяризацію і в патологічних умовах може бути причиною ексайтотоксичності, що призводить до нейрональних ушкоджень і загибелі нейронів (Naylor et al. 2013; Rowley et al. 2012).



Таблиця 1.1

**Іонотропні рецептори до глутамату (Bromfield EB, Cavazos JE,  
Sirven JI 2006)**

Назва рецептору	НМДА	АМПА	Каїнат
Іонна провідність	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> (Ca <sup>2+</sup> якщо наявна GluR2 субодиниця)	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>
Субодиниці рецептору	NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D	GluR1, GluR2, GluR3, GluR4	GluR5, GluR6 KA1, KA2
Агоністи	НМДЛА-гліциновий сайт: гліцин	АМПА, квіскуалат	Каїнат, домоат

Антагоністи	DL-2-аміно-5-фосфонопентанова кислота, CGS-19755, CGP-37849, Merck-801, мемантін, фенциклідин, піролохіноліновий хінон	1,2,3,4-тетрагідро-6-нітро-2,3-диоксобензохіноксалін-7-суфонамид	γ-d-глутаміл амінометансульфонова кислота
-------------	--	--	---

Інший головний підтип глутаматних рецепторів це метаботропні GPCR-рецептори (табл. 1.2). Наразі відомі, як мінімум, три групи цих рецепторів, яких диференціюють за ступенем афінності до агоністу, механізмом клітинної передачі, пре- та постсинаптичною локалізацією (С. Stafstrom and Carmant 2015).

*Таблиця 1.2*

**Метаботропні рецептори до глутамату (Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI 2006)**

	Група I	Група II	Група III
Локалізація	Постсинаптична	Пресинаптична	Пресинаптична

Субодиниці	mGluR1, mGluR5	mGluR2, mGluR3	mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8
Сигнальний механізм	Гідроліз фосфатидилінозитиолу	Інгібування аденілат циклази	Інгібування аденілат циклази
Агоністи	квіскуалат >L-глутамат ≥ іботенат >1-аміно-циклопентан-1,3-дикарбонова кислота	L-глутамат > 3,5-дигідроксифеніл-гліцин >1,3-дикарбонова кислота	L-2-аміно-4-фосфобутанова кислота >L-глутамат
Антагоністи	4-циклопропілглутамінова кислота, α-метил-4-карбоксіфенілгліцин	α-метилсерин-о-фосфат монофениловий ефір, [2s] – етилглутамінова кислота, α-метил-(4-сульфофеніл)гліцин	α-метил-(4-сульфофеніл)гліцин

### 1.3. Позаклітинне підкислення та епілепсія

Позаклітинне підкислення відбувається в головному мозку з підвищеною нервовою активністю під час посилення метаболізму та при нейрональному пошкодженні різного генезу. Таке зниження рН ліквору може мати глибокий вплив на роботу мозку, оскільки рН впливає на практично кожен біохімічну реакцію. В останні роки все більша кількість літератури засвідчує, що ацидоз є фактором численних захворювань, включаючи ішемію, розсіяний склероз та епілептичні напади. Крім того, показано, що кислоточутливі канали, такі як ASIC, відіграють ключову роль при психічних розладах, пов'язаних зі страхом і тривожністю.

Зв'язок між ацидозом та судомами є двобічним. З одного боку, власне ацидоз загалом та, зокрема, лактатний ацидоз, які можуть бути спровоковані різноманітними чинниками - як фізіологічними, так і патологічними, та самі здатні провокувати початок епілептичного нападу у людини, що хворіє на епілепсію. З іншого боку, велика кількість літературних джерел демонструє, що судоми безпосередньо провокують зміну рН ліквору. Показано, що епілептичні напади призводять до закислення міжклітинного середовища мозку. З використанням *in vitro* моделей продемонстровано, що зниження рН у зовнішньоклітинному розчині може призводити до активації протон-активованих каналів і, як результат, патологічного накопичення іонів кальцію, що в свою чергу призводить до нейронної смерті.

Такий патологічний ефект судом може бути пояснений тим, що епілептичні напади змушують клітини витратити більшу кількість енергії, що в свою чергу призводить до підвищення рівня лактату. Продемонстровано, зниження рівня рН та підвищення рівня лактату в пацієнтів безпосередньо під час епілептичних нападів (Lipka and Bülow 2003).

#### 1.4. Кислоточутливі канали та їх модулятори в ЦНС

Протон-чутливі іонні канали ASICs є рецепторами до протонів, що активуються при зниженні рН зовнішньоклітинного середовища та експресуються у багатьох типах клітин, зокрема у нейронах центральної (ЦНС) та периферійної (ПНС) нервових систем (Noël et al. 2010; Sluka, Winter, and Wemmie 2009). ASIC належать до надродини, яка також містить дегенерини (DEG) та епітеліальні натрієві канали (ENaC). Усі члени цієї надродини (ENaC/DEG/ASIC) мають подібну структуру: їхні N- та C-термінали локалізовані всередині клітини, а зовні знаходиться великий цистеїновий домен. ASIC функціонують як тримери, що пропускають переважно катіони натрію, але в той ж час гомомерні та гетеромерні ASIC1a, ASIC1b та ASIC1a/2b мають деяку проникність до катіонів кальцію (Gonzales, Kawate 2017; Sherwood et al. 2011; P. Zhang and Canessa 2002). При цьому показано, що іонна селективність ASIC змінюється в залежності від умов (Baconguis Isabelle 2008).

Всього ідентифіковано чотири гени, що кодують ASIC канали, формуючи загалом зі сплайсинговими варіантами шість підтипів субодиниць ASIC каналів. Залежно від підтипу, ASIC локалізуються переважно у периферичній або центральній нервовій системі та відрізняються функціональними властивостями і, відповідно, виконують різну фізіологічну роль. Найбільш поширеним підтипом в ПНС є ASIC3, тоді як в ЦНС переважно експресуються ASIC1a.

Відомо, що ASIC задіяні у процесах сприйняття та передачі больових відчуттів, механорецепції, у тонкій регуляції зорового сприймання, а також у процесах пов'язаних з навчанням, пам'яттю, епілептичною активністю та навіть відчуттям страху. Крім того, ASIC1, відіграє суттєву роль в ішемічному ушкодженні мозку, завдяки здатності у гомомерній формі

пропускати іони кальцію, які в надмірній кількості є згубними для нейронів .

Ішемічні ураження та токсичність внаслідок гіперзбудливості активують різні механізми, які викликають різні типи смерті нейронів. Попередні дослідження демонструють, що активність під час нападів може бути нейротоксичною, та що первинні механізми залучають збуджувальну передачу, опосередковану амінокислотними медіаторами, під час токсичності внаслідок нервового збудження. Проте, нещодавні дослідження показали, що тривалий епілептичний статус у щурів, індукований пілокарпіном або каїнатом, також має наслідком судинні зміни, які спричиняють ішемічне ушкодження. Це є важливим питанням, оскільки тривалий епілептичний статус, який зазвичай використовується для індукції хронічної епілепсії, тісно пов'язаний із клітинною загибеллю, яка спостерігається при скроневій епілепсії у людей. Той факт, що тривалий епілептичний статус пов'язаний із ішемічним ураженням, має важливе значення для лікування хворих із епілептичним статусом.

З огляду на те, що розвиток великої кількості патологічних станів супроводжується зміною зовнішньо-клітинного рН, доречним є дослідження ролі ASIC у патогенезі таких процесів. Кілька останніх оглядів узагальнили важливість та терапевтичний потенціал ASIC при неврологічних захворюваннях, а також взаємозв'язок структури та функцій цих каналів.

Було продемонстровано, що дані канали відіграють певне значення у розвитку таких патологій як епілепсія, ішемічний інсульт, хронічний біль, розсіяний склероз та розлади емоційної поведінки (Chu and Xiong 2012; Gründer and Chen 2010; Noël et al. 2010; Sluka, Winter, and Wemmie 2009) Також показано, що ASIC та ацидоз впливають на роботу дендритних шипів (Jing et al. 2012; X. M. Zha et al. 2006).

### 1.4.1. Експресія та функції ASIC у ЦНС

Субодиниці ASIC1a та ASIC2a широко експресуються в нейронах центральної нервової системи. Було показано, що особливо велика кількість цих каналів експресується у корі головного мозку, мигдалині, нюховій цибулині, мозочку та гіпокампі (Price et al. 2014). Завдяки залежності активації гомомерів ASIC2a від низького рН (активація відбувається при значенні рН близько 4.5 рН), гомомери ASIC1a та гетеромери ASIC1a / ASIC2a є основними функціональними ефекторами, що визначають величину реакцій, спричинених ацидозом (Wemmie et al. 2003). В той же час, лише гомомерна активація ASIC1a опосередковує викликане закисленням внутрішньоклітинне підвищення концентрації кальцію, яке тісно пов'язане з фізіологічними та патологічними функціями клітин.

ASIC1a та ASIC2a експресуються у сомі, дендритах та дендритних шипиках, тобто безпосередньо у ділянках, що відповідають за передачу збудження в мозку (Alvarez de la Rosa et al. 2003; Wemmie et al. 2004). Було показано, що ASIC1a впливає на щільність, довжину та зрілість дендритних шипиків (Alvarez de la Rosa et al. 2003; Yu et al. 2018; X. Zha 2013).

Функціонально ASIC1a відіграє важливу роль у індукції збуджувальних постсинаптичних струмів та відповідних мініатюрних потенціалів і в такий спосіб активація ASIC впливає на довготривалу потенціацію у гіпокампі та мигдалеподібному комплексі (Chiang et al. 2015; Du et al. 2014).

Водночас було показано, що активація ASIC індукує довготривалу депресію в гіпокампі та острівцевій корі (Li et al. 2016; Mango and Nisticò 2019). З використанням мишей з нокаутом експресії ASIC1a було продемонстровано залученність цих каналів у різні форми навчання,

залежного від роботи гіпокампа, емоційно-зумовлену пам'ять та реакції відрази до смаку і моторне навчання, залежне від роботи стріатуму (Chiang et al. 2015; Du et al. 2014; Li et al. 2016; Wemmie et al. 2002; Ziemann et al. 2009).

Як і ASIC1a, ASIC2a також локалізується при дендритах (X. M. Zha et al. 2009). Крім того, активація ASIC2a підвищує активність ASIC1a в дендритних шипиках. Регулюючий вплив ASIC2a на ASIC1a може пояснюватися сприянням утворенню N-зв'язаних гліканів у ASIC1a (Jiang et al. 2017). Крім того, ASIC2a асоціюється з схильністю до епілепсії, ішемічного ураження мозку та індукованою світлом дегенерацією сітківки (Mohamed Ettaiche et al. 2004; Jiang et al. 2017; Yang et al. 2017).

Була продемонстрована взаємодія ASIC з синапс-асоційованим білком PSD-95, який грає важливу роль в модуляції синаптичної пластичності, та з кіназо-1-взаємодіючими білками (X. M. Zha et al. 2009). Ці факти, а також те, що рН синаптичної щілини змінюється в процесі функціонування синапсу, дозволяє говорити про те, що ASIC можуть впливати на параметри синаптичної передачі. Це було продемонстровано на прикладі нейронів гіпокампа мишей з нокаутом гену, що кодує експресію ASIC1a каналів, де було показано відсутність довготривалої потенціації збуджуючих постсинаптичних потенціалів (ЗПСП), що виділяється високочастотною стимуляцією, на відміну від інтактних тварин (Wemmie et al. 2002)

Як зазначалося раніше, ASIC1a канали (рис. 1.3.) були виявлені в мигдалеподібному комплексі, де вони беруть участь у модуляції тривожної поведінки (Wemmie et al. 2004). В експериментах з використанням мишей, нокаутних за геном, що кодує ASIC1a, було показано зниження рівня тривожності у тесті «відкрите поле», який є одним з класичних тестів на визначення рівня тривожності та часто використовується з метою

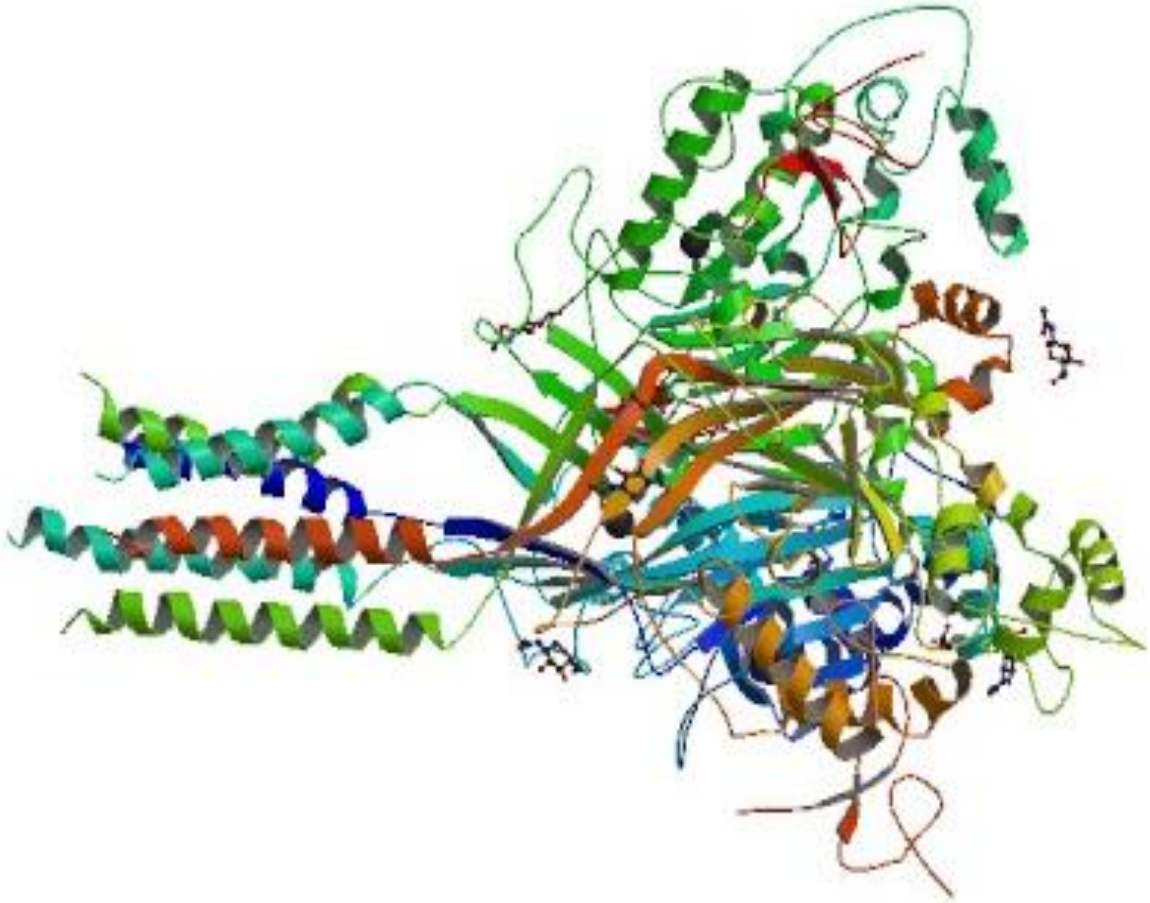


тестування анксиолітичних речовин, за умови відсутності зазначеного білка.

Також інактивація ASIC1a знижувала рівень тривожності у тестах з використанням стимуляції різкими шумами та запахом хижака (Coryell et al. 2007). В той же час, підвищення рівня експресії ASIC1a призводило до підвищення відчуття тривоги у експериментальних тварин (Wemmie et al. 2004).

### **1.5. ASIC1a, їх функції та електрофізіологічні властивості**

Активація ASIC каналів спричиняє транзйентний йонний трансмембранний струм, що спадає внаслідок процесу десенситизації протягом декількох секунд навіть за умов підтримання кислого середовища (J. H. Cho and Askwith 2008). Ці вхідні струми протікають через протон-чутливі йонні канали нервових клітин, деполяризуючи мембрану, спричиняючи розвиток потенціалу дії. Незважаючи на багаторічні дослідження, механізми відкриття рН-чутливого йонного каналу, його переходу у непроникний для йонів десенситизований та закритий стани наразі залишаються нез'ясованими.



**Рис 1.3. Модель будови молекули протон-чутливого іонного каналу**  
(Yoder, Yoshioka, and Gouaux 2018).

ASIC1a активується при низьких значеннях рН, досягаючи максимальної амплітуди при рН 6.0 максимуму та є найбільш чутливим сенсором протонів в організмі.

Відомо, ASIC канали задіяні у процесах сприйняття та передачі больових відчуттів, механорецепції, у тонкій регуляції зорового сприймання, а також у процесах пов'язаних з навчанням, пам'яттю, епілептичною активністю та навіть відчуттям страху. Крім того, саме ASIC1, відіграє суттєву роль в ішемічному ушкодженні мозку, завдяки

здатності у гомомерній формі пропускати іони кальцію, які в надмірній кількості є згубними для нейронів.

Ішемічні ураження та токсичність внаслідок гіперзбудливості залучують множинні механізми, які викликають різні типи смерті нейронів.

Попередні дослідження демонструють, що активність під час нападів може бути нейротоксичною, та що первинні механізми залучують збуджуючу передачу, опосередковану амінокислотними медіаторами, під час токсичності внаслідок нервового збудження. Проте, нещодавні дослідження показали, що тривалий епілептичний статус у щурів, індукований пілокарпіном або каїнатом, також включає в себе судинні зміни, які спричинюють ішемічне ушкодження. Це є важливим питанням, тому що тривалий епілептичний статус, який зазвичай використовується для індукції хронічної епілепсії, тісно пов'язаний із клітинною загибеллю, яка спостерігається при скроневій епілепсії у людей. Той факт, що тривалий епілептичний статус включає ішемічні ураження, має важливе значення для лікування хворих із епілептичним статусом. Фармакологічною мішенню для попередження клітинної загибелі після тривалих випадків, можуть слугувати процеси нейродегенерації.

Нещодавні дослідження показали, що активація кислоточутливих іонних каналів (ASIC1) протягом метаболічного ацидозу, який супроводжує експериментально викликаний інсульт, провокує подальше ушкодження мозку, та що клітинна загибель під час ішемії та епілепсії може бути попереджена шляхом блокування ASIC1 рецепторів.

### **1.6. Роль ASIC1a у розвитку патологічних станів**

Закислення зовнішньо-клітинного середовища супроводжує велику кількість патологічних станів у ЦНС. Для багатьох моделей нейродегенеративних захворювань було показано участь ASIC каналів у їх

патогенезі. Наприклад, було продемонстровано, зниження рівня аксональної дегенерації внаслідок нокауту за геном ASIC1a у експериментальній моделі аутоімунного енцефаломієліта.

Вимірювання рН спинномозкової рідини при експериментальному енцефаломієліті показало розвиток закислення, достатнього для активації ASIC1a, таким чином блокада експресії цих рецепторів мала протекторний ефект. Схожий ефект мала і фармакологічна блокада ASIC1a амілоридом (Friese et al. 2007). Такий же ефект було продемонстровано і у моделі гострого болю: фармакологічна блокада ASIC1a амілоридом мала нейропротекторний ефект, захищаючи як мієлінові волокна, так і власне нейрони (Friese et al. 2007; Vergo et al. 2011).

Таким чином, можна зробити висновок, що ASIC1a відіграють роль у процесах аксональної нейродегенерації та є перспективною мішенню для розробки фармакологічних засобів лікування таких патологій. Зокрема, було запропоновано використовувати блокатори ASIC1a для нейро- та мієлопротекції при розсіяному склерозі (Vergo et al. 2011).

Як зазначалося вище, ішемія мозку, гіпоксія та епілепсія також супроводжуються ацидозом (Mitchell Chesler 2003; Lipton 1999). Слід очікувати, що під час такого тривалого закислення АСІК будуть короткочасно активуватися, а потім інактивуватися та залишатися неактивними. Під час глобальної ішемії мозку позаклітинний рН знижується на 1 одиницю рН (Lipton 1999). За цих умов гомомультимери ASIC1a та гетеромери, що містять ASIC1a, інактивуються. Під час епілептичної активності також спостерігається швидке позаклітинне підкислення на 0.2–0.5 рН (Kraig, Ferreira Filho, and Nicholson 1983; Somjen 1984; Z. Q. Xiong and Stringer 2000). У цих дослідженнях рН вимірювали за допомогою мікроелектродів, чутливих до рН. Через обмеження в

просторово-часовій роздільній здатності фактичні зміни рН, можливо, були недооцінені при використанні цього підходу.

Таким чином, ASIC можуть активуватися під час епілептичної активності і, як очікується, будуть пригнічувати її за цих умов. Коливання позаклітинного рН також можуть виникати під час нормальної роботи мозку (M. Chesler and Kaila 1992; Mitchell Chesler 2003; Krishtal et al. 1987), що може впливати на активність ASIC.

Цікавим процесом є підкислення синаптичної щілини під час синаптичної активності нейронів, який наразі залишається недостатньо вивченим (Mitchell Chesler 2003). Однак, було визначено, що у синаптичних везикулах гіпокампа рівень рН становить близько 5.7 (Miesenböck, De Angelis, and Rothman 1998), і це опосередковує позаклітинне підкислення за рахунок вивільнення вмісту пресинаптичних везикул (DeVries 2001). Окрім цього, є дані про секрецію гліалової кислоти у відповідь на підвищену нейронну активність. Очікується, що така кислотна секреція індукує зміни рН впродовж секунд, а тому вони є досить швидкими для активації ASIC, і наразі не зрозуміло, чи ступінь підкислення гліаловою кислотою є достатньо для активації цих каналів (Mitchell Chesler 2003). Зміни рН під час епілептичної активності є відносно невеликими, але, можливо, раніше їх недооцінювали через обмежений просторово-часову роздільну здатність мікроелектродів для вимірювання рН, які були використані у дослідженнях (M. Chesler and Kaila 1992).

Для кращого розуміння залучення ASIC до функціонування синапсів важливо дослідити їх локалізацію у різних мембранах

Було виявлено, що ASIC1a рівномірно розподілений у плазматичній мембрані соми, аксонів та дендритів гіпокампальних та інших нейронів мозку (Alvarez de la Rosa et al. 2003; Friese et al. 2007; Wemmie et al. 2002,

2003). Хоча можна зробити припущення щодо функціональної ролі синаптичних ASIC, потенційна роль екстрасинаптично експресованих ASIC каналів менш зрозуміла (Wemmie et al. 2002, 2003). Екстрасинаптичні ASIC можуть активуватися за рахунок секреції кислоти гліальної клітини або під час епілептичної активності, водночас вони можуть відігравати ще не визначені ролі в сигналізації під час ішемії (Vukicevic and Kellenberger 2004).

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### **2.1 Експериментальні тварини.**

У експериментальних дослідженнях використовували щурів лінії Вістар. Тварин утримували і доглядали у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вони мали вільний доступ до води та їжі.

Усі експериментальні протоколи виконували із дотриманням положень Конвенції з біоетики Європейської Ради (1997 року), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 рік), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 року), що було підтверджено комітетом біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця.

У залежності від експериментального протоколу, у дослідженні використовували щурів віком від 10-ї до 21-ї доби від народження.

#### **2.2 Отримання свіжоізолюваних зрізів гіпокампа щурів**

Свіжоізолювані зрізи гіпокампа отримували за 2-3 години до початку експерименту. Для цього щурів глибоко анестезували ізофлюраном та декапітували. Для анестезування використовували настільний інгаляційний анестезуючий пристрій V3000PS. При анестезуванні в такий спосіб тварина не обмежується в рухах, що дозволяє з одного боку запобігти додатковому стресу, а з іншого - точно контролювати глибину анестезії, застосовуючи методи перевірки

рефлексів (щипки лап та вух) і здійснювати контроль дихання. Після декапітації мозок обережно виймали з черепної коробки за допомогою шпателя і переносили у карбогенізований охолоджений до температури 2-4°C розчин штучної спинномозкової рідини, модифікований для приготування зрізів (модифікований ACSF, таблиця 2.2) (Aghajanian and Rasmussen 1989; Raimondo et al. 2017). Модифікований розчин дозволяв зменшити набрякання нейронів внаслідок зменшення їхньої збудливості, знижував пошкодження верхніх частин зрізу, які контактують з лезом вібротома, та, як наслідок, зменшував кількість втрачених під час підготовки зрізів нейронів.

Скальпелем відокремлювали мозочок, після чого виділену решту мозку закріплювали нетоксичним клеєм у охолодженій камері вібротома (SYS-NVLS, World Precision Instr., США), яку попередньо заповнювали льодяним оксигенованим розчином ACSF, модифікованим для приготування зрізів (2-4 °C). Лезо вібротома фіксували з мінімальним відхиленням по осі Z, що давало змогу зменшити пошкодження структури зрізу (Jonathan T. Ting, Tanya L. Daigle, Qian Chen 2014).

Відомо, що використання захисних розчинів і модифікація використання вібротома значно збільшує кількість живих клітин, а також зменшує пошкодження провідних шляхів синаптичної провідності у підготовлених для експериментальної роботи зрізах (Geiger et al. 2006). Також для того, щоб запобігти перерізанню шляхів синаптичної провідності ми використовували препарати, отримані з поперечних зрізів, які включали енторинальну кору та гіпокамп, підтримуючи тим самим більший ступінь нативних зв'язків, що, в свою чергу, збільшувало ймовірність індукції епілептиформної активності (Dreier and Heinemann 1991).



В експериментах із відведенням зовнішноклітинних потенціалів використовували зрізи товщиною 400-500  $\mu\text{m}$ , щоб збільшити кількість клітин, збережених для певного шляху синаптичної провідності. А при відведенні потенціалів від клітин товщина зрізів була зменшена до 350  $\mu\text{m}$  для покращення проникності світла та збільшення «робочої» площини зріза. Готові зрізи гіпокампа залишали для інкубації протягом 1-2 годин у розчині ACSF у електротермальній термостатичній камері DZKW-4 (Beijing instruments co., LTD) з підтримкою температури на рівні 24-28°C та постійним рівнем оксигенації для імітації фізіологічних умов.

### 2.3 Індукція та реєстрація епілептиформної активності

Наразі існує велика кількість різноманітних тваринних моделей, що включають фармакологічні (наприклад, пілокарпінова чи каїнатна), електричні (наприклад, кіндлінгова модель), генетичні (нокаут певного гену) способи зміни діяльності нервової системи, або ж відтворюють різні способи її ураження (наприклад, модель ЧМТ, гіпоксії, інсульту тощо). В такий спосіб ці моделі імітують різноманітні типи та причини епілепсії у людей. Звичайно, *in vivo* моделі епілепсії, в яких тварини переживають фактичні поведінкові та електроенцефалографічні епілептичні напади, здійснюють це найбільш точно. Однак, біологічні системи нижчого рівня, включаючи зрізи мозку або культури клітин також можуть надати унікальні дані, важливі для дослідження епілепсії.

Зважаючи на складність та багатофакторність епілепсії та її генезу, зростає інтерес саме до *in vitro* моделей цієї патології, які дозволять більш детально дослідити клітинні та молекулярні механізми епілептогенезу, зберігаючи при цьому критичні мережеві фенотипові особливості хвороби, особливо розвиток спонтанних епілептичних нападів. Інтактні препарати гіпокампа або гострі зрізи головного мозку зберігають значну частину необхідних для генерування епілептиформної активності нейромереж

(Schwartzkroin 1986). У даній роботі використовували дві *in vitro* моделі: 4-амінопіридинову та низькомагнієву.

Під час експериментів з реєстрації епілептиформної активності спостерігали тонічні та клонічні явища. Клонічними вважали високоамплітудні події, які мали поодинокий або множинний характер з повторюваною частотою. Тонічними називали низьку за амплітудою активність, яка повторювалась через певний проміжок часу. Тонічні і клонічні явища корелюють з відповідними феноменами ЕЕГ людини, а в дослідженнях *in vitro* можуть характеризувати різні форми епілептиформної активності.

#### *4-амінопіридинова модель епілептиформної активності*

Відомо, що активація калієвих каналів є відповідальною за реполяризацію мембранного потенціалу після фази деполяризації потенціалу дії (Carrasquillo, Burkhalter, and Nerbonne 2012; Mitterdorfer and Bean 2002). Характеристики генерованих потенціалів дії визначаються властивостями калієвих каналів, які експресуються у певному нейроні, а швидкість генерації потенціалу регулюється як відповідь на зміни підпорогового струму.

4-амінопіридин блокує кілька типів калієвих каналів, серед яких найбільш суттєву роль відіграють калієві канали DR та А-типів (Choquet and Korn 1992; Yao and Tseng 1994). Хоча механізм проепілептичної дії 4-амінопіридину все ще вимагає уточнення та подальших досліджень, загальноприйнятою вважається гіпотеза, що пригнічення функції калієвих каналів призводить до збільшення ширини спайків пресинаптичних нейронів через затримку реполяризації та до підвищення концентрації кальцію під час деполяризації нейрона. Як результат, вищенаведені процеси провокують викид нейромедіатора з пулу везикул, за рахунок чого

і генерується епілептиформна активність (Buckle and Haas 1982; Galvan, Grafe, and Bruggencate 1982).

Додавання 4-амінопіридину в зовнішньоклітинний розчин дозволяє провокувати генерацію як інтеріктальної, так і іктальної епілептиформної активності у нервовій тканині (Amakhin et al. 2016). Також було показано, що 4-амінопіридин впливає на роботу ГАМКА-рецепторів, провокуючи генерацію епілептиформної активності за рахунок пригнічення роботи гальмівної синаптичної системи мозку (Gonzalez-Sulser et al. 2011).

#### *Низькомагнієва модель епілептиформної активності*

Низькомагнієва модель епілептиформної активності була розроблена кілька десятиліть тому і вважається класичною моделлю, яка часто використовується для тестування антиепілептичних засобів (Albus, Wahab, and Heinemann 2008; Sombati and DeLorenzo 1995). Іони магнію відіграють важливу роль у активації НМДА-рецепторів, оскільки блокують пору NR1 субодиниці НМДА-рецептора, таким чином усунення даних іонів супроводжується активацією рецепторів.

Відтак, зміна концентрації магнію в позаклітинному середовищі дозволяє впливати на збуджувальну синаптичну систему мозку. Водночас дефіцит магнію *in vivo* підвищує чутливість нервових мереж до проконвульсивної стимуляції та навіть може спричинювати епілептичні напади у людини. Існують свідчення про те, що концентрація іонів магнію у сироватці крові та у спинно-мозковій рідині менша у пацієнтів, що страждають на генералізовану епілепсію з тонічно-клонічними випадками. Крім того, внутрішньовенне введення солей магнію справляє антиконвульсивний ефект у тваринних моделях епілепсії та часто використовується для припинення епілептичних нападів, особливо у жінок з еклампсією. Низькомагнієва модель епілептиформної активності вважається еквівалентом стійкого до антиепілептичних препаратів

епілептичного статусу. Механізм індукції та підтримання епілептиформної активності в низькомагнієвій моделі є добре дослідженим (Fujiwara-Tsukamoto, Isomura, and Takada 2006; Gutiérrez et al. 1999).

Генерація епілептиформної активності у ній залежить від фасилітації НМДА-рецепторів за рахунок відривання магнієвого блоку пори рецептора та зменшення екрануючого впливу поверхневого заряду біля потенціалкерованих каналів внаслідок зменшення кількості позитивно заряджених іонів магнію у позаклітинному розчині (Raimondo et al. 2017). Епілептиформну активність у низькомагнієвій моделі можна спинити протягом початкової фази генерації епілептиформних явищ шляхом фармакологічної блокади НМДА-рецепторів або відновленням концентрації позаклітинного магнію. В той же час, протягом пізньої фази генерації епілептиформних явищ як блокада НМДА-рецепторів, так і відновлення концентрації позаклітинного магнію не призводять до пригнічення викликаної епілептиформної активності.

Відомо, що зниження позаклітинної концентрації кальцію та магнію підвищує збудливість нейронів, зменшуючи екранування поверхневого заряду мембрани і полегшуючи тим самим активацію внутрішніх струмів (Frankenhaeuser and Hodgkin 1957; Llinás, Sugimori, and Cherksey 1989; Mayer, Westbrook, and Guthrie 1984). Оскільки  $Mg^{+}$  також блокує внутрішні кальцієві струми у пре- та постсинаптичних мембранах, зниження концентрації магнію провокує цілком очікуваний ефект (Gillessen, Budd, and Lipton 2013; John J. Hablitz 1985; Katz and Miledi 1968). Як уже було зазначено, зменшення концентрації магнію повинно видалити залежний від напруги магнієвий блок НМДА-рецепторів (Ault et al. 1980; Crunelli and Mayer 1984; Gillessen, Budd, and Lipton 2013; M. L. Mayer and Westbrook 1985; Mark L. Mayer, Westbrook, and Guthrie 1984; Nowak et al. 1984). НМДА-рецептори зазвичай активуються власними нейромедіаторами,

глутаматом та/або аспартатом і широко поширені в ЦНС (Alger and Nicoll 1980; Ayala et al. 1973; Monaghan and Cotman 1985; Watkins and Evans 1981).

Також, показані ефекти активації НМДА-рецепторів у нейронах різного типу та продемонстрована антагоністична дія органічних сполук та двовалентних катіонів (Collingridge, Kehl, and McLennan 1983a; Crunelli and Mayer 1984; Flatman, Schwindt, and Crill 1986; J. J. Hablitz and Langmoen 1986; Herron et al. 1985; Herron, Williamson, and Collingridge 1985; Mark L. Mayer and Westbrook 1987; Watkins and Evans 1981). Ці рецептори не обов'язково беруть участь у нормальній синаптичній передачі, проте їх активація може лежати в основі пластичних змін нейрональної активності мозку (Bliss and Collingridge 1993; Collingridge, Kehl, and McLennan 1983b; J. J. Hablitz and Langmoen 1986; Karnam et al. 2009; Morris et al. 1986). Оскільки різні антагоністи НМДА-рецепторів мають потужні протиепілептичні властивості, активація НМДА-рецепторів, в свою чергу, може суттєво сприяти епілептогенезу (Croucher, Collins, and Meldrum 1982; Czuczwar and Meldrum 1982; Derchansky et al. 2004; Dingleline, Hynes, and King 1986; John J. Hablitz 1985; Herron, Williamson, and Collingridge 1985; Walker MC, White HS 2002).

Останнє відбувається унаслідок як активації НМДА-рецепторів, так і зменшення екрануючого поверхневого заряду; низька концентрація позаклітинних двовалентних катіонів може підвищити збудливість нейронів до рівня, який індукує та підтримує аномальні форми синхронізованої активності нейронів. Наприклад, в гіпокампі показано, що зниження концентрації катіонів кальцію підвищує епілептиформну активність в області CA1, яка зберігається і навіть поширюється за відсутності хімічної синаптичної передачі (Jefferys and Haas 1982; Konnerth, Heinemann, and Yaari 1984; Taylor and Dudek 1982; Yaari,

Konnerth, and Heinemann 1983). Подібним чином низька концентрація магнію призводить до повторної активації пірамідних нейронів у відповідь на синаптичну активацію (Coan and Collingridge 1985; Herron et al. 1985).

З метою з'ясування ролі знижених концентрацій двовалентних катіонів у генерації епілептиформної активності вивчено вплив низької концентрації магнію на збудливість нейронів у зрізах гіпокампа. Було показано, що видалення  $Mg^{+}$  з позаклітинного розчину посилює стимульовану активність, збільшує вивільнення кальцію з кальцієвих депо, викликане повторюваною стимуляцією, а також призводить до розвитку спонтанних епілептиформних розрядів і поширення синаптичної депресії (Mody, Lambert, and Heinemann 1987), ймовірною причиною чого є звільнення НМДА-рецепторів від інгібуючої дії магнію та незначне зменшення екрануючого поверхневого заряду генерують (Mody, Lambert, and Heinemann 1987).

Ці результати показують, що зниження концентрації магнію не лише стимулює генерацію епілептиформної активності, але і змінює характеристики полегшення в умовах парної стимуляції, підсилює зміни у концентрації кальцію та призводить до індукції поширення синаптичної депресії шляхом повторюваної стимуляції. Оскільки ці події відбуваються, незважаючи на збережені інгібуючі механізми, в основі зміненої збудливості нейронів за відсутності магнію можуть лежати наступні ефекти:

- зниження ефекту, який  $Mg^{2+}$  зазвичай справляє на пре- та постсинаптичний вхід  $Ca^{2+}$  з кальцієвих депо (Catterall 2011; Katz and Miledi 1968; Llinás, Sugimori, and Cherksey 1989);
- зниження поверхневого заряду, що сприяв би генерації потенціалів дії (Ashley and Lui 2020; Lüttgau and Glitsch 1976; McLaughlin, Szabo, and Eisenman 1971);

- видалення потенціал-залежного від напруги магнієвого блоку НМДА-рецепторів (Ault et al. 1980; Crunelli and Mayer 1984; M. L. Mayer and Westbrook 1985; Mark L. Mayer, Westbrook, and Guthrie 1984; Nowak et al. 1984).

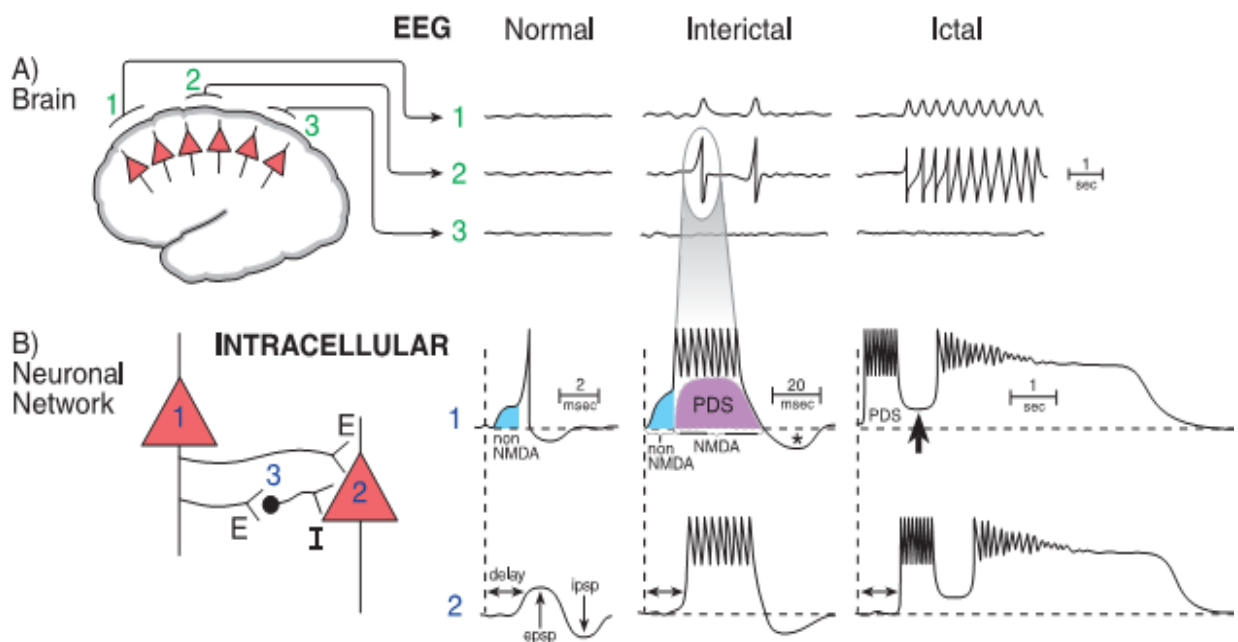
Спонтанні епілептиформні розряди в середовищі, вільному від  $Mg^{2+}$ , генеруються нейронами в області CA3 і поширюються через колатералі Шаффера в область CA1. Перехідні процеси потенціалів в зоні CA3 складаються з повторюваної та синхронізованої активності популяції нервових клітин і продукуються внаслідок внутрішньоклітинних пароксизмальних деполяризаційних зсувів. При цьому пароксизмальний деполяризаційний зсув у першому нейроні може активувати схожий пароксизмальний деполяризаційний зсув у наступному нейроні, який, в свою чергу, здатний активувати наступний нейрон, таким чином, залучаючи до синхронної активності цілу нейронну мережу (рис. 2.1.).

Спонтанні події в зоні CA1 гіпокампа не є пароксизмальними зрушеннями деполяризації, а спричинені послідовностями збуджувальних та/або гальмівних постсинаптичних потенціалів. Відсутність внутрішньоклітинних пароксизмальних деполяризаційних зсувів та синхронізованих реакцій на активність в області CA1 гіпокампа можуть бути пов'язаними з сильним гальмуванням прямої передачі після активації колатералей Шаффера (Alger and Nicoll 1980; Fujita and Sakata 1962).

Тим не менше, з огляду на генерацію тривалих сплесків активності та повторюваний файринг нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляцію, ймовірність генерації епілептиформної активності в середовищі, вільному від катіонів магнію, також посилюється в зоні CA1 гіпокампа. Для багатьох моделей епілепсії та епілептиформної активності наведено дані, що зона CA3 гіпокампа також є схильною до виникнення епілептиформної активності.

Це відбувається завдяки зниженню функції гальмівної системи та присутності пірамідних клітин, здатних до внутрішньої генерації спалаху активності, а також існуванню нейронних зв'язків, які генерують повторюване збудження нейронної мережі ином, незважаючи на збережене синаптичне гальмування та інші гальмівні механізми, за відсутності магнію у позаклітинному середовищі переважні збудливі події можуть викликати спонтанну повторювану активність таких нейронів. Завдяки полегшенню залежних від  $\text{Ca}^{2+}$  або  $\text{Na}^{+}$  потенціалів дії та, як наслідок, посиленню поглинання пресинаптичного кальцію при видаленні магнію з позаклітинного середовища, поступово виділяється більше нейромедіатора, і, нарешті, достатня кількість пірамідних клітин залучається до активації

### Abnormal Neuronal Firing



**Рисунок 2.1. Аномальна активність на рівні А) мозку та В) спрощеної нейронної мережі, яка складається з двох пірамідних нейронів гіпокампа (1, 2) та одного інтернейрона (3). За нормальних умов,**



**активність нейронів не синхронізована та має низьку амплітуду. За інтеріктальних умов спостерігається синхронна активація великої популяції перезбуджених нейронів. За іктальних умов спостерігаються довготривалі спайки. На рівні нейронної мережі, співвідношення інтеріктальних спайків називається «судомним деполяризаційним зсувом» (С. Е. Stafstrom 1998).**

Зменшення порогу генерації збуджуючого постсинаптичного потенціалу та посилення стимул-індукованої кальцієвої активності у вільному від катіонів  $Mg^{2+}$  позаклітинному середовищі, як правило, сприяють цій гіпотезі. Було показано, що спонтанні потенційні перехідні процеси, індуковані відсутністю катіонів магнію в позаклітинному середовищі в областях СА1 та СА3 гіпокампа були оборотно послаблені або навіть заблоковані антагоністом НМДА-рецептора, 2-APV. Таким чином, активація НМДА-рецепторів також є критичним фактором генерації епілептиформної активності.

#### **2.4 Методика електрофізіологічної реєстрації**

Позаклітинну реєстрацію здійснювали шляхом відведення потенціалів від сукупної оточуючої популяції нейронів з СА1 та СА3 зон гіпокампа. Запис синхронізованої активності клітин проводили за допомогою скляних мікроелектродів з опором 1-3 МОм, заповнених ACSF із використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму (Patch-clamp 501a, Warner instrument corporation, США; смугопрпускання 0,1 Гц - 1 кГц; коефіцієнт підсилення 100). Записи оцифровували із використанням аналогово-цифрового перетворювача (NI PCI-6221, National Instruments, США) та накопичували за допомогою програми WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Велика Британія).

Електричний контакт з підсилювачем підтримувався за допомогою хлор-срібного електроду (AgCl). За допомогою мікроманіпулятора скляний мікроелектрод розташовували у клітинному шарі гіпокампа на глибині не менше ніж 50  $\mu\text{m}$  від поверхні зрізу.

Вимірювання потенціалів дії, спонтанних гальмівних та збуджувальних постсинаптичних струмів у нейронах гіпокампа (рис.2.2) здійснювали з використанням методу фіксації потенціалу на обмеженій ділянці клітинної мембрани («петч-клемп»), запропонованого Неєром та Сакманом (Neher and Sakmann 1976a, 1976b). Метод полягає у використанні підсилювача електричних сигналів у схемі зі зворотнім зв'язком, що дає змогу контролювати мембранний потенціал і одночасно проводити реєстрацію трансмембранних іонних струмів. Такі експерименти можливі завдяки здатності скляного мікроелектрода утворювати щільний контакт з поверхнею клітинної мембрани – так званий «гігаомний контакт» (контакт з високим опором, 1-100 ГОм).

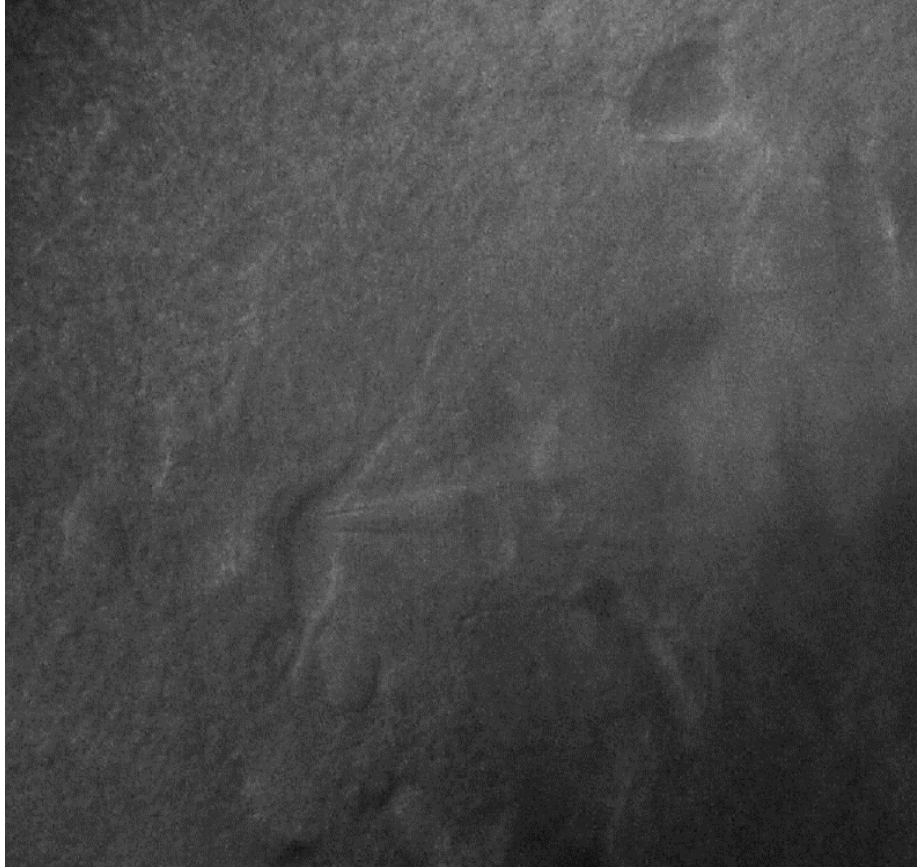
Для реєстрації в режимі “петч-клемп у контакті з клітиною” (cell-attached) після утворення контакту клітинна мембрана не проривається. Така конфігурація дозволяє проводити реєстрацію та аналіз потенціалів дії, що спостерігаються на інтактній мембрані.

Для роботи у режимі «ціла клітина», після утворення щільного контакту ділянку мембрани проривають за допомогою зміни тиску всередині скляного мікроелектрода, внаслідок чого встановлюється контакт з низьким опором між підсилювачем та внутрішньою частиною клітинної мембрани, що дає змогу одночасно підтримувати мембранний потенціал та вимірювати трансмембранний іонний струм.

Для проведення дослідів використовували експериментальне обладнання для реєстрації іонних струмів на базі мікроскопа Olympus. Для вимірювання мембранних потенціалів і трансмембранних струмів було

застосовано підсилювач Patch-clamp 501a (Warner instrument corporation, США; смугопропускання 0.1 Гц - 1 кГц; коефіцієнт підсилення 100).

Для реєстрації потенціал-керованих струмів використовували режим фіксації потенціалу. У залежності від мети і типу струму, застосовували різні протоколи підтримання мембранного потенціалу у межах від -70 мВ до 0 мВ.



**Рис. 2.2. Репрезентативне зображення нейрона з підведеним до нього скляним мікроелектродом.**

Для дослідження специфіки викликаної електричної активності клітин гіпокампа в умовах зміни складу зовнішньо-клітинного розчину використовували режим фіксації струму.

Збуджувальні постсинаптичні струми (ЗПС) викликалися за допомогою біполярного стимулювального електроду, який розташовували у зоні колатералей Шаффера. Стимуляцію здійснювали з використанням

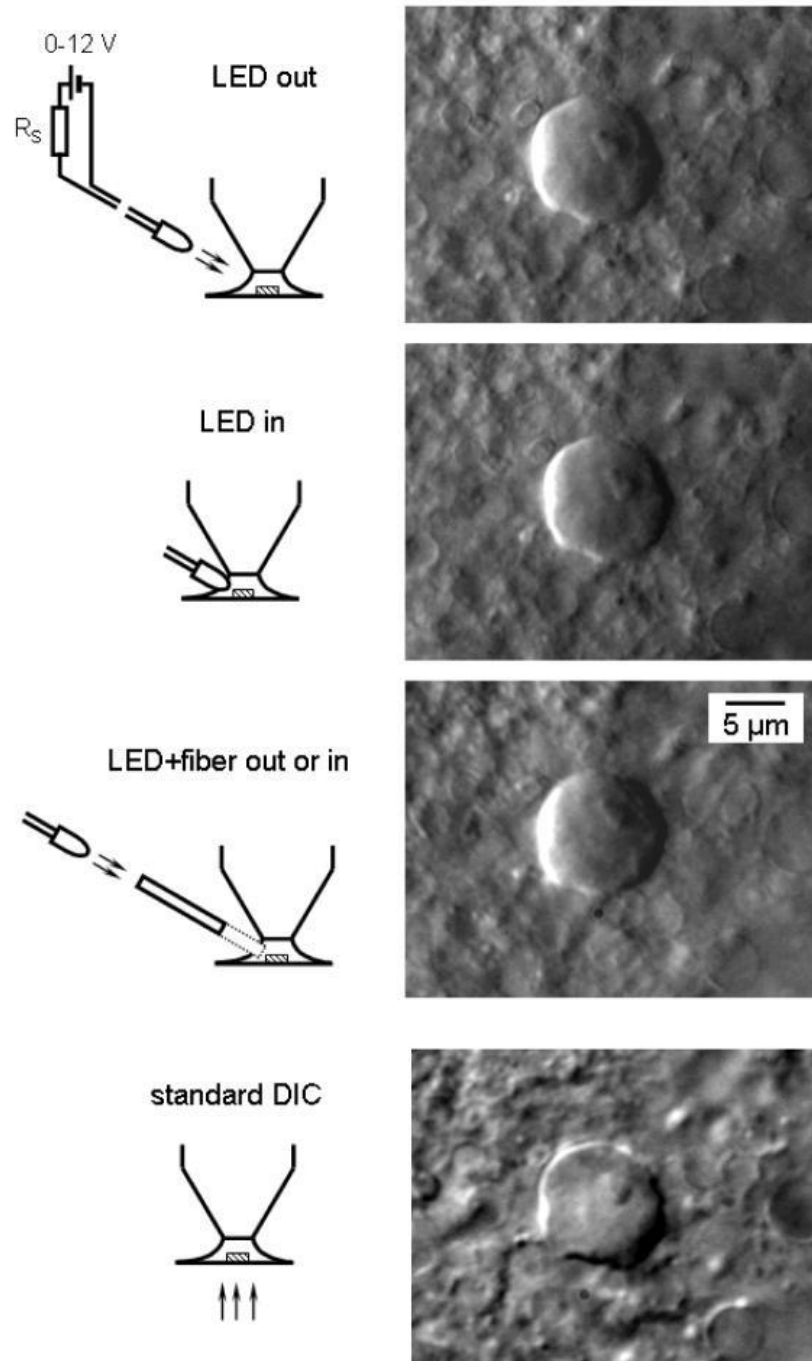
пристрою ISO-Flex з частотою 0.05 Hz та з амплітудою стимуляції на рівні 30-50% від максимальної відповіді зрізу.

## **2.4 Оптична система**

Клітинна візуалізація зрізів мозку з використанням вертикального мікроскопа у поєднанні з методикою клітинної фіксації є потужним інструментом у дослідженні нейронів у їх природному стані. (Edwards et al. 1989; Pinto, Safronov, and Sz 2009)

В експериментальній камері світло, що проходить через тканини зрізу та зовнішньо-клітинний розчин, частково розсіюється, що, в свою чергу, впливає на якість візуалізації клітин. Загальновідомими шляхами покращення візуалізації та отримання зображення вищої якості вважаються або за зменшення товщини зріза, або застосування додаткового обладнання з використанням інфрачервоної оптики. Необхідність використання тонших зрізів накладає суттєві обмеження у дослідженнях синаптичної пластичності та епілептиформної активності. Водночас, використання інфрачервоної оптики хоча і зменшує розсіювання світла в тканині, але в той же час знижує роздільну здатність зображення (Alberts et al. 2008; Dodt and Zieglg 1990; Macvicar 1984; Nashmi et al. 2002).

Тому в наших дослідженнях ми використали методику, яка за допомогою використання світлодіодної схеми дозволяє отримати якісне та чітке візуальне зображення клітин у зрізах без зменшення їх товщини (рис. 2.3.) (Safronov, Pinto, and Derkach 2009).



**Рис. 2.3.** Схема розміщення джерела світла відносно експериментальної камери та площини зрізу та приклад отримуваних завдяки використаній світлодіодній схемі зображень. Освітлення площини зрізу з використанням даної схеми дозволяє отримати більш чітке та об'ємне зображення, що спрощує подальші мікроелектродні

## **маніпуляції та дозволяє отримати якісну візуалізацію без зменшення товщини зрізів.**

Використана світлодіодна схема складається з світлодіода з вузьким кутом променя (10-20°), джерела живлення та резистора. Світлодіод розміщували на мікроманіпуляторі, що давало можливість регулювати положення джерела світла та нахил світлового променя відносно об'єкта дослідження.

Показано, що якісне зображення можна отримати, регулюючи кут освітлення світлодіода від 0° до 50°, водночас найкраще зображення отримували при регулюванні кута від 20° до 40°, тому для наших досліджень світлодіод був розміщений під цим кутом до горизонтальної вісі (Pinto, Safronov, and Sz 2009; Safronov, Pinto, and Derkach 2009).

Під час експерименту з використанням світлодіодної схеми камера фокусувалася на клітинному шарі при звичайному світлі, після чого освітлення перемикалося на світлодіодне, що, в свою чергу, дозволяло отримати більш об'ємне зображення для зручної роботи з нейронами.

Ця схема дозволила нам отримати якісне зображення нейронів гіпокампа та підвищити кількість успішних дослідів з використанням методики клітинної фіксації в конфігурації ціла клітина.

### **2.5 Електрофізіологічне обладнання**

Позаклітинне відведення потенціалів здійснювали з використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму A-M Systems 1700 (Sequim, WA, USA) на базі стереоскопічного мікроскопу МБС-10, закріпленого на металевому каркасі з двома трьохосьовими мікроманіпуляторами.

Для експериментів з відведення струму та потенціалів від цілої клітини використовували петч-клемп підсилювач PC-501A (Warner

instrument corporation, США; смугопропускання 0.1 Гц - 1 кГц; коефіцієнт підсилення 100).

Під час електрофізіологічних реєстрацій гострі зрізи гіпокампа розміщували в термостатичній камері повністю зануреного проточного типу (Warner Instrument Corp., США), де вони постійно перфузувались оксигенованим ACSF з можливістю регуляції швидкості перфузії від 1 до 5 мл/хв та підтримкою температури на рівні 30-32°C.

Скляні мікроелектроди готували на спеціалізованому пулері (Sutter Instruments, P-97, США), з використанням боросілікатних скляних філаментів з зовнішнім та внутрішнім діаметром відповідно 1.5 мм і 0.86 мм та довжиною 10 см виробництва Sutter Instruments (США), вибір товщини філаментів пов'язаний з їх подальшим використанням у дослідженнях за зрізами мозку. Кінчик скляного мікроелектрода мав діаметр 1-2 мкм, опір при заповненні розчином складав 3-5 МОм. У залежності від типу досліджень, розчин, яким був заповнений мікроелектрод, мав різний склад (Таблиця 2.1-3). Рівень рН розчину у електроді утримувався на рівні 7.3-7.4 рН, а осмолярність складала 290-310 мОсм.

Перед зануренням мікроелектрода до камери у піпетку за допомогою системи подачі повітря створювався позитивний тиск, який підтримувався до моменту утворення контакту з мембраною клітини. Опір контролювався за допомогою прямокутних гіперполяризуючих імпульсів амплітудою 5 мВ у режимі фіксації потенціалу. Після контакту мікроелектрода з клітиною позитивний тиск змінювався на негативний до моменту утворення щільного контакту з мембраною. Отримавши гігаомний контакт, ми проводили компенсацію ємності мікроелектрода та переходили до конфігурації «ціла клітина» завдяки прориву мембрани, подаючи додатковий негативний тиск.

Отримані записи оцифровували з використанням аналого-цифрового перетворювача (BNC-2090A, NI PCI-6221, National Instruments, США) та накопичували за допомогою програми WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Велика Британія) для подальшого аналізу.

## 2.6 Детектування і аналіз отриманих даних

Детектування отриманих під час дослідів даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Clampfit software 11.0.3 (The Axon™ pCLAMP™ Software Suite). Пошук і аналіз подій здійснювали в залежності від типу даних і конфігурації, у який здійснювався запис електрофізіологічної активності нейронів гіпокампа. При автоматичному аналізі, який здійснювався підбором протоколу пошуку подій, які значно перевищували рівень шуму системи (3-5 pA), отримані результати перевіряли на наявність артефактів та хибно позитивних подій.

Епілептиформні явища при відведенні польового потенціалу, спонтанні збуджувальні та гальмівні потенціали у режимі фіксації потенціалу аналізували за:

- частотою
  - кількість подій протягом етапу експерименту
  - кількість подій за весь час реєстрації;
- міжінтервальною частотою
  - час між двома послідовними явищами;
- амплітудою;
- типом явищ
  - клонічні
  - тонічні.



## 2.7. Статистичний аналіз результатів

Для перевірки гіпотези нормальності розподілу експериментальних даних використовували тест Колмогорова-Смірнова. Усі отримані дані відповідали критерію нормальності. В роботі вони представлені у вигляді «середнє значення  $\pm$  стандартна похибка середнього». Визначення розбіжності між вибірками здійснювали за допомогою двовибіркового парного або непарного t-тестів Стьюдента.

Рівень значущості у всіх статистичних тестах було встановлено на рівні  $p < 0.05$ .

Після результатів наводили також значення числа експериментів (n), яке дорівнювало кількості клітин або кількості зрізів у електрофізіологічних дослідженнях.

## 2.8. Розчини та реактиви

Для розчинів, які застосовували у експериментальній роботі, використовували деіонізовану воду з високим опором (близько 10 МОм $\times$ см). Кислотність усіх розчинів контролювали з використанням рН-метра Cyberscan 510 рН з температурним сенсором.

Питомого значення рН досягали за допомогою додавання у розчин стокового розчину NaOH для зовнішньоклітинних, та стокового розчину KOH або CsOH/CsCl для внутрішньоклітинних розчинів. Точність вимірювання складала 0.01 рН.

*Таблиця 2.1.*

**Склад базового розчину ACSF (мМ)**

NaCl	125
KCl	3,5

CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub>	1,3
NaHCO <sub>3</sub>	24
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
Глюкоза	11
pH	7,35

*Таблиця 2.2.*

**Склад модифікованого базового розчину ACSF (мМ) для приготування зрізів мозку.**

NMDG	92
KCl	2,5
CaCl <sub>2</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub>	10

NaHCO <sub>3</sub>	24
HEPES	20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
Глюкоза	25
pH	7,35

Таблиця 2.3.

**Склад розчину (мМ) з виключенням MgCl<sup>2+</sup> для індукування епілептиформної активності.**

NaCl	125
KCl	3,5
CaCl <sub>2</sub>	2,0
NaHCO <sub>3</sub>	24
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25

Глюкоза	11
pH	7,35

Для дослідів з використанням 4-амінопіридинової моделі епілептиформної активності до зовнішньоклітинного розчину додавали блокатор калієвих каналів 4-амінопіридин (Sigma, США) у концентрації 50  $\mu$ моль/л розчину.

Під час реєстрації гальмівних та збуджувальних потенціалів в режимі фіксації потенціалу до зовнішньоклітинного розчину додавали селективний блокатор протон-чутливих іонних каналів 5b, розроблений в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця (Buta et al. 2015) у концентраціях від 100 нМ до 1 мМ. Також у досліді використовували блокатори ГАМК, АМПА та НМДА рецепторів (Sigma, США)

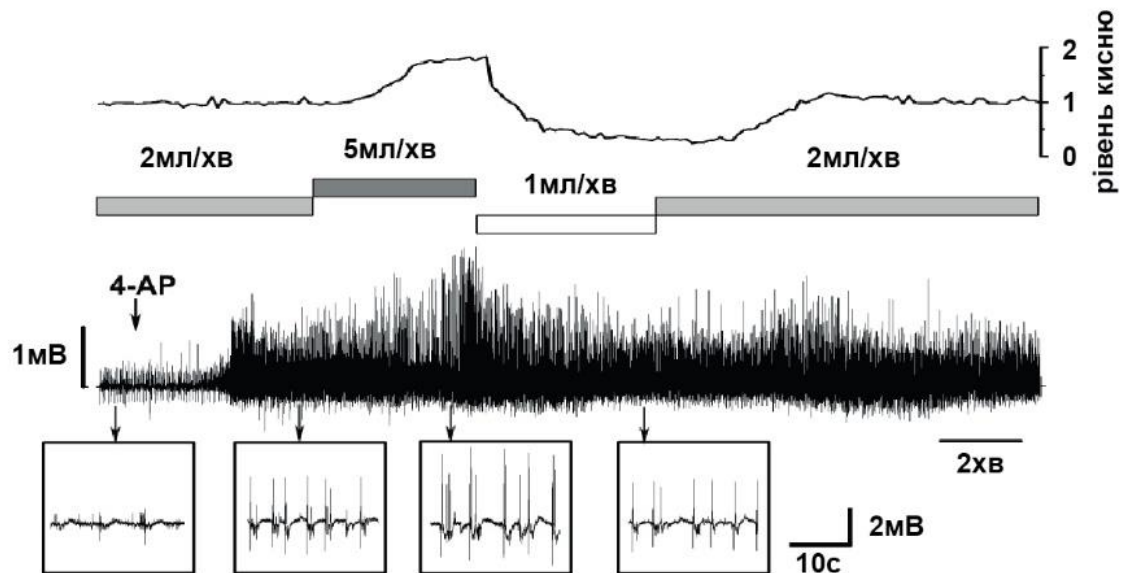
### РОЗДІЛ 3

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

##### **3.1. Визначення оптимальних параметрів перфузування та оксигенації для дослідження епілептиформної активності гіпокампа**

Гострі зрізи гіпокампа вважаються найбільш добре дослідженим об'єктом для вивчення епілептиформної активності *in vitro*. Із використанням 4-амінопіридинової моделі індукції епілептиформної активності ми вивчали вплив оксигенації на модуляцію епілептиформних явищ під час експерименту з використанням методу позаклітинного відведення потенціалів (рис. 3.1). З літературних джерел відомо, що

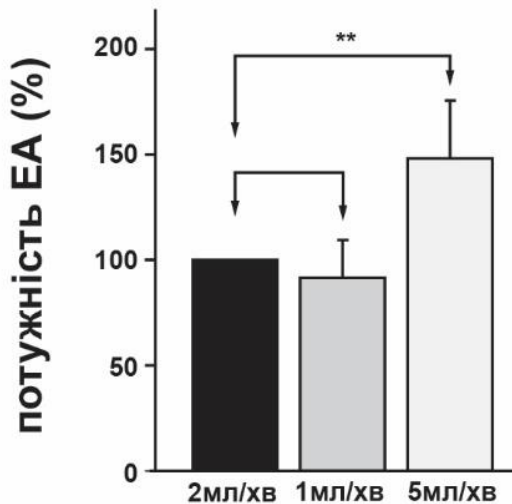
швидкість перфузії у експериментальній камері може модифікувати характер та параметри відповіді нейронів.



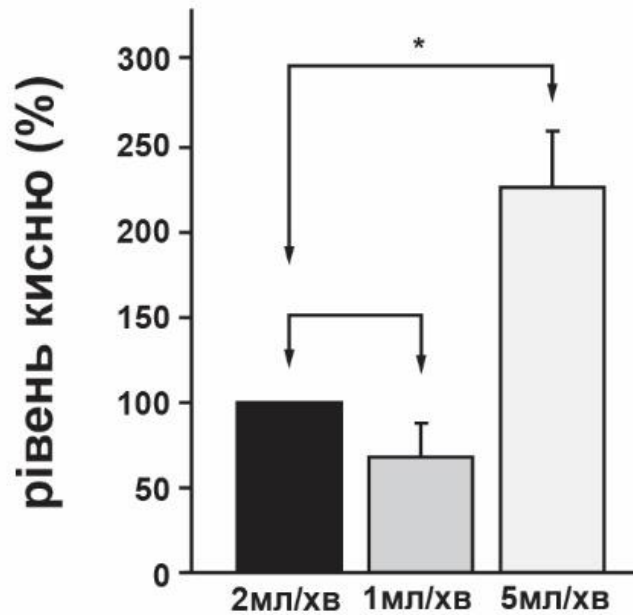
**Рис. 3.1. Вплив зміни швидкості перфузії на викликану ЕА у СА1 зоні гіпокампа мозку щура. На рисунку зображено приклад активності під час протоколу зміни швидкості потоку ACSF. Зверху позначена крива кисню яка фіксувалася електродом розміщеним у середині зрізу на глибині 150 мкм від поверхні. Знизу наведені приклади польових потенціалів з кожного етапу експерименту.**

Тому важливою частиною роботи, що передує проведенню дослідження, є визначення оптимальних експериментальних умов, які будуть найбільш точно відповідати фізіологічним показникам. В такий спосіб ми виявили, що зміна швидкості перфузії у діапазоні від 1 до 5 мл/хв чинить суттєвий вплив на частотні та амплітудні характеристики епілептиформної активності, індукованої у зрізах мозку.

Також нами було показано позитивний зв'язок між потужністю епілептиформної активності, індукованої 4-амінопіридином та вмістом кисню у зрізі мозку (рис. 3.2). Під час протоку рідини через електрофізіологічну камеру зі швидкістю 1, 2 та 5 мл\хв ми фіксували середню потужність епілептиформної активності на рівні  $97.1 \pm 17.2$  мкВ,  $104.8 \pm 23.7$  мкВ та  $156.1 \pm 28.1$  мкВ відповідно (n= 10).

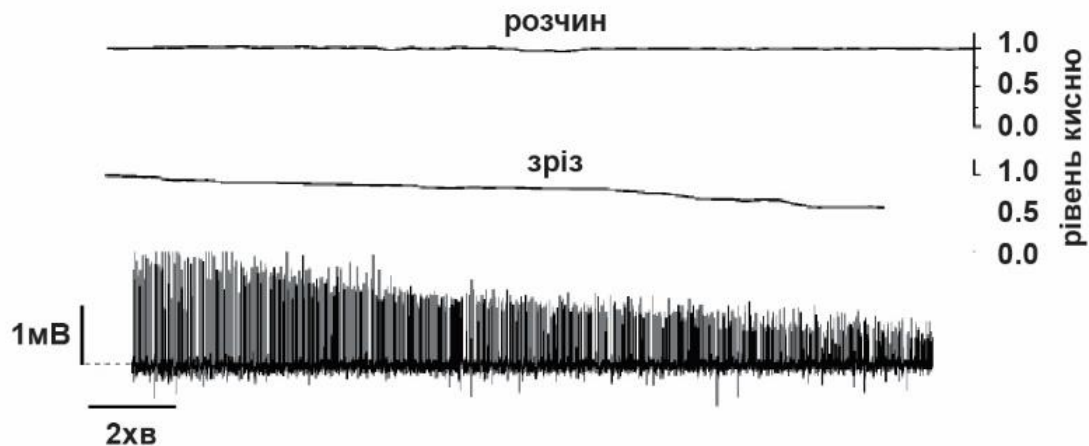


**Рис 3.2. Середній рівень потужності епілептиформної активності при зміні швидкості протоку розчину. Порівнюючи дані, отримані при швидкості перфузії 2 мл/хв та 5 мл/хв ми отримали достовірну статистичну різницю  $p = 0,009$  (тест Стьюдента), між 1 мл\хв та 2 мл\хв ми не спостерігали достовірної різниці у зміні потужності епілептиформної активності ( $p=0,37$ ). Дані представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього. **\*\*P < 0,001.****



**Рис 3.3. Залежність рівня оксигенації зрізу від швидкості перфузії. Рівень оксигенації достовірно підвищується при збільшенні швидкості потоку до 5 мл/хв., в той же час спостерігається недостовірне зниження рівня оксигенації для швидкості потоку 1 та 2 мл/хв. Дані представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього. \*  $P < 0,05$**

Отримані дані показують, що нормобаричний гіпероксигенований розчин ACSF (95%  $O_2$ , 5%  $CO_2$  за умови нормального атмосферного тиску) в умовах швидкості потоку 2 мл/хв забезпечує постійний рівень насичення позаклітинного розчину киснем та підтримує сталий рівень оксигенації у зрізі на глибині 100-150 мкм (рис. 3.3-5).

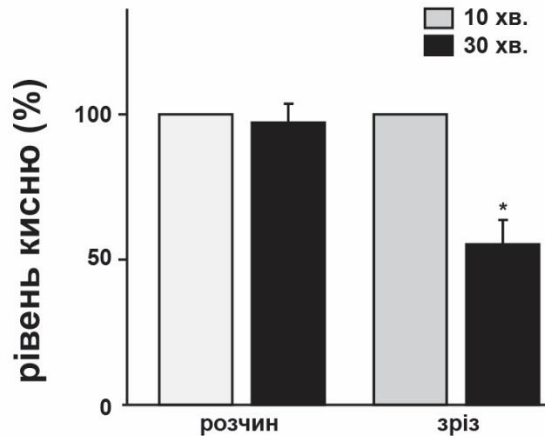


**Рис.3.4. Зміни рівня кисню, при сталих умовах, у зовнішньому розчині 100-150  $\mu\text{m}$  над поверхнею та на глибині 100  $\mu\text{m}$  у середині зрізу.**

Ці результати підтверджують попередні дослідження профілю кисню в тканинах зрізу мозку при різних швидкостях перфузії і концентрації кисню під час досліду (Kann et al. 2011; Mulkey et al. 2001).

Ми припускаємо, що вираженість фармакологічно індукованої епілептиформної активності *in vitro* визначається багатьма складовими, які залежать від умов проведення досліду, до яких можна віднести насиченість розчину киснем, швидкість потоку рідини через електрофізіологічну камеру та положення електрода у зрізі мозку. Враховуючи отримані дані, проведення електрофізіологічного експерименту на занурених зрізах мозку з проточною системою подачі позаклітинного розчину потребують сталої швидкості потоку позаклітинного розчину у системі для правильної інтерпретації отриманих під час дослідження результатів.





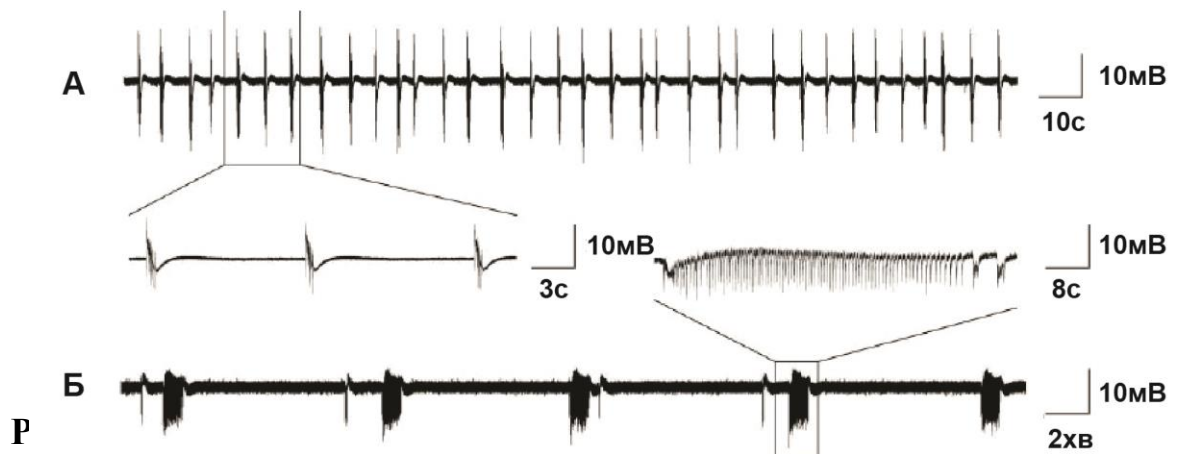
**Рис. 3.5. Гістограма рівню вмісту кисню у зовнішньоклітинному розчині та всередині зрізу через 10 хв та 30 хв після появи епілептиформних явищ, індукованих додаванням 4-амінопіридину до розчину ACSF. Дані нормовані до значень через 10 хв. \* -  $p < 0.05$**

Результати підрозділу 3.1 опубліковані у роботах (Sydorenko et al. 2016).

### **3.2. Дослідження епілептиформних подій, генерованих у гіпокампі**

Гіпокамп є однією з найбільш вразливих структур під час розвитку скроневої епілепсії (СЕ), яка, в свою чергу, вважається найбільш розповсюдженою формою даного захворювання, фокус виникнення якої зосереджується у таких структурах лімбічної системи, як гіпокамп, скронева кора та мигдалеподібний комплекс (Di Maio 2014; T'eliez-Zenteno and Hern'andez-Ronquillo 2012). Одним з шляхів лікування фармакологічно-резистентної епілепсії є видалення структури або частини структури, у якій зосереджений такий фокус. Хірургічне видалення

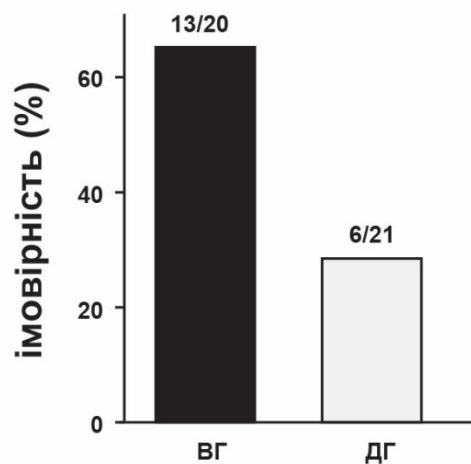
гіпокампа призводить до зменшення або повного припинення епілептичних нападів (McNamara 1994). Тому розуміння механізмів генерації та поширення епілептиформної активності у гіпокампі має ключове значення для пошуку нових протиепілептичних препаратів. У більшості досліджень, пов'язаних з дослідженням епілептоформних явищ у гіпокампі, останній розглядається як цілісна унітарна структура, але водночас існує велика кількість доказів, які свідчать про те, що окремі ділянки гіпокампа мають істотну різницю в молекулярній, клітинній та гістологічній організації і, як наслідок, мають відмінні функціональні особливості (Barkus et al. 2010; Fanselow and Dong 2010; C. Papatheodoropoulos and Kostopoulos 2000).



**НИЗЬКА** системою на зображенні в епілептичному нападі вентрального гіпокампа. Іктальні події у зрізі вентрального гіпокампа (А) з окремо винесеною частиною запису у розширеному масштабі. Інтеріктальні події, отриманий з зрізу дорзального гіпокампа (Б).

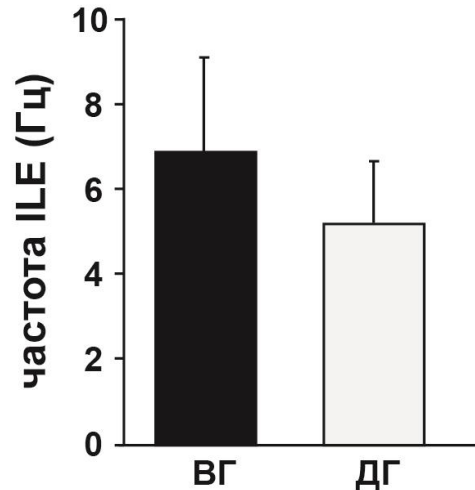
Було показано, що вентральний гіпокамп є більш чутливим до аномальної синхронізації, а дорзальна частина гіпокампа більш стійка до викликаних епілептоформних явищ (Fanselow and Dong 2010; Geiger et al. 2006; Isaeva et al. 2016; C. Papatheodoropoulos, Moschovos, and Kostopoulos

2005; Costas Paratheodoropoulos et al. 2002). Ця різниця між вентральною та дорзальною частиною гіпокампа може бути частково пояснена різницею експресії рецепторів у різних частинах гіпокампа (Pandis et al. 2006). Встановлено, що молодий мозок більш чутливий до епілептичних нападів порівняно з мозком дорослої тварини. Серед факторів, які можуть сприяти підвищенню вразливості до генерації судом, основними вважаються зміни в експресії рецепторів глутамату.



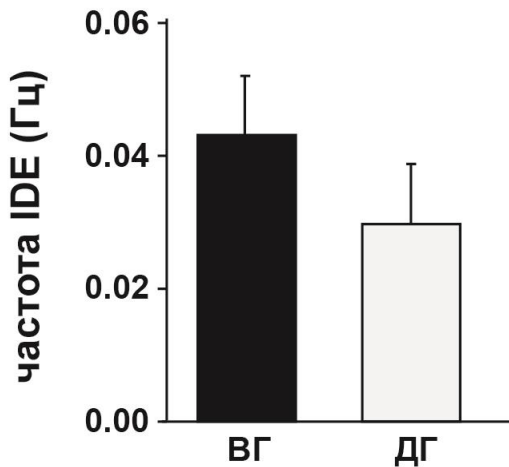
**Рис. 3.7 Вірогідність виникнення ЕА у зрізах вентральної (ВГ) і дорзальної (ДГ) частин гіпокампа.**

Для перевірки різниці характеристик викликаної епілептиформної активності вентральної та дорзальної частин гіпокампа використовували гострі зрізи гіпокампа щурів віком від 12 до 14 днів. Ефект досліджували з використанням базового розчину ACSF, з якого вилучався  $MgCl_2$ , що за літературними даними підвищує збудливість нервових мереж та дає можливість спостерігати епілептиформну активність у досліджуваних ділянках мозку (рис. 3.6-8) (Fujiwara-Tsukamoto, Isomura, and Takada 2006).



**Рис. 3.8. Частота іктальних подій в зрізах вентральної та дорзальної частин гіпокампа.**

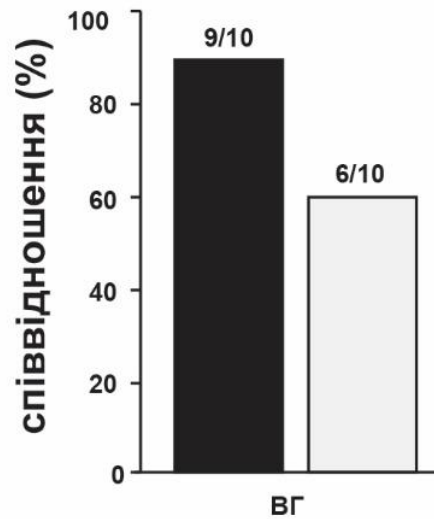
Польові потенціали електрографічної викликаної епілептиформної активності, отримані з пірамідного шару СА1 зони клітин гіпокампа, були використані для порівняння спонтанної епілептиформної активності у дорзальних та вентральних зрізах цієї структури (рис. 3.6). Нами було отримано два патерни епілептиформної активності: іктальні (рис. 3.8) та інтеріктальні епілептоформні події (рис. 3.9). Інтеріктальні події мали спонтанний характер зі зміною своєї частоти протягом усього часу перфузування зрізів розчином з низьким вмістом  $Mg^{2+}$ . Іктальні події в свою чергу характеризувалися однаковою частотою епілептиформних явищ та однаковим часом між їх появою.



**Рис. 3.9. Частота виникнення інтеріктальних подій в зрізах вентральної та дорзальної частин гіпокампа.**

Аналіз отриманих даних позаклітинного відведення потенціалів від СА1 зони гіпокампа показав що 65% зрізів вентрального гіпокампа (n=20) генерують епілептиформну активність в умовах перфузування розчину з низьким вмістом  $Mg^{2+}$ , а зрізи дорзальної частини гіпокампа (n=21) у 28%. (рис 3.7.). Водночас аналіз частоти епілептиформної активності гіпокампа показав, що іктальні явища мали частоту від 4 до 10 Гц, а сплески активності фіксувалися кожні 2-8 хвилин без істотної різниці між зрізами дорзальної та вентральної частин гіпокампа. У свою чергу інтеріктальні події фіксувалися з частотою від 0.01 до 0.09 Гц в обох типах зрізів.

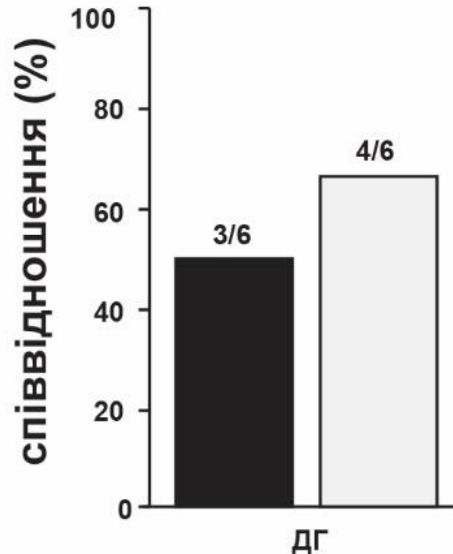
Також отримані дані свідчать про те, що вентральна частина гіпокампа генерує іктальні епілептиформні частіше (90%), порівняно з дорзальною частиною (50%). Ми не спостерігали достовірної різниці частоти виникнення інтеріктальних явищ у дорзальному (66%) та вентральному (60%) гіпокампі (рис.3.10-11).



**Рис. 3.10. Співвідношення ймовірності виникнення іктальних (чорний) та інтеріктальних (сірий) патернів у дослідах з вентральними зрізами гіпокампа.**

Отримані дані свідчать про те, що вентральна частина гіпокампа є більш вразливою до генерації фармакологічно індукованих епілептоформних явищ порівняно з дорзальною. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, проведеними на дорослих тваринах (Isaeva et al. 2016). Також вентральна частина гіпокампа має більш високі показники індукції іктальних явищ порівняно з дорзальною. Ця різниця може бути частково пояснена різницею у співвідношенні NR2A і NR2B субодиниць НМДА-рецепторів у цих частинах мозку (Pandis et al. 2006). У дорзальній частині гіпокампа переважає NR2A субодиниця, яка, як вважається, відповідає за генерацію довготривалої потенціації та відіграє провідну роль у процесах консолідації пам'яті. В той же час, у неонатальний період та внаслідок розвитку епілепсії переважає NR2B субодиниця. Відомо, що у

незрілому мозку співвідношення субодиниць НМДА-рецепторів збільшується у порівнянні з дорослими щурами (Monyer et al. 1994).



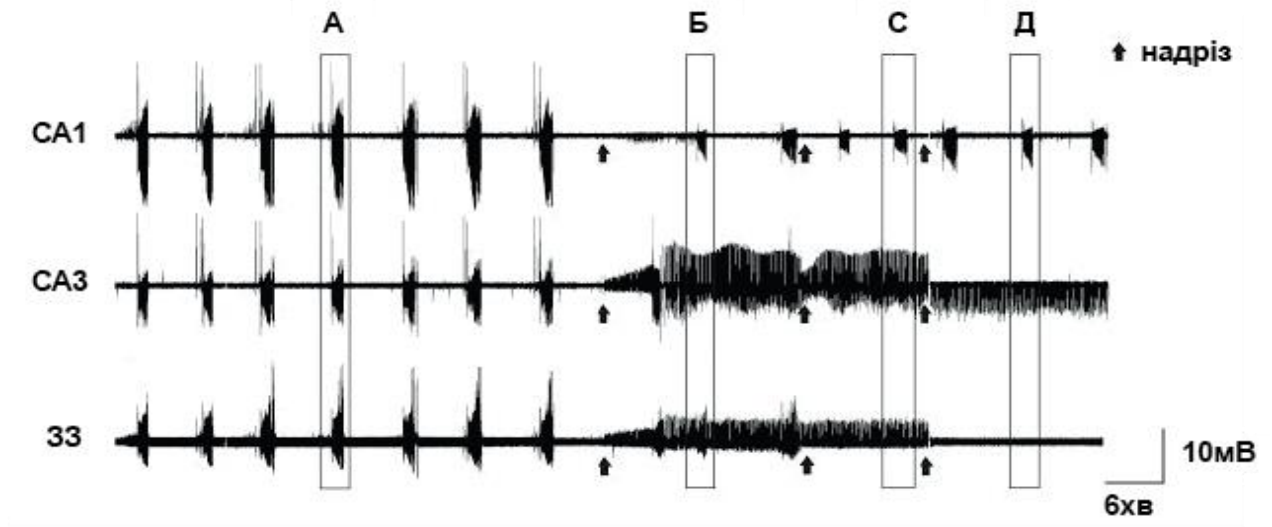
**Рис. 3.11. Співвідношення ймовірності виникнення іктальних (чорний) та інтеріктальних (сірий) патернів у дослідах з дорзальними зрізами гіпокампа..**

Ми вважаємо, що така різниця в експресії НМДА-рецепторів може хоча б частково пояснити збільшену вірогідність формування епілептоформних явищ у гіпокампі молодих тварин. До інших факторів можна віднести підвищену експресію АМРА-рецепторів і недостатній розвиток гальмівної синаптичної системи мозку молодих тварин.

### **3.3. Дослідження генерації іктальних та інтеріктальних явищ у СА3, СА1 зонах та зубчастій звивині вентральної частини гіпокампа**

В інтактних зрізах, занурених у базовий розчин з низьким вмістом магнію, іктальні події спостерігаються в СА1 та СА3 зонах одночасно (рис. 3.12). Однак нами було показано, що розрізання провідних шляхів, які

забезпечують передачу сигналу від СА3 до СА1 ділянок гіпокампа, призводить до того, що ці зони продукують різні патерни активності у кожній з них (рис. 3.13-16).



**Рис. 3.12. Ефект перерізання провідних шляхів у ВГ на розвиток ЕА.**

Наведено приклад одночасного позаклітинного відведення епілептиформної активності з СА1, СА3 та зубчастої звивини, стрілками позначено час, коли робився надріз: перерізання колатералей Шафера у зоні СА2 (А), відокремлення СА1 від решти гіпокампу (Б), відокремлення зубчастої звивини (С).

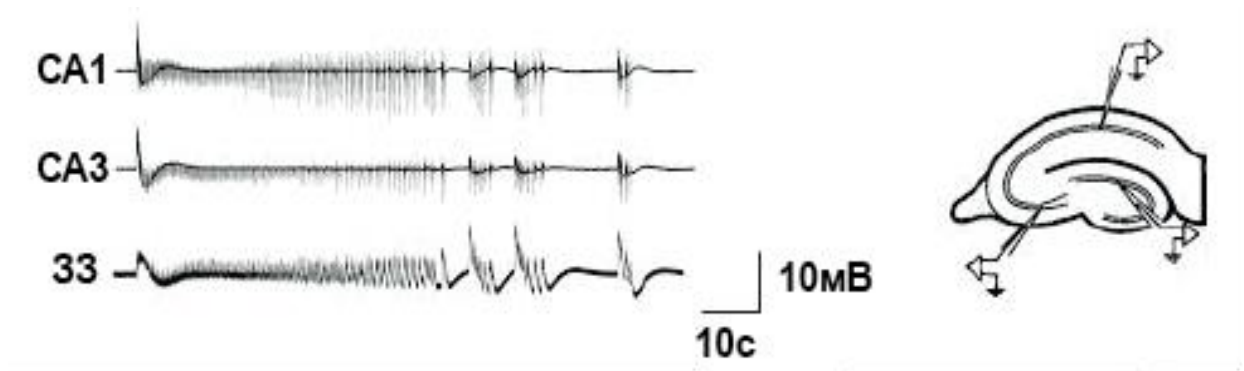
(А) Репрезентативний запис активності, індукованої вилученням  $MgCl^{2+}$  з розчину ACSF в інтактному гіпокампальному зрізі.

(В) Перерізання колатералей Шафера у зоні СА2. (С) Відокремлення зони СА1 від решти гіпокампа шляхом горизонтального розрізу від першого місця надрізу. (Д) Відокремлення зубчастої звивини.

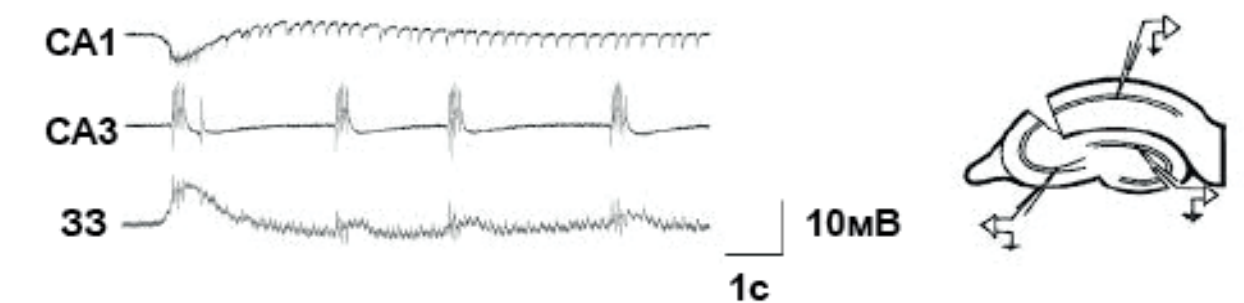
Зважаючи на отримані дані, можна зробити висновок, що іктальні події починаються у зоні СА1 гіпокампа та поширюються на зону СА3 та зубчасту звивину (DG), тоді як інтеріктальні беруть свій початок у зоні СА3 і переходять в DG.



Схожий результат був продемонстрований на щурах віком 22-32 дні (Lewis, Sargent, and David 1990; Vlasiuk et al. 2017).

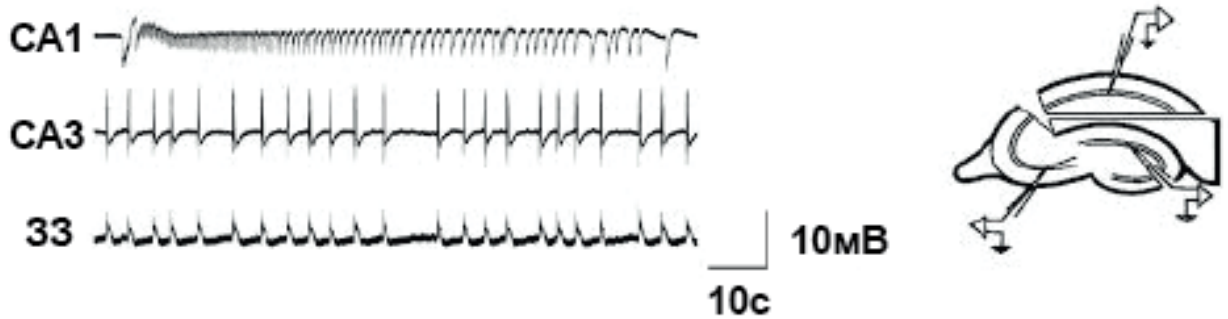


**Рис. 3.13.** Репрезентативний запис активності, індукованої вилученням  $MgCl_2$  з розчину ACSF в інтактному гіпокампальному зрізі.

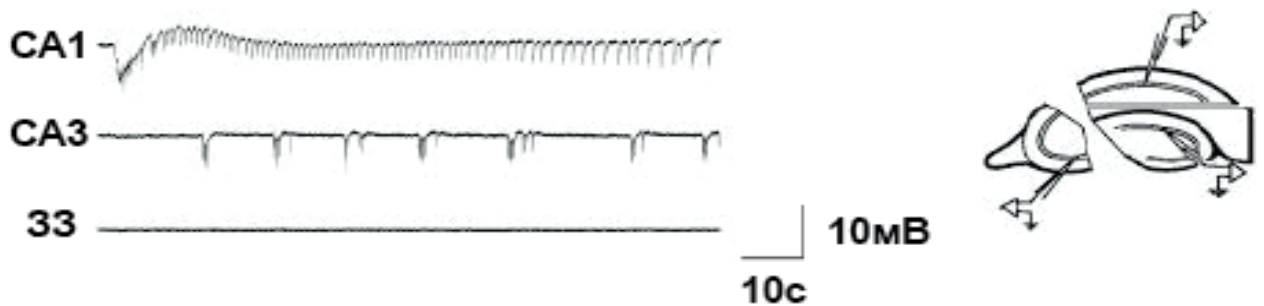


**Рис. 3.14.** Зміни ЕА ділянок гіпокампа після перерізання колатералей Шаффера у зоні CA2.

Незважаючи на наведені результати, механізми генерації епілептиформної активності в різних зонах гіпокампа молодих щурів залишаються не до кінця визначеними та потребують подальших досліджень.



**Рис. 3.15.** Зміни ЕА ділянок гіпокампа після відокремлення зони CA1 від решти гіпокампа шляхом горизонтального розрізу від першого місця надрізу.



**Рис. 3.16.** Зміни ЕА ділянок гіпокампа після відокремлення зубчастої звивини .

Результати підрозділів 3.2-3 опубліковані у роботах (Isaeva et al. 2016).

#### **3.4. Ефект фармакологічної блокади ASIC на епілептиформні явища в умовах низько-магнієвої моделі індукції епілептиформної активності**

Роль протон-чутливих іонних каналів в генерації та припиненні епілептичних нападів наразі суперечлива. Деякі дослідження вказують на те, що генерація епілептичних нападів може здійснюватися завдяки інтенсивному файрингу нейронів, що в свою чергу призводить до підкислення міжклітинного середовища і, як наслідок, активації ASIC

каналів (X. Zha 2013). У дослідях з нокаутіваними за ASIC1а мишами було продемонстровано знижену ймовірність розвитку епілептиформної активності, індукованої вилученням магнію з базового розчину ACSF.

Для визначення ролі ASIC в генерації епілептиформних явищ у гіпокампі *in vitro* нами була використана модель епілепсії з вилученням  $Mg^{2+}$  з базового розчину ACSF і 4-амінопіридинова модель індукції епілептиформної активності. У дослідях ми використовували горизонтальні зрізи мозку шурів (10-12 днів з дати народження). Видалення  $Mg^{2+}$  призводило до появи епілептиформної активності у CA1 зоні гіпокампа через 20-40 хвилин після зміни базового розчину на проепілептичний з низьким вмістом магнію.

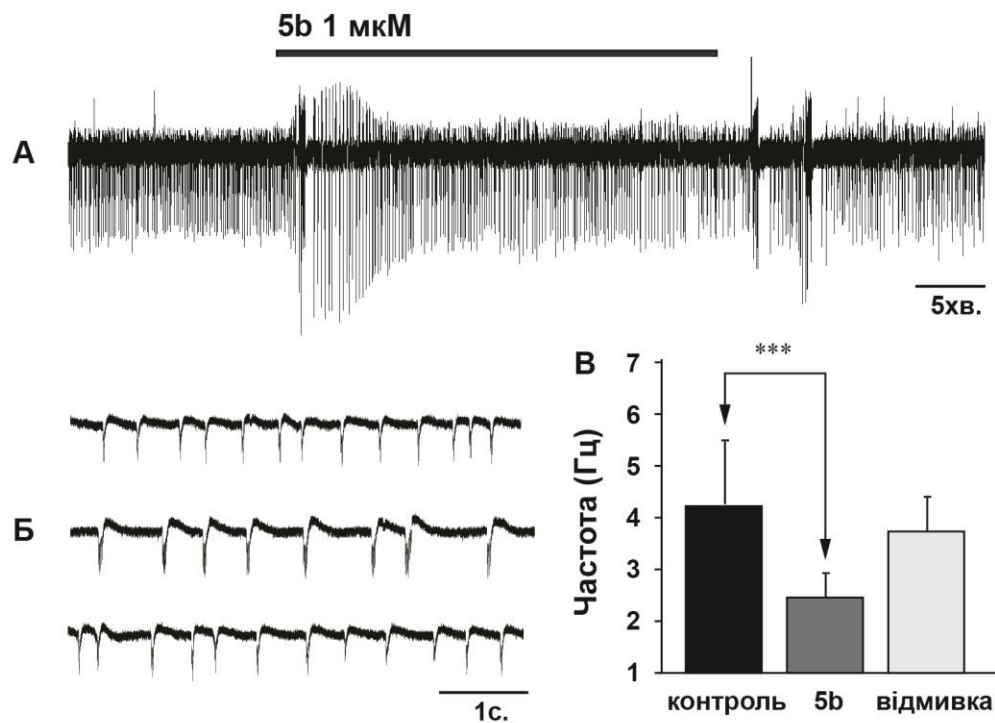


Рис. 3.17. Репрезентативний запис ЕА, індукованої розчином з низьким вмістом  $Mg^{2+}$  в СА1 зоні гіпокампа, при дії сполуки 5b (А),

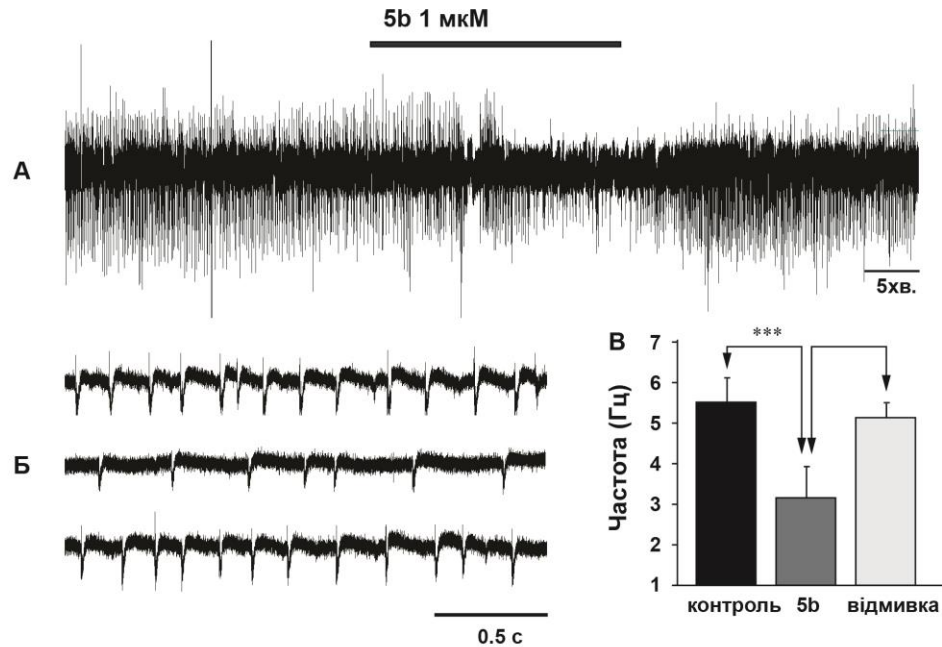
**винесені фрагменти запису у контролі, при дії 5b та поверненні до базового розчину ACSF (Б), показано різницю частотних характеристик епілептиформної активності (В).**

Після 30 хвилин запису епілептиформної активності, у випадку, якщо частотні та амплітудні характеристики активності залишалися сталими, до модифікованого базового розчину додавався блокатор ASIC каналів 5b у концентрації 1мМ. Унаслідок дії блокатора нами було зафіксовано достовірне зниження як частотних, так і амплітудних характеристик епілептиформної активності ( $2.18 \pm 0.3$  Гц під дією блокатора,  $4.12 + 1.1$  Гц у контрольній частині,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ , рис. 3.17).

Після 20-40 хвилин запису епілептиформної активності система подачі розчину перемикалась на проепілептичний ACSF з низьким вмістом магнію, вільний від блокатора 5b, активність під час відмивки від блокатора записували протягом 30 хв.

### **3.5. Блокування ASIC в умовах 4-амінопіридинової моделі індукції епілептиформної активності**

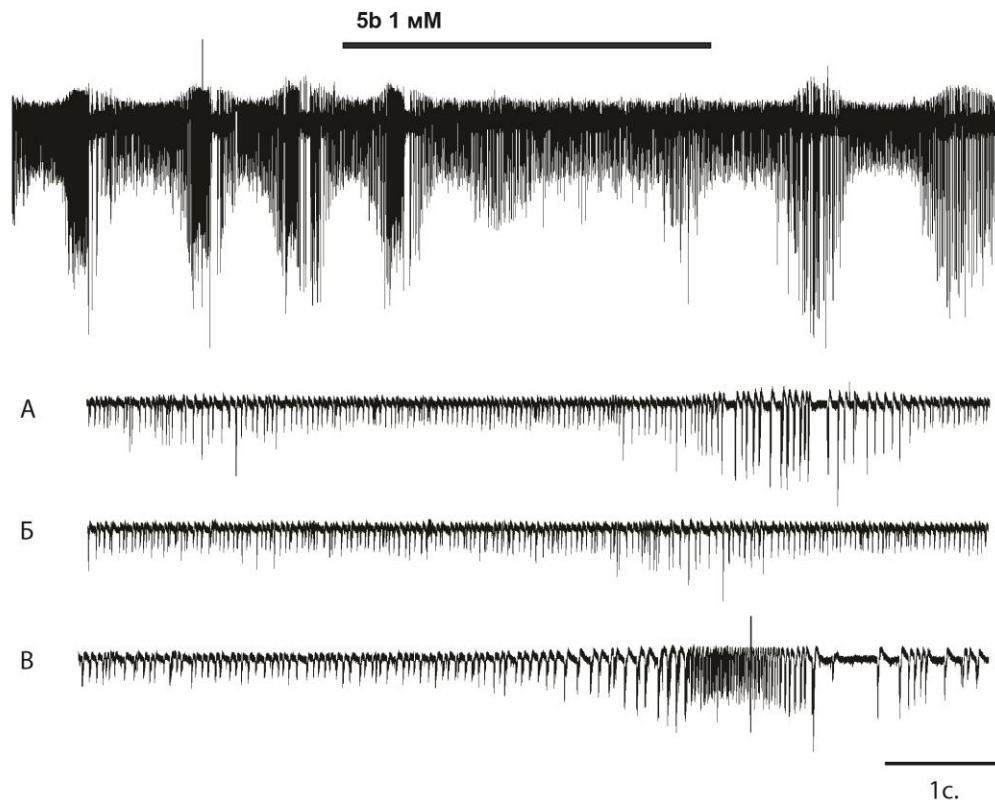
У випадку 4-амінопіридинової моделі індукції епілептиформної активності, розвиток електрографічних корелятивів епілептичного нападу спостерігали вже через 3-5 хвилин після додавання 4-АП до базового розчину ACSF (рис. 3.18.).



**Рис. 3.18.** Репрезентативний запис ЕА, індукованої додаванням 4-АП до розчину ACSF, в CA1 зоні гіпокампа. Зверху наведено частина запису у розширеному масштабі (А), наведено приклади відповідної активності у контролі, при додаванні 5b та після повернення до базового розчину ACSF (Б), показано різницю частотних характеристик епілептиформної активності (В).

Після додавання блокатора ASIC каналів, як і у експериментах з низько-магнієвою моделлю індукції епілептиформної активності, ми спостерігали істотне зниження як частотних, так і амплітудних характеристик епілептиформної активності ( $3,14 \pm 0,5$  Гц під дією блокатора,  $5,42 \pm 0,8$  Гц у контрольній частині,  $p < 0,001$ ,  $n = 9$ ).

У деяких випадках після додавання блокатора ми спостерігали часткову зміну патерну епілептиформної активності у дослідях з 4-амінопіридин-індукованими епілептиформними нападами: після вилучення блокатора епілептиформна активність частково поверталася до початкового стану (рис. 3.19.).



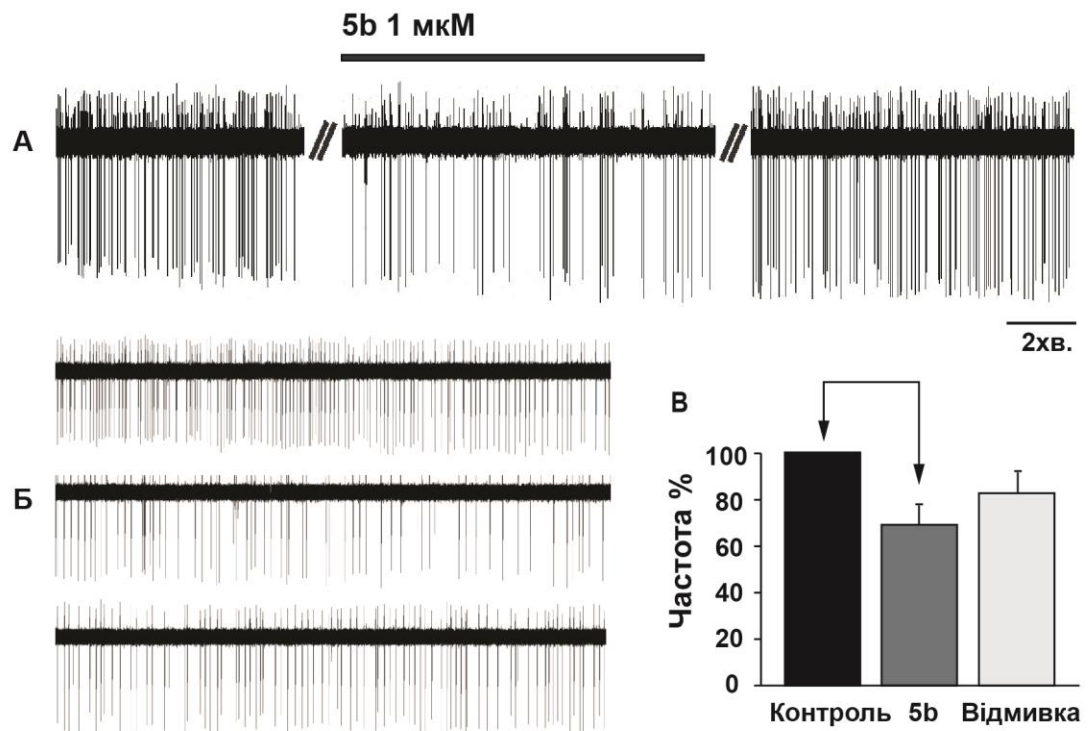
**Рис. 3.19. Патерни епілептиформної активності, індукованої додаванням 4-амінопіридину до базового розчину ACSF в СА1 зоні гіпокампа щура. Наведено приклади відповідної активності у контролі(А), при додаванні 5b(Б) та після повернення до базового розчину ACSF(В).**

Результати підрозділів 3.4-5 опубліковані у роботах (Vlasiuk et al. 2017).

### **3.6. Дослідження ролі ASIC у генерації потенціалів дії**

Для дослідження ролі ASIC у генерації потенціалів дії ми використовували метод фіксації мембранного струму у конфігурації ціла

клітина cell attached (рис. 3.20). Для проведення цієї серії експериментів клітини обиралися випадковим чином з пірамідного шару зони CA1 гіпокампа. Після отримання сталого контакту між клітиною та скляним мікроелекродом запис здійснювався у режимі реєстрації потенціалу з нульовою підтримкою.



**Рис. 3.20. . Вплив блокатора протон чутливих іонних каналів 5b на генерацію потенціалів дії у пірамідних нейронах гіпокампа зони CA1. Репрезентативний запис (A). Знизу наведено приклади запису у розширеному масштабі у контролі, при додаванні 5b та після повернення до базового розчину ACSF (Б). Частота виникнення потенціалів дії (В).**

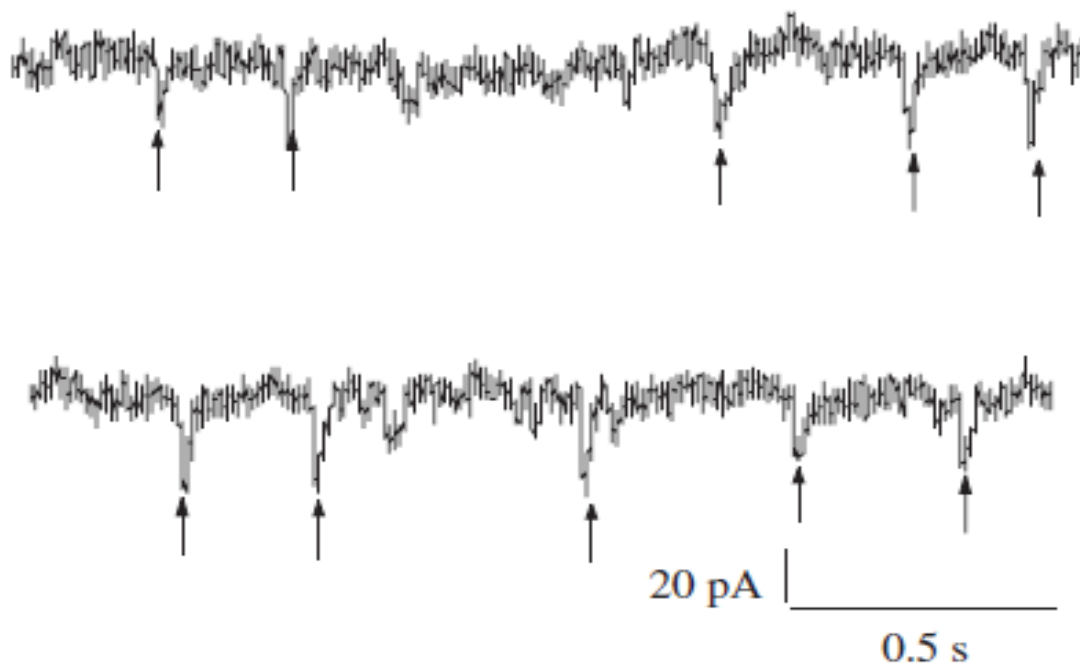
Дію блокатора ASIC каналів перевіряли після отримання сталої частоти генерації потенціалів дії нейронів протягом 20 хвилин. Отримані дані свідчать про те, що при блокуванні роботи ASIC каналів, частота генерації

потенціалів дії знижується до  $68 \pm 11\%$  від контрольного рівня ( $n = 11$ ,  $P < 0.05$ ). При зміні зовнішньоклітинного розчину на розчин без вмісту блокатора, частота генерації потенціалів дії нейронів частково підвищувалась, але не поверталася до контрольного рівня.

### 3.7. Визначення ролі ASIC у генерації спонтанної збуджувальної синаптичної активності нейронів гіпокампа

Виходячи з отриманих результатів, наступним кроком нашого дослідження була спроба з'ясувати безпосередні механізми впливу ASIC каналів на епілептиформну активність.

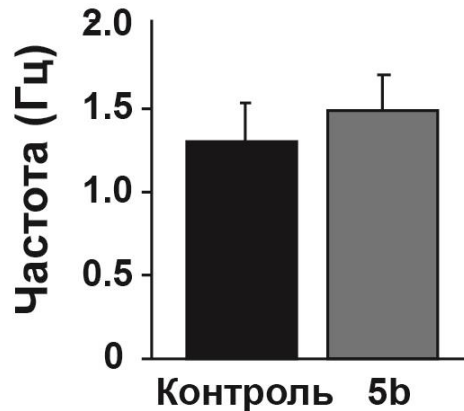
Відомо, що показники спонтанної збуджувальної та гальмівної активності гіпокампа не лише впливають на процеси обробки та консолідації пам'яті, але й співвідносяться з розвитком таких захворювань як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, шизофренія та епілепсія (Goto, Yang, and Otani 2010).



**Рис. 3.21.** Вплив фармакологічної блокади ASIC на збуджувальну постсинаптичну активність нейронів гіпокампа. Зверху наведено



запис до аплікації блокатора, знизу – після. Одиначна активність позначена стрілкою.



**Рис. 3.22. Ефект блокування ASIC на збуджувальну постсинаптичну активність нейронів гіпокампа.**

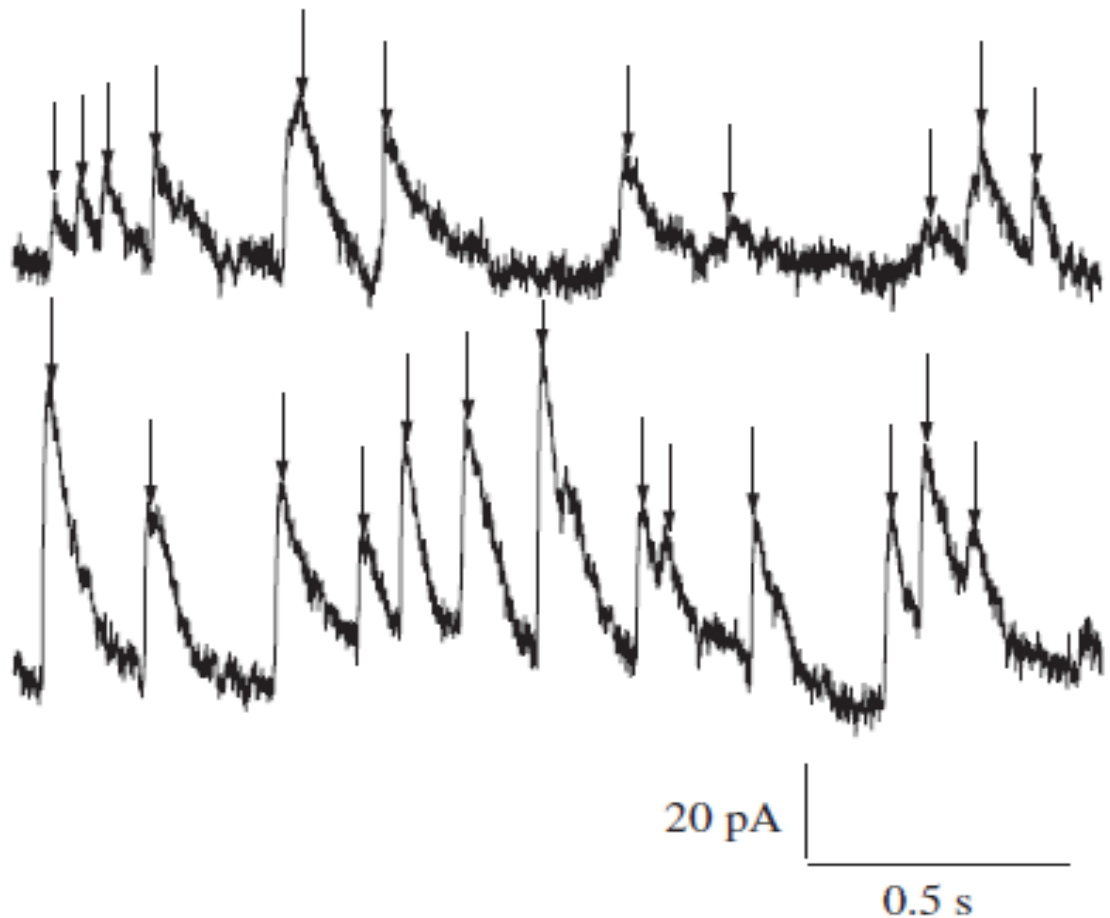
У наступних експериментах ми використовували методику фіксації струму та потенціалу у конфігурації щільного контакту між скляним електродом і цілою клітиною з зони CA1 гіпокампа.

Після встановлення контакту між клітиною та підсилювачем до базового розчину ACSF додавався селективний блокатор ASIC, 5b, у концентрації 1мМ.

Фармакологічна блокада ASIC *in vitro* не призводила до зміни частоти генерації спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (сЗПС, рис. 3.21-22). Частота генерації сЗПС складала  $1,45 \pm 0,25$  Гц в контрольних умовах ( $n = 4$ ) та  $1,5 \pm 0,29$  Гц з додаванням блокатора ASIC ( $n = 4$ ).

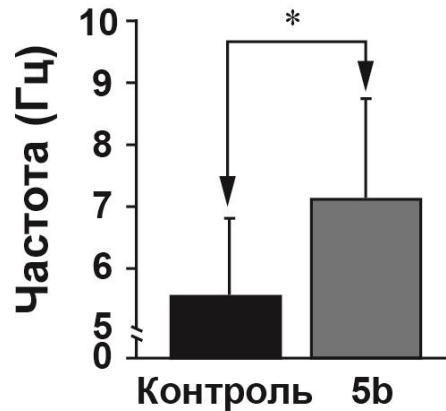
### 3.8. Ефект блокування ASIC на генерацію спонтанної гальмівної синаптичної активності нейронів гіпокампа

Протилежний вищенаведеному результат ми спостерігали у випадку вимірювання частотних характеристик гальмівної постсинаптичної активності (рис. 3.23-25).



**Рис. 3.23. Ефект фармакологічної блокади ASIC на гальмівну постсинаптичну активність нейронів гіпокампа. Зверху наведено запис до аплікації блокатора, знизу – після. Одиначна активність позначена стрілкою.**

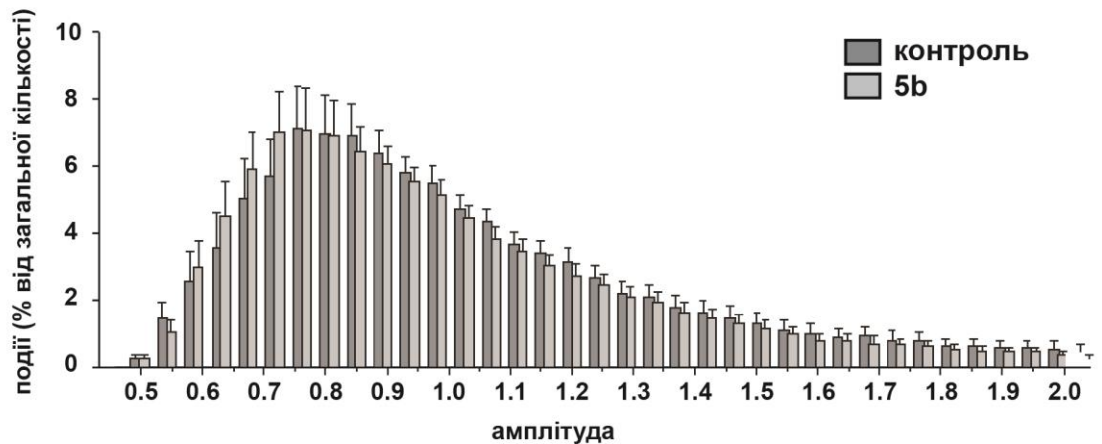
Додавання блокатора ASIC до базового розчину ACSF значною мірою підвищувало частоту гальмівних постсинаптичних струмів (ГПС) пірамідних нейронів гіпокампа.



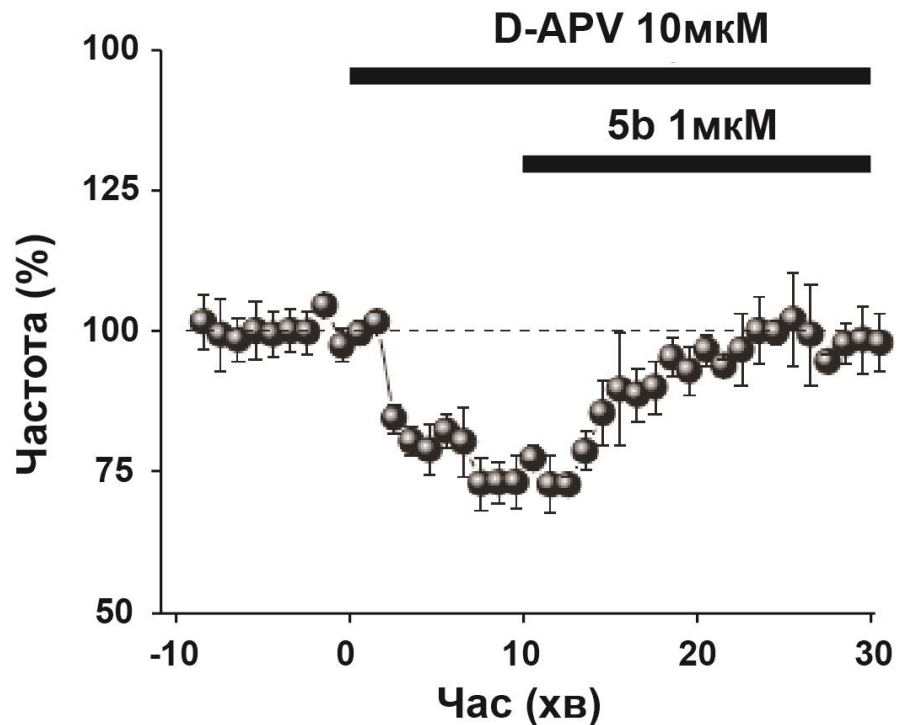
**Рис. 3.24. Фармакологічна блокада ASIC достовірно підвищує частоту гальмівної спонтанної активності нейронів гіпокампа. \***

**$P < 0,05$ ,  $n = 9$**

Під дією блокатора частота ГПС підвищувалась з  $5,6 \pm 1,3$  Гц. до  $7,2 \pm 1,6$  Гц ( $n = 9$ ,  $p < 0,05$ ). Також блокада ASIC не впливала на амплітудну характеристику спостережених нами явищ.



**Рис. 3.25. Вплив блокади ASIC1a на усереднений розподіл амплітуд ГПС. У колонках представлено середні амплітуди, нормалізовані щодо контролю.**



**Рис. 3.26.** Вплив блокади ASIC1a на частоту виникнення ГПСС після блокування НМДА-рецепторів. Дані нормовані відносно контролю. Зверху позначено момент аплікації блокаторів.

Для того щоб підтвердити ефект підвищення частоти ГПС саме внаслідок блокади ASIC каналів, а не часткового блокування НМДА-рецепторів, ми провели додаткові дослідження з додаванням 10  $\mu$ M D-(2)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV), антагоніста НМДА-рецепторів, перед аплікацією в позаклітинний розчин блокатора ASIC (рис. 3.26.).

Отримані результати свідчать про те, що блокування НМДА-рецепторів знижувало базову частоту ГПС до 81.5% від контрольного рівня ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ). Однак, додавання блокатора ASIC підвищувало частоту до  $95 \pm 8\%$  від базового рівня, що вимірювався до аплікації

блокатора НМДА-рецепторів. Це свідчить про те, що ефект підвищення частоти ГПС не є НМДА-залежним

Результати підрозділів 3.6-8 опубліковані у роботах (Ievlevskiy et al. 2016).

## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 4.1. Дослідження впливу рівня оксигенації та перфузування зрізів на епілептиформну активність гіпокампа

Встановлено, що і гіпоксія, і гіпероксигенація можуть модулювати активність нейронних мереж, завдяки чому зміни рівня кисню в тканинах під час експерименту можуть впливати на кінцевий результат. В той же час безпосередній ефект таких змін залишається малодослідженим, що робить визначення експериментальних параметрів важливою частиною дослідження ролі протон-чутливих каналів у модуляції нейронної активності. Перед початком основних досліджень ми, з використанням 4-амінопіридинової моделі епілептиформної активності, вивчали вплив оксигенації на збудливість нервових клітин гіпокампа.

Наразі нами було показано, що зміна швидкості перфузії зрізів в камері в межах 1-5 мл/хв значною мірою впливає на оксигенацію нервової тканини, що в свою чергу модулює амплітуду та частоту синхронної епілептиформної активності нейронів гіпокампа, спровокованої 4-амінопіридином.

Зниження швидкості потоку а також заміщення кисню в позаклітинному середовищі азотом провокує суттєве зниження синхронізованої епілептиформної активності нейронів гіпокампа. У наведених в розділі 3 результатах ми демонструємо значну лінійну кореляцію між рівнем епілептиформної активності нейронів, спричиненої 4-амінопіридином, та рівнем кисню в тканині зрізу.

З літературних джерел відомо, що здатність нейронної мережі до генерації потенціалів дії може змінюватися внаслідок зміни швидкості потоку позаклітинного розчину, що омиває зрізи мозку (Ivanov and

Zilberter 2011). Водночас, синхронізована епілептиформна активність є енергоємним процесом, який потребує значного споживання енергетичного субстрату та кисню. Таким чином, при зниженні рівня насиченості зрізів киснем під час експериментальної електрофізіологічної реєстрації високочастотних коливань у зрізах мозку, можна спостерігати результат, залежний як від активності споживання кисню, так і від обмеження дифузії кисню в тканину (Galeffi et al. 2011; Masamoto et al. 2003).

Дослідження функції нейронів *in vivo*, проведені в нормобаричних умовах, свідчать про те, що атмосфера навколишнього середовища містить 21% кисню за умов тиску 750 мм рт. ст. При нормобаричному тиску тиск кисню в суперфузійному середовищі в експериментах з електрофізіологічної реєстрації зі зрізів мозку є гіпероксичним порівняно з інтактним мозком та імітує тиск кисню в тканинах нейронів *in vivo*. У наведених в розділі 3 результатах профіль глибини кисню відображає динаміку дифузії кисню в тканину зрізу і демонструє поступове зниження концентрації кисню, коли кисневий електрод переміщується у глибину зріза. Наші дані показують, що нормобаричний гіпероксигенізований ASCF (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> при нормальному атмосферному тиску) при швидкості потоку 2 мл/хв забезпечує постійні нормоксичні умови на глибині 100-150 мкм зрізу. Ці результати близькі до попередніх досліджень, у яких визначали профіль кисню в тканині зрізу мозку при різних швидкостях перфузії та різній концентрації кисню (Kann et al. 2011; Mulkey et al. 2001). Навпаки, в умовах відсутності потоку в камері запису ми спостерігали прогресивне зниження кисню, а також зменшення потужності синхронної епілептиформної активності нейронів в умовах 4-амінопіридинової моделі епілептиформної активності нейронів гіпокампа.

У інтактному мозку система кровообігу доставляє кисень до нейронів завдяки складному механізму судинно-нейронної взаємодії. Нейрони, гліальні клітини та судини утворюють "нервово-судинні одиниці", які регулюють активність та синаптичну пластичність нейронів. Під час підготовки зрізів мозку кисень повинен дифундувати в тканини з розчину ACSF, а не з крові. При цьому для підтримання стаціонарних умов експерименту має зберігатися баланс між об'ємом кисню, який дифундує до клітин, та об'ємом кисню, який клітини споживають (Bassom, Pichmann, and Voß 1997; Huxley and Kutchai 1981).

Раніше було показано, що активність нейронів і синаптична передача пригнічуються внаслідок ішемії головного мозку (Furukawa, Yamana, and Kogure 1990; Mitani et al. 1990; Xu, Gao, and Ren 1999; Xu and Pulsinelli 1996). В свою чергу, інші літературні дані вказують на те, що пережита ішемія призводить до підвищення амплітуди викликаних синаптичних потенціалів та підвищення частоти спонтанної активності нейронів зони CA1 гіпокампа анестезованих тварин (Gao, Pulsinelli, and Xu 1998; Gao and Xu 1996). Глобальна гіпоксія провокує епілептичні напади у щурів на 10-12 день від народження *in vivo*. Також після гіпоксії спостерігається підвищена ймовірність виникнення епілептиформної активності в гіпокампальних зрізах. У наших експериментах ми не спостерігали епілептиформної активності в умовах гіпоксії, в той час як зниження кисневого тиску в тканинах мозку лінійно знижує інтенсивність епілептиформної активності. Механізм розвитку епілептиформної активності, спричиненої гіпоксією, є не до кінця визначеним, але припускається, що він пов'язаний із зміною провідності трансмембранних іонів, вивільненням реактивних видів кисню та порушенням мітохондріального окиснювального стану. В наших експериментальних умовах низький рівень кисню не впливав на ці механізми.



## 4.2. Дослідження епілептиформних подій в гіпокампі

У залежності від умов дослідження, методики, та обраної ділянки гіпокампа епілептиформна активність може бути різною як за патерном, так і за властивостями. На цей час відомо, що подібного ефекту пригнічення епілептиформної активності за сталих умов експерименту можливо досягти за допомогою фармакологічних засобів, які впливають на активність потенціал-керованих натрієвих каналів та\або ГАМК-рецепторів. В той же час використання подібних засобів може призводити до небажаних психотропних ефектів або до виникнення толерантності при клінічному застосуванні.

Тому дуже важливо знайти нові мішені для фармакологічних агентів, які допоможуть запобігти епілептичним нападам та будуть мати мінімальні побічні ефекти. До найперспективніших мішеней дії антиепілептичних препаратів належать протон-чутливі іонні канали 1a типу. Нещодавно розроблений антагоніст ASIC каналів 5b (2-oxo-2H-chromene-3-carboxamide derivative) дає змогу більш детально вивчити вплив роль ASIC каналів та їхньої блокади на епілептичну активність різного генезу.

До останніх років у багатьох дослідженнях, що стосуються дослідження епілепсії, епілептиформних явищ та синаптичної пластичності, гіпокамп розглядали як суцільну структуру. В той же час сукупна наразі інформація дає можливість розглядати гіпокамп як частину мозку, структура і функціональний розподіл ділянок якої не є суцільним по його повздовжній осі. Утворення та розвиток гіпокампа також не є рівномірними: так, було показано, що дорзальна та вентральна області гіпокампа морфологічно, біохімічно та анатомічно відрізняються, що опосередковує їх функціональну різницю. (Fanselow and Dong 2010)

Кілька досліджень *in vitro* та *in vivo* демонструють різницю у сприйнятливості вентрального та дорсального гіпокампа до розвитку епілептиформної активності, при цьому вентральна частина гіпокампа є більш схильною до патологічної синхронізації в умовах епілептиформної активності (Bragdon, Taylor, and Wilson 1986; Derchansky et al. 2004; C. Paratheodoropoulos, Moschovos, and Kostopoulos 2005; Toyoda et al. 2013). З використанням тваринної моделі хронічної скроневої епілепсії було показано, що збільшення частоти епілептичних нападів найчастіше демонструється у вентральному гіпокампі, який є гомологічним відповідній ділянці гіпокампа людини, та є найбільш сприйнятливим до епілептичних нападів при скроневої епілепсії, що робить його найбільш перспективною мішенню для хірургічної резекції у тяжких випадках фармакорезистентної епілепсії (Dam 1980; French et al. 1993; King et al. 1997; Spencer et al. 1984; Toyoda et al. 2013). Хоча вентральний гіпокамп забезпечує суттєвий внесок в процес генерації епілептиформної активності при скроневої епілепсії, не варто недооцінювати важливість зв'язків між дорсальною та вентральною частинами гіпокампа для повного розвитку епілептичного нападу. Клінічні та модельні дослідження показують, що гіпокампальна поздовжня синхронізація епілептичної активності, є необхідною для генерації епілептичних нападів. Унаслідок чого перерізання гіпокампальних поздовжніх шляхів патологічної синхронізації може бути ефективним способом зменшення або припинення епілептичної активності гіпокампа (Imamura et al. 2001; Shimizu et al. 2006; Umeoka et al. 2012). Водночас припущення щодо збільшення патологічної гіпокампальної поздовжньої синхронізації мозку при епілепсії не вивчено у достатній мірі.

### 4.3. Ефект блокування ASIC на генерацію епілептиформних подій в гіпокампі

Розвиток нервових мереж являє собою багаторівневий процес, у результаті якого формуються зрілі нейрони, ускладнюються міжклітинні взаємодії, а також здійснюється інтеграція нервових клітин у синаптичні мережі. Вважається, що схильність мозку при епілепсії до аномальної синхронізації полягає у дисбалансі збуджувальної та гальмівної синаптичних систем ЦНС. Відсутність ефективного гальмування внаслідок затримки ГАМК-ергічної синаптичної передачі, та підвищення збудливості внаслідок змін експресії різних субодиниць НМДА-рецепторів значно збільшує вірогідність синхронізації нервових мереж мозку у відповідь на патологічні стани.

Роль ASIC у генерації епілептиформних явищ у літературі описується дещо суперечливо. Деякі автори пов'язують припинення генерації епілептиформної активності із подальшим підкисленням тканини і, як наслідок, активацією ASIC-залежних струмів (Ziemann et al. 2009). Інші дані демонструють, що перфузія амілориду або РсТХ1 в експериментальній камері знижує епілептиформну активність, спровоковану низько-магнієвою моделлю епілептиформної активності.

Також показано, що у мишей, нокаутних за геном ASIC1a, епілептиформна активність гіпокампа у низько-магнієвій моделі епілептиформної активності також знижується (Z. G. Xiong et al. 2008).

Щоб перевірити ці спостереження, ми застосували селективний антагоніст 5b в експериментах з дослідження епілептиформної активності, викликаній низько-магнієвою моделлю епілептиформної активності. Іони магнію підтримують магнієвий блок у порі НМДА-рецептора та забезпечують екранування поверхневого заряду. Видалення  $Mg^{2+}$  з позаклітинного розчину призводить до розвитку епілептиформної

активності у гіпокампальних зрізах (Isaev et al. 2012). Варто зазначити, що експериментальна модель епілепсії з низьким вмістом магнію є фармакорезистентною. Однак, епілептиформна активність в цій моделі дуже чутлива до модуляторів ГАМК (Pfeiffer et al. 1996). Пригнічення функції ASIC в наших дослідах значно та зворотно зменшувало частоту епілептиформної активності, що підтверджує думку про те, що ASIC впливають на ГАМК-ергічну систему гіпокампа.

Експерименти з викликаною кайнатом епілептиформною активністю у клітинах зони CA1 гіпокампа *in vivo* демонструють, що блокада провідності ASIC каналів спричиняє помітний антиепілептичний ефект. Таким чином експерименти *in vivo* та *in vitro* підтверджують, що ASIC можуть бути перспективною фармакологічною мішенню для лікування епілепсії.

#### **4.4. Вплив пригнічення функції ASIC на генерацію потенціалів дії в гіпокампі**

Велика кількість подразників пов'язана з позаклітинним підкисленням, наприклад, черепно-мозкова травма, запалення або ішемія та епілепсія (Lipka and Bülow 2003; Lipton 1999; Reeh and Steen 1996). Активація ASIC в ЦНС може сприяти смерті нейронів, пов'язаній з ішемією мозку та епілепсією, які супроводжуються позаклітинним підкисленням (Mitchell Chesler 2003; Lipton 1999; Zhu-Rong, Kai-Feng, and Garcia 2001). Крім того, коливання позаклітинного рН відбуваються і під час нормальної роботи мозку. Вміст синаптичних везикул більш кислий, а вивільнення нейромедіатора під час активності нейронів передбачає створення позаклітинного підкислення в синаптичній щілині.

ASIC - не єдині іонні канали, що експресуються у нейронах, та функція яких залежить від позаклітинного рН. Наприклад, показано, що позаклітинне підкислення інгібує НМДА-рецептори, потенціал-залежні

натрієві канали та канали TASK та активує рецептор капсаїцину TRPV1 і хлорний канал CLC-2. Водночас позаклітинне підкислення може бути коактиватором для ГАМК рецепторів (M. Chesler and Kaila 1992; Hille 2001; Jentsch et al. 2002; Kaila 1994; Patel and Honoré 2001).

Таким чином, позаклітинне підкислення може деполяризувати мембрану шляхом інгібування калієвих каналів TASK-1 або TASK-3 або активацією TRPV1. Струми ASIC є перехідними, на відміну від струмів TASK і TRPV1, які не інактивуються. Ці перехідні струми, спричинені позаклітинним підкисленням, демонструють залежність від рН, аналогічну тій, яку демонструють ASIC, і блокуються амілоридом, що чітко визначає їх як ASIC-опосередковані струми. Останні дослідження, які або застосовували фармакологічний підхід, або використовували нокаут ASIC1 та ASIC2, показали, що гомомультимери та гетеромери ASIC1a, що складаються з ASIC1a разом з ASIC2a та / або ASIC2b, опосередковують струми ASIC у нейронах гіпокампа.

З літературних даних відомо, що позаклітинне підкислення може викликати активацію потенціалів дії (ПД) в нейронах; однак кислото-чутливі канали, що беруть участь у цьому процесі, довгий час не були визначені (M. Chesler and Kaila 1992; Mitchell Chesler 2003; Krishtal et al. 1987; Varming 1999). Дослідження підтверджують, що індукована кислотою генерація ПД в нейронах гіпокампа пов'язана з активацією ASIC. Існує залежність вірогідності індукування ПД від щільності функціональних ASIC на поверхні клітини та від рівня рН позаклітинного середовища. Блокування ASIC може модулювати генерацію ПД, істотно знижуючи частоту їх генерації. ASIC локалізуються в безпосередній близькості від натрієвих та калієвих каналів в плазматичній мембрані нейрона, таким чином, функціональні властивості та локалізація ASIC в

нейронах гіпокампа свідчать, що ці канали можуть відчувати локальні зміни позаклітинного рН та швидко реагувати на них.

#### **4.5. Роль ASIC в генерації збуджувальної та гальмівної спонтанної активності гіпокампа**

Наступною частиною нашої роботи було дослідження ролі ASIC каналів у модуляції гальмівної та збуджувальної спонтанної активності гіпокампа. Відомо, що ASIC беруть участь у широкому спектрі нейрофізіологічних та патологічних процесів, таких як довготривала синаптична потенціація, емоційно-зумовлена поведінка, навчання, формування пам'яті та ноцицепція під час запалення (Price et al. 2014; Sutherland 2001; Wemmie et al. 2002, 2004; Z. G. Xiong et al. 2008). ASIC беруть участь у реакції сітківки на світло, опосередковуючи вплив закислення міжклітинного середовища на ізомеризацію родопсинів внаслідок поглинання кванту світла (Mohamed Ettaiche et al. 2004; Mohammed Ettaiche et al. 2006). У ЦНС активація ASIC1a під час тривалого ацидозу, спричиненого ішемічним ураженням мозку, провокує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну нейронну смерть (Z. G. Xiong et al. 2004, 2008; Z. G. Xiong, Chu, and Simon 2007). Також нещодавно було показано залучення ASIC як постсинаптичних рецепторів, які реагують на швидкі зміни рН ліквору, у роботу різноманітних ділянок мозку (Zeng et al. 2015).

Водночас, зв'язок між добре дослідженими мембранними функціями ASIC та численними можливими фізіологічними процесами, залежними від роботи даних каналів, залишаються до кінця не вивченими. Використовуючи новітній антагоніст ASIC, експериментальний селективний блокатор ASIC1a сполуку 5b, ми намагалися з'ясувати можливу роль ASIC у формуванні спонтанної активності тканини гіпокампа.

Новий антагоніст має рН-залежну дію, що суттєво відрізняє його дію від дії відомих раніше молекул та надає можливість більш об'єктивно оцінити роль ASIC у фізіологічних процесах (Buta et al. 2015). Було продемонстровано, що ASIC беруть участь у підтримці процесу довготривалої потенціації гіпокампа, а блокування ASIC з використанням блокатора 5b призводить до зниження рівня довготривалої потенціації у Коллатералях Шаффера в гіпокампі (Buta et al. 2015).

Наші результати не продемонстрували залучення ASIC у процес генерації спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів. Водночас ми виявили суттєве зростання гальмівних постсинаптичних струмів внаслідок блокування ASIC. Іншими словами, ASIC обмежують виникнення гальмівних синаптичних подій у синаптичній мережі гіпокампа.

З використанням експериментальної моделі ізольованих клітин, прикріплених до синаптосом, було досліджено, чи пов'язаний ефект впливу ASIC на синаптичну активність гіпокампа з певними мережевими ефектами, чи роль у даному випадку відіграють мікроскопічні властивості окремих синапсів (Akaike et al. 2002).

Електрофізіологічні експерименти з окремими синапсами дали вирішальну відповідь: ASIC виконують регулюючу роль щодо готовності окремих гальмівних синапсів до передачі сигналу. Наші дані, в свою чергу, демонструють, що цей ефект ASIC є пресинаптичним, що також підтверджується показаною експресією пресинаптично розташованих ASIC в гіпокампі (J. H. Cho and Askwith 2008). ASIC модулюються активацією ГАМК-рецепторів в нейронах гіпокампа, і, в свою чергу, активність ГАМК рецепторів також модулюється позаклітинними протонами (Wilkins, Hosie, and Smart 2005). ГАМК-інтернейрони у гіпокампі мають значно більшу щільність ASIC-опосередкованого струму,

ніж пірамідальні нейрони глутаматергічного типу (Volshakov et al. 2002; J. H. Cho and Askwith 2008; Ziemann et al. 2008).

Раніше було продемонстровано, що пригнічення функції ASIC з використанням 5b не змінює ГАМК-ергічні струми. Крім того, пригнічення функції ASIC з використанням селективного блокатора 5b не змінює амплітуд ні викликаних, ні спонтанних гальмівних струмів.

Враховуючи ці спостереження, стає зрозумілим, що вплив ASIC на ймовірність активації ГАМК-рецепторів є пресинаптичним. Найбільш вірогідним (хоча досі не встановленим) механізмом такого зв'язку видається пресинаптичне гальмування. Відповідно до класичної моделі пресинаптичного гальмування ASIC можуть забезпечувати пресинаптичне гальмування шляхом деполяризації синаптичних терміналей (Eccles, Eccles, and Magni 1961).

Враховуючи відповідність між пресинаптичним гальмуванням та деполяризацією первинних аферентних терміналей, нами пропонується, що пресинаптична деполяризація відповідає за зниження вивільнення нейромедіатора. Таке гальмування синаптичного вивільнення нейромедіатора може бути пов'язане з інактивацією потенціал-залежних каналів (Eccles, Eccles, and Magni 1961; Graham and Redman 1994; S. J. Zhang and Jackson 1995). Наприклад, відомо, що застосування каїнату в електрофізіологічних дослідженнях зменшує частоту мініатюрних гальмівних постсинаптичних струмів (Cossart et al. 1998; Rodríguez-Moreno, Herreras, and Lerma 1997). Показано, що функціональні АМПА-рецептори інгібують вивільнення нейромедіатора з центральних терміналей деяких сенсорних нейронів (Lee et al. 2002).



## Висновки

В дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань було досліджено роль протон-чутливих іонних каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів. Розглянуто вплив фармакологічної блокади ASIC1a на генерацію та характеристики епілептиформних явищ у гіпокампі. Продемонстровано вплив блокади ASIC1a на спонтанну збуджувальну та гальмівну синаптичну активність гіпокампа та генерацію потенціалів дії. На основі результатів електрофізіологічних досліджень запропоновано гіпотези, щодо можливих молекулярних механізмів ролі ASIC1a у процесах епілептогенезу.

1. Зміна швидкості перфузії призводить до модифікації амплітуди і частоти 4-AP-індукованої синхронної активності нейронів та рівня карбогенізації зрізів, в свою чергу змінюючи pH зовнішньоклітинного середовища, що є критичним для дослідження протон-чутливих каналів. Показано позитивну лінійну кореляцію між потужністю 4-AP-індукованої епілептиформної активності нейронів і вмістом кисню. Отримані результати дають змогу стверджувати, що спосіб постачання кисню до тканин зрізів мозку може модулювати *in vitro* нейронну мережеву збудливість.

2. Вірогідність виникнення епілептиформної активності в вентральній частині гіпокампа вище, ніж у дорсальній. Іктальна активність у вентральних зрізах гіпокампа виникає в зоні CA1 і поширюється в зону CA3 і зубчасту звивину, водночас інтеріктальна активність бере початок в зоні CA3.

3. Фармакологічна блокада ASIC1a в умовах низько-магнієвої та 4-ар моделей індукції епілептиформної активності призводить до зниження частотних характеристик епілептиформної активності.

4. Блокування ASIC1a знижує частоту генерації потенціалів дії в пірамідних нейронах гіпокампа.

5. Внаслідок інгібування роботи ASIC1a підвищується частота спонтанної гальмівної синаптичної активності. Ми не спостерігали ефекту блокади ASIC1a на спонтанну збуджуючу синаптичну активність нейронів гіпокампа.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

6. Aghajanian, George K, and Kurt Rasmussen. 1989. "Intracellular Studies in the Facial Nucleus Illustrating a Simple New Method for Obtaining Viable Motoneurons in Adult Rat Brain Slices." 338: 331–38.
7. Akaike, Norio et al. 2002. "Focal Stimulation of Single GABAergic Presynaptic Boutons on the Rat Hippocampal Neuron." *Neuroscience Research* 42(3): 187–95. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010201003200> (August 19, 2020).
8. Alberts et al. 2008. *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*.
9. Albus, K, A Wahab, and U Heinemann. 2008. "Standard Antiepileptic Drugs Fail to Block Epileptiform Activity in Rat Organotypic Hippocampal Slice Cultures." *British Journal of Pharmacology* 154(3): 709–24. <http://doi.wiley.com/10.1038/bjp.2008.112> (August 19, 2020).
10. Alger, B. E., and R. A. Nicoll. 1980. "Epileptiform Burst Afterhyperpolarization: Calcium-Dependent Potassium Potential in Hippocampal CA1 Pyramidal Cells." *Science* 210(4474): 1122–24. <https://science.sciencemag.org/content/210/4474/1122> (September 4, 2020).
11. Alvarez de la Rosa, Diego et al. 2003. "Distribution, Subcellular Localization and Ontogeny of ASIC1 in the Mammalian Central Nervous System." *Journal of Physiology* 546(1): 77–87. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509480/> (August 19, 2020).
12. Amakhin, Dmitry V., Julia L. Ergina, Anton V. Chizhov, and Aleksey V. Zaitsev. 2016. "Synaptic Conductances during Interictal Discharges in Pyramidal Neurons of Rat Entorhinal Cortex." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10(OCT2016): 233. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111118/> /pmc/articles/PMC5061778/?report=abstract (September 7, 2020).

13. Ashley, Kevin, and Forshing Lui. 2020. StatPearls *Physiology, Nerve*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31869116> (September 7, 2020).
14. Ault, B. et al. 1980. "Selective Depression of Excitatory Amino Acid Induced Depolarizations by Magnesium Ions in Isolated Spinal Cord Preparations." *The Journal of Physiology* 307(1): 413–28. [/pmc/articles/PMC1283053/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1283053/?report=abstract) (September 4, 2020).
15. Ayala, G. F. et al. 1973. "Genesis of Epileptic Interictal Spikes. New Knowledge of Cortical Feedback Systems Suggests a Neurophysiological Explanation of Brief Paroxysms." *Brain Research* 52(C): 1–17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4573428/> (September 4, 2020).
16. Bacongus Isabelle, Gouaux Eric. 2008. "Structural Plasticity and Dynamic Selectivity of Acid-Sensing Ion Channel-Spider Toxin Complexes." *Nature* 23(1): 1–7.
17. Barkus, Christopher et al. 2010. "Hippocampal NMDA Receptors and Anxiety: At the Interface between Cognition and Emotion." *European Journal of Pharmacology* 626(1): 49–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.014>.
18. Bassom, Andrew P., Achim Ilchmann, and Heinrich Voß. 1997. "Oxygen Diffusion in Tissue Preparations with Michaelis-Menten Kinetics." *Journal of Theoretical Biology* 185(1): 119–27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9093557/> (July 8, 2020).
19. Ben-Ari, Yehezkel. 2008. "Epilepsies and Neuronal Plasticity: For Better or for Worse?" *Dialogues in clinical neuroscience* 10(1): 17–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472481> (June 13, 2019).
20. Bliss, T. V. P., and G. L. Collingridge. 1993. "A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus." *Nature* 361(6407): 31–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8421494> (June

- 13, 2019).
21. Bolshakov, K. V. et al. 2002. "Characterization of Acid-Sensitive Ion Channels in Freshly Isolated Rat Brain Neurons." *Neuroscience* 110(4): 723–30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11934479/> (August 19, 2020).
  22. Bonansco, Christian, and Marco Fuenzalida. 2016. "Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain." *Neural Plasticity*.
  23. Bragdon, Andrew C., Donald M. Taylor, and Wilkie A. Wilson. 1986. "Potassium-Induced Epileptiform Activity in Area CA3 Varies Markedly along the Septotemporal Axis of the Rat Hippocampus." *Brain Research* 378(1): 169–73.
  24. Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI, Editors. 2006. "An Introduction to Epilepsy." : Chapter 1, Basic Mechanisms Underlying Seizures an.
  25. Buckle, P. J., and H. L. Haas. 1982. "Enhancement of Synaptic Transmission by 4-aminopyridine in Hippocampal Slices of the Rat." *The Journal of Physiology* 326(1): 109–22. [/pmc/articles/PMC1251462/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7041242/) (September 7, 2020).
  26. Buta, Andriy et al. 2015. "Novel Potent Orthosteric Antagonist of ASIC1a Prevents NMDAR-Dependent LTP Induction." *Journal of Medicinal Chemistry* 58(11): 4449–61. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25974655/> (August 19, 2020).
  27. C.E., Stafstrom, and Carmant L. 2015. "Seizures and epilepsy: An overview for neuroscientists." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(6): 1–18.
  28. Carrasquillo, Yarimar, Andreas Burkhalter, and Jeanne M. Nerbonne. 2012. "A-Type K<sup>+</sup> Channels Encoded by Kv4.2, Kv4.3 and Kv1.4 Differentially Regulate Intrinsic Excitability of Cortical Pyramidal Neurons." *Journal of Physiology* 590(16): 3877–90.

29. Catterall, William A. 2011. "Voltage-Gated Calcium Channels." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(8): 1–23. [/pmc/articles/PMC3140680/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111111/) (September 7, 2020).
30. Ceccom, Johnatan, and Bernard France. 2009. "Activation of Metabotropic Glutamate Receptor Type 2 / 3 Supports the Involvement of the Hippocampal Mossy Fiber Pathway on Contextual Fear Memory Consolidation." : 504–7.
31. Chebib, Mary, and Graham A.R. Johnston. 1999. "The 'ABC' of GABA Receptors: A Brief Review." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 26(11): 937–40.
32. Chesler, M., and K. Kaila. 1992. "Modulation of PH by Neuronal Activity." *Trends in Neurosciences* 15(10): 396–402. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1279865/> (August 19, 2020).
33. Chesler, Mitchell. 2003. "Regulation and Modulation of PH in the Brain." *Physiological Reviews* 83(4): 1183–1221. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14506304/> (August 19, 2020).
34. Chiang, Po Han et al. 2015. "ASIC-Dependent LTP at Multiple Glutamatergic Synapses in Amygdala Network Is Required for Fear Memory." *Scientific Reports* 5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988357/> (August 19, 2020).
35. Cho, Jun Hyeong, and Candice C. Askwith. 2008. "Presynaptic Release Probability Is Increased in Hippocampal Neurons from ASIC1 Knockout Mice." *Journal of Neurophysiology* 99(2): 426–41. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094106/> (August 19, 2020).
36. Cho, Kyung-Ok et al. 2015. "Aberrant Hippocampal Neurogenesis Contributes to Epilepsy and Associated Cognitive Decline." *Nature Communications* 6(1): 6606. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808087> (June 13, 2019).

37. Choquet, Daniel, and H. Korn. 1992. "Mechanism of 4-Aminopyridine Action on Voltage-Gated Potassium Channels in Lymphocytes." *Journal of General Physiology* 99(2): 217–40. [/pmc/articles/PMC2216608/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10111111/) (September 7, 2020).
38. Chu, Xiang-Ping, and Zhi-Gang Xiong. 2012. "Physiological and Pathological Functions of Acid-Sensing Ion Channels in the Central Nervous System." *Current Drug Targets* 13(2): 263–71.
39. Coan, E. J., and G. L. Collingridge. 1985. "Magnesium Ions Block an N-Methyl-d-Aspartate Receptor-Mediated Component of Synaptic Transmission in Rat Hippocampus." *Neuroscience Letters* 53(1): 21–26.
40. Collingridge, G. L., S. J. Kehl, and H. McLennan. 1983a. "The Antagonism of Amino Acid-induced Excitations of Rat Hippocampal CA1 Neurones in Vitro." *The Journal of Physiology* 334(1): 19–31. [/pmc/articles/PMC1197297/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10111111/) (September 4, 2020).
41. Collingridge, G L, S J Kehl, and H McLennan. 1983b. "Excitatory Amino Acids in Synaptic Transmission in the Schaffer Collateral-Commissural Pathway of the Rat Hippocampus." *The Journal of Physiology* 334(1): 33–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6306230> (June 13, 2019).
42. Coryell, Matthew W. et al. 2007. "Targeting ASIC1a Reduces Innate Fear and Alters Neuronal Activity in the Fear Circuit." *Biological Psychiatry* 62(10): 1140–48. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17662962/> (August 19, 2020).
43. Cossart, Rosa et al. 1998. "GluR5 Kainate Receptor Activation in Interneurons Increases Tonic Inhibition of Pyramidal Cells." *Nature Neuroscience* 1(6): 470–78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10196544/> (August 19, 2020).
44. Croucher, M. J., J. F. Collins, and B. S. Meldrum. 1982. "Anticonvulsant Action of Excitatory Amino Acid Antagonists." *Science* 216(4548): 899–

901. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1982Sci...216..899C/abstract> (September 4, 2020).
45. Crunelli, Vincenzo, and Mark L. Mayer. 1984. "Mg<sup>2+</sup> Dependence of Membrane Resistance Increases Evoked by NMDA in Hippocampal Neurones." *Brain Research* 311(2): 392–96.
46. Czuczwar, Stanislaw J., and Brian Meldrum. 1982. "Protection against Chemically Induced Seizures by 2-Amino-7-Phosphonoheptanoic Acid." *European Journal of Pharmacology* 83(3–4): 335–38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6293844/> (September 4, 2020).
47. Dam, Agnete Mouritzen. 1980. "Epilepsy and Neuron Loss in the Hippocampus." *Epilepsia* 21(6): 617–29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6777154/> (July 31, 2020).
48. Danzer, Steve C. 2012. "Depression, Stress, Epilepsy and Adult Neurogenesis." *Experimental neurology* 233(1): 22–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684275> (June 13, 2019).
49. Derchansky, M. et al. 2004. "Model of Frequent, Recurrent, and Spontaneous Seizures in the Intact Mouse Hippocampus." *Hippocampus* 14(8): 935–47. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15390177/> (July 31, 2020).
50. DeVries, Steven H. 2001. "Exocytosed Protons Feedback to Suppress the Ca<sup>2+</sup> Current in Mammalian Cone Photoreceptors." *Neuron* 32(6): 1107–17. <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/exocytosed-protons-feedback-to-suppress-the-casup2sup-current-in-> (September 7, 2020).
51. Dingledine, R., M. A. Hynes, and G. L. King. 1986. "Involvement of N-methyl-D-aspartate Receptors in Epileptiform Bursting in the Rat Hippocampal Slice." *The Journal of Physiology* 380(1): 175–89. </pmc/articles/PMC1182931/?report=abstract> (September 4, 2020).



52. Dodt, Hans-ulrich, and Walter Zieglg. 1990. "Visualizing Unstained Neurons in Living Brain Slices by Infrared." *Brain Research* 537: 333–36.
53. Dreier, J P, and U Heinemann. 1991. "Regional and Time Dependent Variations of Low Mg<sup>2+</sup> Induced Epileptiform Activity in Rat Temporal Cortex Slices." *Experimental Brain Research* 87: 581–96.
54. Du, Jianyang et al. 2014. "Protons Are a Neurotransmitter That Regulates Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(24): 8961–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24889629/> (August 19, 2020).
55. Dyhrfeld-johnsen, Jonas, Robert J Morgan, Csaba Földy, and Ivan Soltesz. 2008. "Upregulated H-Current in Hyperexcitable CA1 Dendrites after Febrile Seizures." 2(April): 1–8.
56. Eccles, J. C., Rosamond M. Eccles, and F. Magni. 1961. "Central Inhibitory Action Attributable to Presynaptic Depolarization Produced by Muscle Afferent Volleys." *The Journal of Physiology* 159(1): 147–66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1359583/> (August 19, 2020).
57. Edwards, F A et al. 1989. "A Thin Slice Preparation for Patch Clamp Recordings from Neurones of the Mammalian Central Nervous System." *Journal of Physiology* 414: 600–612.
58. Ekdahl, Christine T et al. 2003. "Death Mechanisms in Status Epilepticus-Generated Neurons and Effects of Additional Seizures on Their Survival." *Neurobiology of disease* 14(3): 513–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678767> (June 13, 2019).
59. Ettaiche, Mohamed et al. 2004. "Acid-Sensing Ion Channel 2 Is Important for Retinal Function and Protects against Light-Induced Retinal Degeneration." *Journal of Neuroscience* 24(5): 1005–12.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14762118/> (August 19, 2020).
60. Ettaiche, Mohammed et al. 2006. "Silencing Acid-Sensing Ion Channel 1a Alters Cone-Mediated Retinal Function." *Journal of Neuroscience* 26(21): 5800–5809. <https://www.jneurosci.org/content/26/21/5800> (August 19, 2020).
61. Falco-walter, Jessica J, Ingrid E Sche, and Robert S Fisher. 2018. "The New de Fi Nition and Classi Fi Cation of Seizures and Epilepsy." 139(July 2017): 73–79.
62. Fanselow, Michael S., and Hong-Wei Dong. 2010. "Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?" *Neuron* 65(1): 7–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152109> (June 13, 2019).
63. Flatman, J. A., P. C. Schwindt, and W. E. Crill. 1986. "The Induction and Modification of Voltage-Sensitive Responses in Cat Neocortical Nuerons by N-Methyl-d-Aspartate." *Brain Research* 363(1): 62–77.
64. FRANKENHAEUSER, B., and A. L. HODGKIN. 1957. "The Action of Calcium on the Electrical Properties of Squid Axons." *The Journal of physiology* 137(2): 218–44. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1362975/> (September 4, 2020).
65. French, J a et al. 1993. "Characteristics of Medial Temporal Lobe Epilepsy: I. Results of History and Physical Examination." *Annals of neurology* 34(6): 774–80.
66. Friese, Manuel A. et al. 2007. "Acid-Sensing Ion Channel-1 Contributes to Axonal Degeneration in Autoimmune Inflammation of the Central Nervous System." *Nature Medicine* 13(12): 1483–89. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17994101/> (September 7, 2020).
67. FUJITA, Y., and H. SAKATA. 1962. "Electrophysiological Properties of CA1 and CA2 Apical Dendrites of Rabbit Hippocampus." *Journal of*

- neurophysiology* 25: 209–22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13895765/> (September 7, 2020).
68. Fujiwara-Tsukamoto, Yoko, Yoshikazu Isomura, and Masahiko Takada. 2006. “Comparable GABAergic Mechanisms of Hippocampal Seizurelike Activity in Posttetanic and Low-Mg<sup>2+</sup> Conditions.” *Journal of neurophysiology* 95(3): 2013–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339009>.
69. Furukawa, Katsutoshi, Kenjiro Yamana, and Kyuya Kogure. 1990. “Postischemic Alterations of Spontaneous Activities in Rat Hippocampal CA1 Neurons.” *Brain Research* 530(2): 257–60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2265357/> (July 8, 2020).
70. Galeffi, Francesca, George G. Somjen, Kelley A. Foster, and Dennis A. Turner. 2011. “Simultaneous Monitoring of Tissue PO<sub>2</sub> and NADH Fluorescence during Synaptic Stimulation and Spreading Depression Reveals a Transient Dissociation between Oxygen Utilization and Mitochondrial Redox State in Rat Hippocampal Slices.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31(2): 626–39. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2010.136>.
71. Galvan, Martin, Peter Grafe, and Gerrit Ten Bruggencate. 1982. “Convulsant Actions of 4-Aminopyridine on the Guinea-Pig Olfactory Cortex Slice.” *Brain Research* 241(1): 75–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7104708/> (September 7, 2020).
72. Gao, T. M., W. A. Pulsinelli, and Z. C. Xu. 1998. “Prolonged Enhancement and Depression of Synaptic Transmission in CA1 Pyramidal Neurons Induced by Transient Forebrain Ischemia in Vivo.” *Neuroscience* 87(2): 371–83.
73. Gao, T. M., and Z. C. Xu. 1996. “In Vivo Intracellular Demonstration of an Ischemia-Induced Postsynaptic Potential from CA1 Pyramidal Neurons

- in Rat Hippocampus.” *Neuroscience* 75(3): 665–69.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8951862/> (July 8, 2020).
74. Geiger, R P et al. 2006. “Patch-Clamp Recording from Mossy Fiber Terminals in Hippocampal Slices.” *Nature Protocols* 1(4): 2075–81.
75. Gillessen, Thomas, Samantha L. Budd, and Stuart A. Lipton. 2013. “Excitatory Amino Acid Neurotoxicity.” <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6108/> (September 4, 2020).
76. Gonzales, Kawate, Gouaux. 2017. “Pore Architecture and Ion Sites in Acid Sensing Ion Channels and P2X Receptors.” *Physiology & behavior* 176(3): 139–48.
77. Gonzalez-Sulser, Alfredo et al. 2011. “The 4-Aminopyridine in Vitro Epilepsy Model Analyzed with a Perforated Multi-Electrode Array.” *Neuropharmacology* 60(7–8): 1142–53.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20955719/> (September 7, 2020).
78. Goto, Yukiori, Charles R. Yang, and Satoru Otani. 2010. “Functional and Dysfunctional Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex: Roles in Psychiatric Disorders.” *Biological Psychiatry* 67(3): 199–207.  
<http://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006322309010464/fulltext> (August 18, 2020).
79. Graham, B., and S. Redman. 1994. “A Simulation of Action Potentials in Synaptic Boutons during Presynaptic Inhibition.” *Journal of Neurophysiology* 71(2): 538–49.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8176423/> (August 19, 2020).
80. Gründer, Stefan, and Xuanmao Chen. 2010. “Structure, Function, and Pharmacology of Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): Focus on ASIC1a.” *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 2(2): 73–94.
81. Gutiérrez, R, V Armand, S Schuchmann, and U Heinemann. 1999.

- “Epileptiform Activity Induced by Low  $Mg^{2+}$  in Cultured Rat Hippocampal Slices.” *Brain Research* 815(2): 294–303. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899398011020> (August 19, 2020).
82. Hablitz, J. J., and I. A. Langmoen. 1986. “N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists Reduce Synaptic Excitation in the Hippocampus.” *Journal of Neuroscience* 6(1): 102–6. [/pmc/articles/PMC6568622/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2867507/) (September 4, 2020).
83. Hablitz, John J. 1985. “Action of Excitatory Amino Acids and Their Antagonists on Hippocampal Neurons.” *Cellular and Molecular Neurobiology* 5(4): 389–405. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00755403> (September 4, 2020).
84. Hattiangady, B, M Rao, and A Shetty. 2004. “Chronic Temporal Lobe Epilepsy Is Associated with Severely Declined Dentate Neurogenesis in the Adult Hippocampus.” *Neurobiology of Disease* 17(3): 473–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15571983> (June 13, 2019).
85. Herron, C. E., R. A.J. Lester, E. J. Coan, and G. L. Collingridge. 1985. “Intracellular Demonstration of an N-Methyl-d-Aspartate Receptor Mediated Component of Synaptic Transmission in the Rat Hippocampus.” *Neuroscience Letters* 60(1): 19–23.
86. Herron, C. E., R. Williamson, and G. L. Collingridge. 1985. “A Selective N-Methyl-d-Aspartate Antagonist Depresses Epileptiform Activity in Rat Hippocampal Slices.” *Neuroscience Letters* 61(3): 255–60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2867507/> (September 4, 2020).
87. Hille, Bertil. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes, Third Edition*. Sunderland MA: SINAUER.
88. Hingray, Coraline, Aileen McGonigal, Iliana Kotwas, and Jean Arthur

- Micoulaud-Franchi. 2019. "The Relationship Between Epilepsy and Anxiety Disorders." *Current Psychiatry Reports* 21(6).
89. Holmes, G L, M Sarkisian, Y Ben-Ari, and N Chevassus-Au-Louis. 1999. "Mossy Fiber Sprouting after Recurrent Seizures during Early Development in Rats." *The Journal of comparative neurology* 404(4): 537–53.
90. Holmes, Gregory L. 1995. "Role of Glutamate and GABA in the Pathophysiology of Epilepsy." *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 1(3): 208–19.
91. Holmes, Gregory L. 1995. "Role of glutamate and GABA in the pathophysiology of epilepsy." *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 1(3): 208–19.
92. Huxley, Virginia H., and Howard Kutchai. 1981. "The Effect of the Red Cell Membrane and a Diffusion Boundary Layer on the Rate of Oxygen Uptake by Human Erythrocytes." *The Journal of Physiology* 316(1): 75–83.
93. Ievglevskiy, O. et al. 2016. "Acid-Sensing Ion Channels Regulate Spontaneous Inhibitory Activity in the Hippocampus: Possible Implications for Epilepsy." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1700).
94. Imamura, Shin ichi et al. 2001. "Hippocampal Transection Attenuates Kainic Acid-Induced Amygdalar Seizures in Rats." *Brain Research* 897(1–2): 93–103. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11282362/> (July 31, 2020).
95. Isaev, Dmytro et al. 2012. "Surface Charge Impact in Low-Magnesium Model of Seizure in Rat Hippocampus." *Journal of Neurophysiology* 107(1): 417–23. [/pmc/articles/PMC3349697/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22444444/) (August 19,

- 2020).
96. Isaeva, Elena, Arthur Romanov, Gregory L Holmes, and Dmytro Isaev. 2016. "Status Epilepticus Results in Region-Specific Alterations in Seizure Susceptibility along the Hippocampal Longitudinal Axis." *Epilepsy Res.* (110): 166–70.
  97. Ivanov, Anton, and Yuri Zilberter. 2011. "Critical State of Energy Metabolism in Brain Slices: The Principal Role of Oxygen Delivery and Energy Substrates in Shaping Neuronal Activity." *Frontiers in Neuroenergetics* 3(DEC): 1–13.
  98. Iyengar, Sloka S et al. 2015. "Suppression of Adult Neurogenesis Increases the Acute Effects of Kainic Acid." *Experimental neurology* 264: 135–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25476494> (June 13, 2019).
  99. Jefferys, J. G.R., and H. L. Haas. 1982. "Synchronized Bursting of CA1 Hippocampal Pyramidal Cells in the Absence of Synaptic Transmission." *Nature* 300(5891): 448–50. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6292731/> (September 4, 2020).
  100. Jentsch, Thomas J., Valentin Stein, Frank Weinreich, and Anselm A. Zdebik. 2002. "Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels." *Physiological Reviews* 82(2): 503–68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11917096/> (August 19, 2020).
  101. Jiang, Nan et al. 2017. "Region Specific Contribution of ASIC2 to Acidosis-and Ischemia-Induced Neuronal Injury." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37(2): 528–40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26861816/> (August 19, 2020).
  102. Jing, Lan et al. 2012. "N-Glycosylation of Acid-Sensing Ion Channel 1a Regulates Its Trafficking and Acidosis-Induced Spine Remodeling." *Journal of Neuroscience* 32(12): 4080–91.
  103. Jonathan T. Ting, Tanya L. Daigle, Qian Chen, Guoping Feng.

2014. “Acute Brain Slice Methods for Adult and Aging Animals: Application of Targeted Patch Clampanalysis and Optogenetics.” *Methods Mol Biol* 1183: 221–42.
104. Kadam, Shilpa D, Andrew M White, Kevin J Staley, and F Edward Dudek. 2010. “Continuous Electroencephalographic Monitoring with Radio-Telemetry in a Rat Model of Perinatal Hypoxia-Ischemia Reveals Progressive Post-Stroke Epilepsy.” *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30(1): 404–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20053921> (June 13, 2019).
105. Kaila, Kai. 1994. “Ionic Basis of GABAA Receptor Channel Function in the Nervous System.” *Progress in Neurobiology* 42(4): 489–537. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7522334/> (August 19, 2020).
106. Kann, Oliver et al. 2011. “Gamma Oscillations in the Hippocampus Require High Complex I Gene Expression and Strong Functional Performance of Mitochondria.” *Brain* (2010).
107. Karnam, Havisha B et al. 2009. “Early Life Seizures Cause Long-Standing Impairment of the Hippocampal Map.” *Experimental neurology* 217(2): 378–87.
108. Katz, B., and R. Miledi. 1968. “The Role of Calcium in Neuromuscular Facilitation.” *The Journal of Physiology* 195(2): 481–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4296699> (June 13, 2019).
109. Khazipov, Roustem, Guzel Valeeva, and Ilgam Khalilov. 2015. “Depolarizing GABA and Developmental Epilepsies.” *CNS Neuroscience and Therapeutics* 21(2): 83–91.
110. King, David, Richard A. Bronen, Dennis D. Spencer, and Susan S. Spencer. 1997. “Topographic Distribution of Seizure Onset and Hippocampal Atrophy: Relationship between MRI and Depth EEG.” *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 103(6): 692–97.



111. Konnerth, A., U. Heinemann, and Y. Yaari. 1984. "Slow Transmission of Neural Activity in Hippocampal Area CA1 in Absence of Active Chemical Synapses." *Nature* 307(5946): 69–71. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6318119/> (September 4, 2020).
112. Kraig, R. P., C. R. Ferreira Filho, and C. Nicholson. 1983. "Alkaline and Acid Transients in Cerebellar Microenvironment." *Journal of Neurophysiology* 49(3): 831–50. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6834101/> (September 7, 2020).
113. Krishtal, O. A., Yu V. Osipchuk, T. N. Shelest, and S. V. Smirnov. 1987. "Rapid Extracellular PH Transients Related to Synaptic Transmission in Rat Hippocampal Slices." *Brain Research* 436(2): 352–56. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2829992/> (August 19, 2020).
114. Lee, C. Justin et al. 2002. "Functional Expression of AMPA Receptors on Central Terminals of Rat Dorsal Root Ganglion Neurons and Presynaptic Inhibition of Glutamate Release." *Neuron* 35(1): 135–46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12123614/> (August 19, 2020).
115. Lewis, Darrell V, Leslie Sargent, and D M David. 1990. "Hippocampal Epileptiform Activity Induced by Magnesium-Free Medium: Differences between Areas CA1 and CA2-3." *Epilepsy Research* 6: 95–101.
116. Li, Wei Guang et al. 2016. "ASIC1a Regulates Insular Long-Term Depression and Is Required for the Extinction of Conditioned Taste Aversion." *Nature Communications* 7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27924869/> (August 19, 2020).
117. Lipka, Kerstin, and H. H. Bülow. 2003. "Lactic Acidosis Following Convulsions." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 47(5): 616–18.
118. Lipton, Peter. 1999. "Ischemic Cell Death in Brain Neurons." *Physiological Reviews* 79(4): 1431–1568.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508238/> (August 19, 2020).
119. LLINÁS, RODOLFO R., MUTSUYUKI Sugimori, and BRUCE Cherksey. 1989a. “Voltage-Dependent Calcium Conductances in Mammalian Neurons: The P Channel.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 560(1): 103–11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2545128/> (September 4, 2020).
  120. ———. 1989b. “Voltage-Dependent Calcium Conductances in Mammalian Neurons: The P Channel.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 560(1): 103–11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2545128/> (September 7, 2020).
  121. Lüttgau, H. C., and H. G. Glitsch. 1976. “Membrane Physiology of Nerve and Muscle Fibres.” *Fortschritte der Zoologie* 24(1): 1–132. <https://europepmc.org/article/med/770298> (September 7, 2020).
  122. Macvicar, Brian A. 1984. “Infrared Video Microscopy to Visualize Neurons in the in Vitro Brain Slice Preparation.” *Journal of Neuroscience Methods* 12: 133–39.
  123. Di Maio, Roberto. 2014. “Neuronal Mechanisms of Epileptogenesis.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8(February): 1–2. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00029/abstract>.
  124. Mango, D., and R. Nisticò. 2019. “Acid-Sensing Ion Channel 1A Is Involved in N-Methyl D-Aspartate Receptor-Dependent Long-Term Depression in the Hippocampus.” *Frontiers in Pharmacology* 10(MAY). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31178731/> (August 19, 2020).
  125. Masamoto, Kazuto et al. 2003. “Biphasic Changes in Tissue Partial Pressure of Oxygen Closely Related to Localized Neural Activity in Guinea Pig Auditory Cortex.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23(9): 1075–84.
  126. Mayer, M. L., and G. L. Westbrook. 1985. “The Action of

- N-methyl-D-aspartic Acid on Mouse Spinal Neurones in Culture.” *The Journal of Physiology* 361(1): 65–90. [/pmc/articles/PMC1192847/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6325946/) (September 4, 2020).
127. Mayer, Mark L., and Gary L. Westbrook. 1987. “The Physiology of Excitatory Amino Acids in the Vertebrate Central Nervous System.” *Progress in Neurobiology* 28(3): 197–276.
128. Mayer, Mark L., Gary L. Westbrook, and Peter B. Guthrie. 1984. “Voltage-Dependent Block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA Responses in Spinal Cord Neurones.” *Nature* 309(5965): 261–63. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6325946/> (September 4, 2020).
129. McLaughlin, S. G.A., G. Szabo, and G. Eisenman. 1971. “Divalent Ions and the Surface Potential of Charged Phospholipid Membranes.” *Journal of General Physiology* 58(6): 667–87. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5120393/> (September 7, 2020).
130. McNamara. 1994. “Cellular and Molecular Basis of Epilepsy.” *The Journal of Neuroscience* 14(6): 3413–25.
131. Miesenböck, Gero, Dino A. De Angelis, and James E. Rothman. 1998. “Visualizing Secretion and Synaptic Transmission with PH-Sensitive Green Fluorescent Proteins.” *Nature* 394(6689): 192–95. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9671304/> (September 7, 2020).
132. Mitani, Akira et al. 1990. “Gerbil Hippocampal Extracellular Glutamate and Neuronal Activity after Transient Ischemia.” *Brain Research Bulletin* 25(2): 319–24.
133. Mitterdorfer, Jörg, and Bruce P. Bean. 2002. “Potassium Currents during the Action Potential of Hippocampal CA3 Neurons.” *Journal of Neuroscience* 22(23): 10106–15.
134. Mody, I., J. D.C. Lambert, and U. Heinemann. 1987. “Low Extracellular Magnesium Induces Epileptiform Activity and Spreading

- Depression in Rat Hippocampal Slices.” *Journal of Neurophysiology* 57(3): 869–88.  
<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/jn.1987.57.3.869>  
 (September 4, 2020).
135. Monaghan, D. T., and C. W. Cotman. 1985. “Distribution of N-Methyl-D-Aspartate-Sensitive L-[3H]Glutamate-Binding Sites in Rat Brain.” *Journal of Neuroscience* 5(11): 2909–19.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2865341/> (September 4, 2020).
136. Monyer, Hannah et al. 1994. “Developmental and Regional Expression in the Rat Brain and Functional Properties of Four NMDA Receptors.” *Neuron* 12: 529–40.
137. Morris, R. G.M., E. Anderson, G. S. Lynch, and M. Baudry. 1986. “Selective Impairment of Learning and Blockade of Long-Term Potentiation by an N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonist, AP5.” *Nature* 319(6056): 774–76. <https://www.nature.com/articles/319774a0>  
 (September 4, 2020).
138. Mulkey, Daniel K et al. 2001. “Oxygen Measurements in Brain Stem Slices Exposed to Normobaric Hyperoxia and Hyperbaric Oxygen.” *J Appl Physiol* 90: 1887–99.
139. Nashmi, Raad et al. 2002. “Patch-Clamp Recordings from White Matter Glia in Thin Longitudinal Slices of Adult Rat Spinal Cord.” *Journal of Neuroscience Methods* 117: 159–66.
140. Navidhamidi, Mojdeh, Maeheh Ghasemi, and Nasrin Mehranfard. 2017. “Epilepsy-Associated Alterations in Hippocampal Excitability.” : 1–28.
141. Naylor, David E., Hantao Liu, Jerome Niquet, and Claude G. Wasterlain. 2013. “Rapid Surface Accumulation of NMDA Receptors Increases Glutamatergic Excitation during Status Epilepticus.”

*Neurobiology of Disease* 54: 225–38.

142. Neher, B Y Erwin, and Bert Sakmann. 1976a. “NOISE ANALYSIS OF DRUG INDUCED VOLTAGE CLAMP CURRENTS IN DENERVATED FROG MUSCLE FIBRES.” *J. Physiol.* 258: 705–29.
143. ———. 1976b. “Single-Channel Currents Recorded from Membrane of Denervated Frog Muscle Fibres.” *Nature* 280: 799–802.
144. Noël, Jacques et al. 2010. “Current Perspectives on Acid-Sensing Ion Channels: New Advances and Therapeutic Implications.” *Expert review of clinical pharmacology* 3(3): 331–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111614> (November 29, 2019).
145. Nowak, L. et al. 1984. “Magnesium Gates Glutamate-Activated Channels in Mouse Central Neurones.” *Nature* 307(5950): 462–65. <https://www.nature.com/articles/307462a0> (September 4, 2020).
146. Pandis, C. et al. 2006. “Differential Expression of NMDA and AMPA Receptor Subunits in Rat Dorsal and Ventral Hippocampus.” *Neuroscience* 140(1): 163–75.
147. Papatheodoropoulos, C., C. Moschovos, and G. Kostopoulos. 2005. “Greater Contribution of N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptors in Ventral Compared to Dorsal Hippocampal Slices in the Expression and Long-Term Maintenance of Epileptiform Activity.” *Neuroscience* 135(3): 765–79.
148. Papatheodoropoulos, C, and G Kostopoulos. 2000. “Dorsal-Ventral Differentiation of Short-Term Synaptic Plasticity in Rat CA1 Hippocampal Region.” *Neuroscience Letters* 286(1): 57–60.
149. Papatheodoropoulos, Costas, Eftihia Asproдини, Ioanna Nikita, and Christina Koutsona. 2002. “Weaker Synaptic Inhibition in CA1 Region of Ventral Compared to Dorsal Rat Hippocampal Slices.” *Brain Research* 948: 117–21.

150. Patel, Amanda J., and Eric Honoré. 2001. "Properties and Modulation of Mammalian 2P Domain K<sup>+</sup> Channels." *Trends in Neurosciences* 24(6): 339–46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11356506/> (August 19, 2020).
151. Perez, Yael, France Morin, Clermont Beaulieu, and Jean-claude Lacaille. 1996. "Axonal Sprouting of CA1 Pyramidal Cells in Hyperexcitable Hippocampal Slices of Kainate-Treated Rats." 8(October 1995).
152. Pfeiffer, Michael, Andreas Draguhn, Hartmut Meierkord, and Uwe Heinemann. 1996. "Effects of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA) Agonists and GABA Uptake Inhibitors on Pharmacosensitive and Pharmacoresistant Epileptiform Activity in Vitro." *British Journal of Pharmacology* 119(3): 569–77. [/pmc/articles/PMC1915701/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111111/) (August 19, 2020).
153. Pinto, Vitor, Boris V Safronov, and Peter Sz. 2009. "Advanced Technique of Infrared LED Imaging of Unstained Cells and Intracellular Structures in Isolated Spinal Cord, Brainstem, Ganglia and Cerebellum." 177: 369–80.
154. Pitka, Asla, Katarzyna Lukasiuk, F Edward Dudek, and Kevin J Staley. 2015. "Epileptogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives Med* (5): 1–17.
155. Pitkänen, Asla, and Katarzyna Lukasiuk. 2009. "Molecular and Cellular Basis of Epileptogenesis in Symptomatic Epilepsy." *Epilepsy & Behavior* 14(1): 16–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18835369> (June 13, 2019).
156. Pitkänen, Asla, Katarzyna Lukasiuk, F. Edward Dudek, and Kevin J. Staley. 2015a. "Epileptogenesis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(10): a022822.

- <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a022822> (June 13, 2019).
157. ———. 2015b. “Epileptogenesis.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(10): a022822. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26385090> (June 13, 2019).
  158. Price, M. P. et al. 2014. “Localization and Behaviors in Null Mice Suggest That ASIC1 and ASIC2 Modulate Responses to Aversive Stimuli.” *Genes, Brain and Behavior* 13(2): 179–94. [/pmc/articles/PMC3998777/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3998777/?report=abstract) (August 19, 2020).
  159. Raimondo, Joseph V et al. 2017. “Methodological Standards for in Vitro Models of Epilepsy and Epileptic Seizures . A TASK1-WG4 Report of the AES / ILAE Translational Task Force of the ILAE.” : 40–52.
  160. Reeh, Peter W., and Kay H. Steen. 1996. “Chapter 8. Tissue Acidosis in Nociception and Pain.” *Progress in Brain Research* 113(C): 143–51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9009732/> (August 19, 2020).
  161. Rodríguez-Moreno, Antonio, Oscar Herreras, and Juan Lerma. 1997. “Kainate Receptors Presynaptically Downregulate GABAergic Inhibition in the Rat Hippocampus.” *Neuron* 19(4): 893–901. <http://www.cell.com/article/S0896627300809708/fulltext> (August 19, 2020).
  162. Rowley, Nicole M., Karsten K. Madsen, Arne Schousboe, and H. Steve White. 2012. “Glutamate and GABA Synthesis, Release, Transport and Metabolism as Targets for Seizure Control.” *Neurochemistry International* 61(4): 546–58.
  163. Rudolph, Uwe, and Frédéric Knoflach. 2011. “Beyond Classical Benzodiazepines: Novel Therapeutic Potential of GABA A Receptor Subtypes.” *Nature Reviews Drug Discovery* 10(9): 685–97.
  164. Safronov, Pinto, and Derkach. 2009. “High-Resolution Single-Cell

- Imaging for Functional Studies in the Whole Brain and Spinal Cord and Thick Tissue Blocks Using Light- Emitting Diode Illumination.” *J Neurosci Methods* 164(2): 292–98.
165. Scheffer, Ingrid E et al. 2018. “ILAE Classification of the Epilepsies Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.” 58(4): 512–21.
166. Schwartzkroin, P. A. 1986. “Hippocampal Slices in Experimental and Human Epilepsy.” *Advances in neurology* 44: 991–1010.
167. Sharma, Alok K. et al. 2007. “Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions.” *Toxicologic Pathology* 35(7): 984–99.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098044> (June 13, 2019).
168. Sherwood, Thomas W., Kirsten G. Lee, Matthew G. Gormley, and Candice C. Askwith. 2011. “Heteromeric Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) Composed of ASIC2b and ASIC1a Display Novel Channel Properties and Contribute to Acidosis-Induced Neuronal Death.” *Journal of Neuroscience* 31(26): 9723–34.
169. Shimizu, Hiroyuki et al. 2006. “Hippocampal Transection for Treatment of Left Temporal Lobe Epilepsy with Preservation of Verbal Memory.” *Journal of Clinical Neuroscience* 13(3): 322–28.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16517167/> (July 31, 2020).
170. Sluka, Kathleen A., Olivia C. Winter, and John A. Wemmie. 2009. “Acid-Sensing Ion Channels: A New Target for Pain and CNS Diseases.” *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 12(5): 693–704.
171. Sombati, S., and R. J. DeLorenzo. 1995. “Recurrent Spontaneous Seizure Activity in Hippocampal Neuronal Networks in Culture.” *Journal of Neurophysiology* 73(4): 1706–11.  
<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/jn.1995.73.4.1706>



- (August 19, 2020).
172. Somjen, George G. 1984. "Acidification of Interstitial Fluid in Hippocampal Formation Caused by Seizures and by Spreading Depression." *Brain Research* 311(1): 186–88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6488041/> (September 7, 2020).
  173. Spencer et al. 1984. "Access to the Posterior Medial Temporal Lobe Structures in the Surgical Treatment of Temporal Lobe Epilepsy." *Neurosurgery* 15(5): 667–71.
  174. Stafstrom, C., and L. Carmant. 2015. "Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(6): 1–18.
  175. Stafstrom, Carl E. 1998. "Back to Basics: The Pathophysiology of Epileptic Seizures: A Primer For Pediatricians." *Pediatrics in Review* 19(10): 342–51. <http://pedsinreview.aappublications.org/lookup/doi/10.1542/pir.19-10-342>.
  176. Sutherland, S. P. 2001. "From the Cover: Acid-Sensing Ion Channel 3 Matches the Acid-Gated Current in Cardiac Ischemia-Sensing Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(2): 711–16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11120882/> (August 19, 2020).
  177. Sydorenko, V. G. et al. 2016. "Modulation of 4-Aminopyridine-Induced Neuronal Activity and Local PO<sub>2</sub> in Rat Hippocampal Slices by Changing the Flow Rate of the Superfusion Medium." *Fiziologichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)* 62(4): 3–11.
  178. T'ellez-Zenteno, Jose F., and Lizbeth Hern'andez-Ronquillo. 2012. "A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy." *Epilepsy Research and Treatment* 2012.
  179. Taylor, Charles P., and F. Edward Dudek. 1982. "Synchronous

- Neural Afterdischarges in Rat Hippocampal Slices without Active Chemical Synapses.” *Science* 218(4574): 810–12. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7134978/> (September 4, 2020).
180. Timofeev, Igor, Sylvain Chauvette, and Sara Soltani. 2014. 114 Modern Concepts of Focal Epileptic Networks *Neocortical Focus: Experimental View*. 1st ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-418693-4.00002-9>.
181. Toyoda, Izumi, Mark R. Bower, Fernando Leyva, and Paul S. Buckmaster. 2013. “Early Activation of Ventral Hippocampus and Subiculum during Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy.” *Journal of Neuroscience* 33(27): 11100–115. <https://www.jneurosci.org/content/33/27/11100> (July 31, 2020).
182. Umeoka, Shuichi C. et al. 2012. “Requirement of Longitudinal Synchrony of Epileptiform Discharges in the Hippocampus for Seizure Generation: A Pilot Study - Clinical Article.” *Journal of Neurosurgery* 116(3): 513–24. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22175726/> (July 31, 2020).
183. Varming, Thomas. 1999. “Proton-Gated Ion Channels in Cultured Mouse Cortical Neurons.” *Neuropharmacology* 38(12): 1875–81. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10608282/> (August 19, 2020).
184. Vergo, Sandra et al. 2011. “Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Involved in Both Axonal Injury and Demyelination in Multiple Sclerosis and Its Animal Model.” *Brain* 134(2): 571–84. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21233144/> (September 7, 2020).
185. Vlasiuk, A, A Romanov, D Isaev, and E Isaeva. 2017. “Effect of Altered Extracellular Magnesium Concentration on the Neuronal Activity in Different Hippocampal Regions of Immature Rats.” *Fiziologichnyi Zhurnal* 63(2): 10–16.

186. Vukicevic, Marija, and Stephan Kellenberger. 2004. "Modulatory Effects of Acid-Sensing Ion Channels on Action Potential Generation in Hippocampal Neurons." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287(3 56-3): 682–91.
187. Walker MC, White HS, Sander JW. 2002. "Disease Modification in Partial Epilepsy." *Brain* 125(9): 1937–50.
188. Watkins, J. C., and R. H. Evans. 1981. "Excitatory Amino Acid Transmitters." *Annual review of pharmacology and toxicology* 21: 165–204. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6112965/> (September 4, 2020).
189. Wemmie, John A. et al. 2002. "The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory." *Neuron* 34(3): 463–77.
190. ———. 2003. "Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning." *Journal of Neuroscience* 23(13): 5496–5502. <http://www.jneurosci.org/cgi/content/full/23/13/5496> (September 7, 2020).
191. ———. 2004. "Overexpression of Acid-Sensing Ion Channel 1a in Transgenic Mice Increases Acquired Fear-Related Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(10): 3621–26. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14988500/> (August 19, 2020).
192. Wilkins, Megan E., Alastair M. Hosie, and Trevor G. Smart. 2005. "Proton Modulation of Recombinant GABAA Receptors: Influence of GABA Concentration and the  $\beta$  Subunit TM2-TM3 Domain." *Journal of Physiology* 567(2): 365–77. </pmc/articles/PMC1474194/?report=abstract> (August 19, 2020).
193. Xiong, Zhi Gang et al. 2004. "Neuroprotection in Ischemia:

- Blocking Calcium-Permeable Acid-Sensing Ion Channels.” *Cell* 118(6): 687–98. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15369669/> (August 19, 2020).
194. ———. 2008. “Acid-Sensing Ion Channels (ASICs) as Pharmacological Targets for Neurodegenerative Diseases.” *Current Opinion in Pharmacology* 8(1): 25–32. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17945532/> (August 19, 2020).
195. Xiong, Zhi Gang, Xiang Ping Chu, and Roger P. Simon. 2007. “Acid Sensing Ion Channels - Novel Therapeutic Targets for Ischemic Brain Injury.” *Frontiers in Bioscience* 12(4): 1376–86. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17127388/> (August 19, 2020).
196. Xiong, Zhi Qi, and Janet L. Stringer. 2000. “Extracellular PH Responses in CA1 and the Dentate Gyms during Electrical Stimulation, Seizure Discharges, and Spreading Depression.” *Journal of Neurophysiology* 83(6): 3519–24. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10848567/> (September 7, 2020).
197. Xu, Z C, T M Gao, and Y Ren. 1999. “Neurophysiological Changes Associated with Selective Neuronal Damage in Hippocampus Following Transient Forebrain Ischemia.” *Biological signals and receptors* 8(4–5): 294–308. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494015> (July 8, 2020).
198. Xu, Z C, and W A Pulsinelli. 1996. “Electrophysiological Changes of CA1 Pyramidal Neurons Following Transient Forebrain Ischemia: An in Vivo Intracellular Recording and Staining Study.” *Journal of neurophysiology* 76(3): 1689–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8890285> (July 8, 2020).
199. Yaari, Y., A. Konnerth, and U. Heinemann. 1983. “Spontaneous Epileptiform Activity of Ca1 Hippocampal Neurons in Low Extracellular Calcium Solutions.” *Experimental Brain Research* 51(1): 153–56. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00236813> (September 4,

- 2020).
200. Yang, Qian et al. 2017. “Extrasynaptic NMDA Receptor Dependent Long-Term Potentiation of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons.” (February): 1–9.
  201. Yao, J. A., and G. N. Tseng. 1994. “Modulation of 4-AP Block of a Mammalian A-Type K Channel Clone by Channel Gating and Membrane Voltage.” *Biophysical Journal* 67(1): 130–42. [/pmc/articles/PMC1225342/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1225342/) (September 7, 2020).
  202. Yoder, Nate, Craig Yoshioka, and Eric Gouaux. 2018. “Gating Mechanisms of Acid-Sensing Ion Channels.” *Nature* 000(1). <http://dx.doi.org/10.1038/nature25782>.
  203. Yu, Zhe et al. 2018. “The Acid-Sensing Ion Channel ASIC1a Mediates Striatal Synapse Remodeling and Procedural Motor Learning.” *Science Signaling* 11(542). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30087178/> (August 19, 2020).
  204. Zeng, Wei Zheng et al. 2015. “Activation of Acid-Sensing Ion Channels by Localized Proton Transient Reveals Their Role in Proton Signaling.” *Scientific Reports* 5. [/pmc/articles/PMC4569896/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24569896/) (August 19, 2020).
  205. Zha, Xiang-ming. 2013. “Acid-Sensing Ion Channels : Trafficking and Synaptic Function.” *Molecular Brain* 6(1): 1. Molecular Brain.
  206. Zha, Xiang Ming et al. 2009. “ASIC2 Subunits Target Acid-Sensing Ion Channels to the Synapse via an Association with PSD-95.” *Journal of Neuroscience* 29(26): 8438–46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19571134/> (August 19, 2020).
  207. Zha, Xiang Ming, John A. Wemmie, Steven H. Green, and Michael J. Welsh. 2006. “Acid-Sensing Ion Channel 1a Is a Postsynaptic Proton Receptor That Affects the Density of Dendritic Spines.” *Proceedings of*

*the National Academy of Sciences of the United States of America*  
103(44): 16556–61.

208. Zhang, Ping, and Cecilia M. Canessa. 2002. “Single Channel Properties of Rat Acid-Sensitive Ion Channel-1 $\alpha$ , -2a, and -3 Expressed in *Xenopus* Oocytes.” *Journal of General Physiology* 120(4): 553–66.
209. Zhang, S. J., and M. B. Jackson. 1995. “Properties of the GABA(A) Receptor of Rat Posterior Pituitary Nerve Terminals.” *Journal of Neurophysiology* 73(3): 1135–44.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7608760/> (August 19, 2020).
210. Zhu-Rong, Ye, Liu Kai-Feng, and Julio H. Garcia. 2001. “Mechanisms of Neuronal Cell Death After Ischemic Injury to the Brain.” In *Current Review of Cerebrovascular Disease*, Current Medicine Group, 15–24. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-0001-4\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-0001-4_2) (August 19, 2020).
211. Ziemann, Adam E. et al. 2008. “Seizure Termination by Acidosis Depends on ASIC1a.” *Nature Neuroscience* 11(7): 816–22.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18536711/> (August 19, 2020).
212. ———. 2009. “The Amygdala Is a Chemosensor That Detects Carbon Dioxide and Acidosis to Elicit Fear Behavior.” *Cell* 139(5): 1012–21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945383/> (August 19, 2020).