

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

БОГОВИК РУСЛАН ІГОРОВИЧ

УДК 616.8-009.24 : 616.8 : 616.831 : 599.323.45

**РОЛЬ ПРОТЕАЗААКТИВОВАНИХ РЕЦЕПТОРІВ ПЕРШОГО ТИПУ У
РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ ТА ЙОГО НАСЛІДКІВ У ЩУРІВ**

03.00.02 – Біофізика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, академік НАН України,

Кришталь Олег Олександрович

директор Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,

зав. відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Берченко Ольга Григорівна

Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України,
зав. лабораторії нейрофізіології, імунології та біохімії

кандидат біологічних наук

Гурмач Василь Васильович

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Інститут високих технологій, молодший науковий
молодший науковий співробітник

Захист дисертації відбудеться «20» жовтня 2020 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.0 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:

http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «18» вересня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



О.П. Любанова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Запис електрофізіологічних сигналів мозку з експериментальних тварин які вільно рухаються, є важливим підходом до вивчення та розуміння роботи мозку у відносно природних умовах. Тривалий запис сигналів можна здійснювати за допомогою дротового з'єднання тіла тварини до підсилювачів та записуючої апаратури. Однак пряме з'єднання тварини із записуючим пристроєм, за допомогою дротів, що з'єднують електрод на голові тварини з підсилювачем, не тільки обмежує тварину в її рухомості та дослідницькій поведінці, але може також діяти як сильний стрес-фактор та як потенційне джерело експериментальних артефактів що призводить до додаткової похибки вимірів (Kramer et al., 2001), тим самим змінюючи різні фізіологічні параметри (Tang et al., 2004). Ці проблеми дротових систем стають ще більш виражені під час проведення реєстрації протягом епілептичного статусу (ЕС). Тому розробка бездротових телеметричних систем, які позбавлені недоліків дротових систем та спеціально спроектовані для роботи в умовах ЕС й проведення поведінкових тестів, є актуальним напрямом для досліджень, які пов'язані з епілепсією.

Сучасне розуміння механізмів, залучених до розвитку ЕС внаслідок порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ), досі залишається не повним. Дисфункція ГЕБ провокує ранні запальні процеси, що може приводити до розвитку ЕС (Marchi et al., 2007). Цілісність ГЕБ порушується в різних ділянках мозку під час розвитку ЕС (van Vliet et al., 2007). Так, порушення ГЕБ було виявлено у гіпокампі, корі, таламусі, мигдалеподібному тілі та нюховій цибуліні протягом різних періодів епілептогенезу. Зважаючи на це, дослідження направлені на визначення того яким чином відбувається розвиток ЕС у різних ділянках мозку, які пов'язують з порушенням ГЕБ, є досить важливими для розуміння процесів залучених до розвитку епілепсії. Також, у результаті порушення ГЕБ, до мозку можуть потрапляти різні компоненти крові, які здатні впливати на збудливість нейронів. В якості потенційних чинників епілептогенезу наразі розглядаються серинові протеази, зокрема тромбін (Maggio et al., 2013). Так, було показано, що тромбін впливає на процеси пластичності та збудливості нейронних мереж шляхом активації протеазаактивованого рецептора першого типу (ПАР1). Активація ПАР1 призводить до значного підвищення збудливості нейронних мереж, що може провокувати розвиток ЕС при різних травмах та патологіях (Ben Shimon et al., 2015). Останні дослідження свідчать, що системне пригнічення функції ПАР1 може мати антиепілептогенний ефект. Проте, функційна роль ПАР1 у розвитку ЕС та супутніх поведінкових розладів залишається практично невивченою.

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 в рамках науково-дослідних робіт: «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).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у визначенні змін амплітудо-частотних характеристик локальних потенціалів нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалеподібного тіла під час розвитку епілептичного статусу та у визначенні впливу протеазаактивованих рецепторів першого типу на зміни амплітудо-частотних характеристик локальних потенціалів гіпокампа під час розвитку епілептичного статусу та на поведінкові реакції під час латентного та хронічного періодів розвитку епілепсії у дорослих щурів.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Розробити прототип багатоканальної бездротової системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів головного мозку щурів.
2. Оцінити зміни амплітудних та частотних характеристик локальних потенціалів гіпокампа, мигдалеподібного тіла та нюхової цибулини під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.
3. Провести аналіз змін амплітудо-частотних характеристик локальних потенціалів гіпокампа щурів під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії за умов пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу.
4. Визначити зміни поведінкових реакцій дорослих щурів у латентний та хронічний періоди епілептогенезу за умов пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу.

Об'єкт дослідження: локальні потенціали мозку та поведінкові реакції щурів

Предмет дослідження: зміни локальних потенціалів мозку при розвитку епілептичного статусу та зміни поведінкових реакцій дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії за умови блокування ПАР1.

Методи дослідження. Метод імплантації електродів до мозку дорослих щурів, реєстрація локальних потенціалів гіпокампа, нюхової цибулини та мигдалеподібного тіла, проведення поведінкових тестів на дослідження локомоторної активності, тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті, метод оцінки тяжкості судом за шкалою Расіна, статистично-математичне опрацювання результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше досліджено зміни амплітудо-частотних характеристик локальних потенціалів у нюховій цибулині, гіпокампі та мигдалеподібному тілі під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Дуже цікавим виявилось те, що інтеріктальні спалахи нейронної активності з'являються раніше у нюховій цибулині, ніж в гіпокампі та мигдалеподібному тілі. Також показано, що зміни потужності локальних потенціалів під час розвитку ЕС значно більші у нюховій цибулині у порівнянні з іншими ділянками мозку. Отримані дані вказують на можливу роль нюхової цибулини у розвитку епілептичного статусу. Окрім внеску в загальне розуміння кінетики змін різних ритмів при розвитку ЕС в різних ділянках головного мозку, у роботі вперше продемонстровано вплив фармакологічної блокади ПАР1 на потужність тета- та гамма-ритмів під час транзитної фази становлення ЕС. Також вперше продемонстровано, що фармакологічна блокада ПАР1 нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу.

Практичне значення отриманих результатів. Результати, отримані в роботі, мають в основному фундаментальне значення, оскільки розширюють наявні уявлення щодо залучення ПАР1 у механізми розвитку ЕС та супутніх поведінкових розладів. А саме, показано роль ПАР1 у розвитку ЕС, та вплив фармакологічної блокади цих рецепторів на поведінкові реакції у латентний та хронічний періоди розвитку епілепсії. Також в роботі представлені докази залучення нюхової цибулини у розвиток епілептичного статусу. Практична цінність роботи полягає у розробці прототипу багатоканальної бездротової системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів головного мозку щурів. Його використання для одночасних записів електричної активності від різних ділянок мозку, дає можливість виконати більш детальне дослідження розвитку ЕС. Доведена перспективність використання ПАР1 у якості терапевтичної мішені при розвитку набуті епілепсії.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем сформульовані задачі дослідження, разом зі співавторами сплановані та реалізовані експериментальні протоколи. Розроблено друковану плату бездротової системи реєстрації. Проведені операції по вживленню електродів. Аналіз, статистична обробка та узагальнення результатів проведені автором самостійно. Поведінкові експерименти та оформлення публікацій були проведені разом зі співавторами. Проведення електрофізіологічних досліджень та розробка прототипу бездротової системи реєстрації потенціалів проводилося у співпраці із молодшим науковим співробітником Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Федорюком М.П. Мета дослідження, планування робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника д.б.н, академіка Кришталя О.О., а також д.б.н., проф. Ісаєвої О.В.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження були представлені 35-му симпозіумі Ернста Кленка з молекулярної медицини (Кельн, 2019), на з'їзді Американського товариства нейронаук (Чикаго, 2019), регіональному з'їзді Європейської федерації нейронаук (Белград, 2019), 20-му з'їзді Українського фізіологічного товариства (Київ, 2019), VII з'їзді Українського біофізичного товариства, (Київ, 2018), Оксфордській школі нейронаук (Оксфорд, 2018), міжнародному форумі «Україна майбутнього (Бердянськ, 2018), міжнародному симпозіумі «Фізіологія гладеньких м'язів, біофізика та фармакологія» (Київ, 2018), міжнародній конференції «Наукова активність як шлях формування майбутнього фахівця» (Суми, 2018), VII Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2017), 8-а Міжнародна конференція з кібер-фізичних систем та інтернет-речей «CPS & IoT'2020» (Будва, 2020), XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2020» (Житомир, 2020), 9-ій середземноморській конференції з вбудованих систем «MECO'2020» (Будва, 2020).

Публікації. Результати роботи відображені у 17 наукових працях, з яких 2 статті у фахових наукових журналах, у тому числі одна стаття у науковому виданні, віднесеному до другого квартилю відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, 2 патенти та 13 тез доповідей на конференціях і з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел (197 найменувань), 47 рисунків та 1 таблиці.

Основний текст роботи викладено на 115 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 140 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається із п'яти підрозділів, в яких наведено інформацію щодо методів діагностики та лікування епілепсії, описано структурно-функціональні характеристики ГЕБ, охарактеризована роль тромбіну у ЦНС.

Матеріали та методи досліджень. У даній роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар віком 2 місяці. Перед початком досліджень щурам проводили операції по імплантації електродів до головного мозку. Для знеболення щурів під час проведення процедури імплантації електродів були обрані наступні анестетики: кетамін (80 мг/кг маси щура), ксилазин (8 мг/кг маси щура), як розчинник використовували 0,9% NaCl (Richardson and Flecknell, 2005). Ін'єкції анестетиків здійснювали у черевну порожнину (інтраперітоніально). Після введення анестезійної суміші (приблизно через 2 хв) тварина впадала у медикаментозний сон з втратою больової чутливості. У цьому стані з щуром проводили доопераційні маніпуляції. Після цього (15 хв від часу ін'єкції) перевіряли рефлекс відсмикування. Якщо після введення анестезійної суміші все ще спостерігався рефлекс, то додатково вводили вдвічі меншу дозу і через 10-15 хв знову перевіряли. Хірургічні маніпуляції проводили лише при повній впевненості у відсутності рефлексу. Координати введення електродів для досліджень змін локальних потенціалів були наступними: нюхова цибулина (AP +6,7 мм; ML \pm 1,5 мм; DV -3,0 мм), гіпокамп (AP -3,7 мм; ML \pm 2,5 мм; DV -2,0 мм) та мигдалеподібне тіло (AP -2,6 мм; ML \pm 4,8 мм; DV -8,5 мм). Завершальним етапом була фіксація електроду та фіксуючих болтів спеціальним полімером – протакрилом-М, який наносили безпосередньо на череп до повного застигання.

Для моделювання ЕС використовували літій-пілокарпінову модель скроневої епілепсії (Glien et al., 2001). За 20-22 год до ін'єкцій пілокарпіну щурам вводили внутрішньоочеревинно хлорид літію (127 мг/кг маси щура), розведений у 0,9 %-му розчині хлориду натрію із розрахунку 1 мл/кг маси щура. Ін'єкції пілокарпіну здійснювали з інтервалом 30 хв з початковою дозою 10 мг/кг маси щура та наступними – 10 мг/кг маси щура. Введення пілокарпіну припиняли після розвитку епілептичних нападів 4-5-ї стадії ЕС за шкалою Расіна. Тварин, у яких не спостерігалися напади після введення 60 мг/кг маси щура пілокарпіну, вилучали з подальших експериментальних процедур. Через 90 хв після початку ЕС, епілептичні напади зупиняли двома внутрішньоочеревинними ін'єкціями діазепаму (20 мг/кг маси щура кожна) з інтервалом 5 хв. Всіх тварин утримували поодиноці в режимі 12-годинного циклу день/ніч з вільним доступом до води та їжі.

Запис ЕЕГ проводили системами Neurologger (New Behavior) та NL-1, спеціально розробленими для бездротового запису електричних потенціалів з мозку щурів. Щоб дослідити зміни активності мозку під час ініціації ЕС реєстрацію локальних потенціалів проводили у два етапи. Перший етап – протягом 1 год записували базову активність, далі проводили ін'єкцію специфічного блокатора ПАР1 SCH79797 або 0,9 %-й NaCl, здійснювали запис ще 1 год, потім робили ін'єкцію

хлориду літію, після чого записували ще протягом 4 год. На наступний день (другий етап) - протягом 1 год записували базову активність, далі здійснювали ін'єкцію SCH79797 або 0,9 %-й NaCl, потім робили ін'єкції пілокарпіну, після чого запис проводився до зупинки ЕС. На рис. 1 приведено алгоритм проведення експерименту.

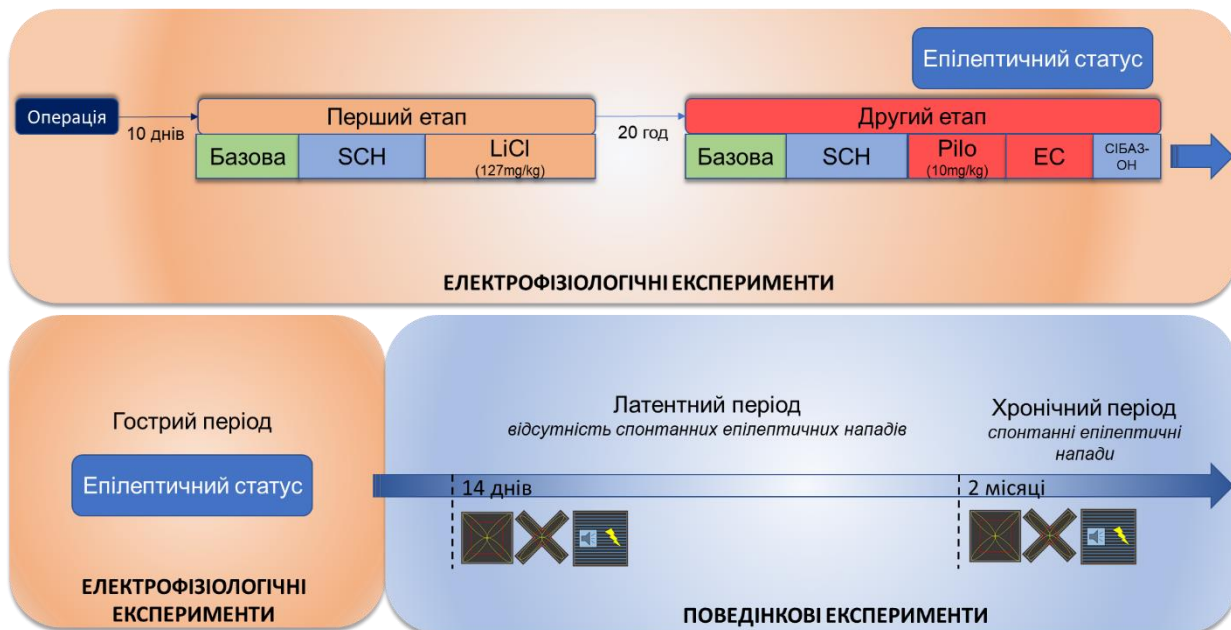


Рис. 1. - Протокол проведення експериментів. Поведінкові експерименти з ліва на право: відкрите поле, хрестоподібний лабіринт, тест на емоційно-зумовлену пам'ять

Для аналізу записи розбивали на однакові за часом відрізки, які відповідали різним фазам становлення ЕС. Для кращого розуміння початку нападу та переходу до стадії ЕС в літій-пілокарпіновій моделі ми проводили спектральний та середньоквадратичний аналіз потужності (RMS - root mean square, Basmajian et al., 1985; Gram et 1998). Аналіз проводили у всьому діапазоні частот (1 – 200 Гц), та за фізіологічними ритмами мозку: дельта-ритм (1 – 5 Гц), тета-ритм (6 – 8 Гц), альфа-ритм (8 – 12 Гц), бета-ритм (12 – 30 Гц) та гамма-ритм (30 – 50 Гц).

На першому етапі зміни потужності локальних потенціалів визначались протягом 1 год та 4 год після ін'єкції LiCl, на другому – протягом латентної фази (проміжок часу між введенням пілокарпіну та появою перших іктальних спалахів), транзитної (проміжок між першим іктальним спалахом та становленням ЕС) та під час ЕС. Для аналізу по частотним діапазонам (ритмам) записи підлягали перетворенню за методом Фур'є. Аналіз результатів проводили із використанням програм Matlab, Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) та Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA). Різниця між групами визначалася за допомогою критерію t Стьюдента, U-критерію Манна-Уїтні та двофакторного аналізу. Результати вважалися значущими при $p < 0,05$.

Для вивчення ефекту пригнічення функцій ПАР1 на поведінкові реакції у латентний період, щурам вводили SCH79797 (селективний антагоніст ПАР1) у дозі 25 мг/кг маси щура під час ініціації ЕС у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Перший раз - за годину до введення хлориду літію, другий – за годину до введення

пілокарпіну. Через 14 діб після ЕС усі тварини проходили поведінкові тести на локомоторну активність, тривожність та емоційно-зумовлену пам'ять. Для вивчення ефекту блокування ПАР1 на поведінкові реакції у хронічний період блокатор вводили у дозі 25 мкг/кг маси щура через 20-30 хвилин після зупинки епілептичного статусу. Введення продовжували кожного дня протягом 10-ти діб. Через 60 діб після епілептичного статусу усі тварини проходили поведінкові тести. Поведінку тварин під час тестів реєстрували на відео. Для визначення відповідності отриманих результатів нормальному розподілу всі набори даних в усіх експериментах аналізувалися тестом Шапіро-Вілка. У випадку, якщо результати були розподілені за Гаусом, для визначення статистичної вірогідності міжгрупових розбіжностей використовувався однофакторний або двофакторний дисперсійний аналіз з post-hoc тестом Тьюкі (One-way/Two-way ANOVA post hoc Tukey test) та непарний t-тест Стьюдента (Unpaired t-test). Деякі з результатів поведінкових тестів не відповідали критерію нормальності розподілу, у такому випадку для їх аналізу використовували метод дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями з подальшим post-hoc аналізом за допомогою тесту Бонферроні. Вірогідними вважались розбіжності при $p < 0,05$. Результати у роботі представлені у вигляді «середнє значення \pm стандартна похибка середнього».

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Розробка бездротової системи для реєстрації електричних потенціалів головного мозку щурів

Нами була розроблена чотирьох-канальна бездротова система для реєстрації електрофізіологічних потенціалів. Вона побудована на базі новітніх електронних компонентів, які дозволяють використовувати технологію цифрової бездротової передачі даних з наднизьким енергоспоживанням. Система має чотири канали з гнучкими коефіцієнтом підсилення та частотою дискретизації. Час автономної роботи в режимі безперервної передачі даних складає приблизно 12 годин.

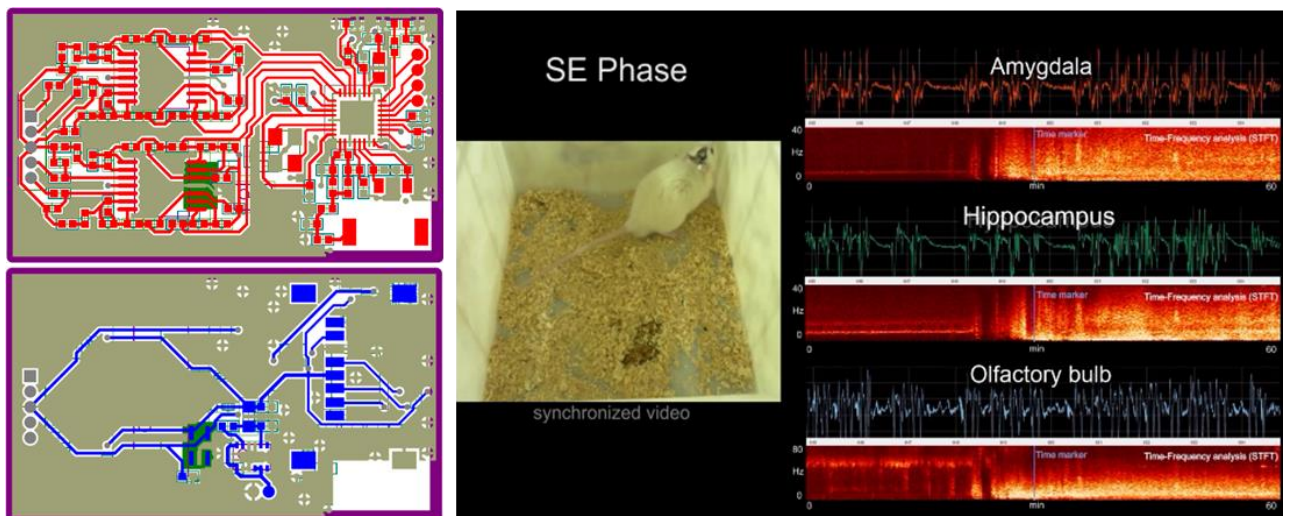
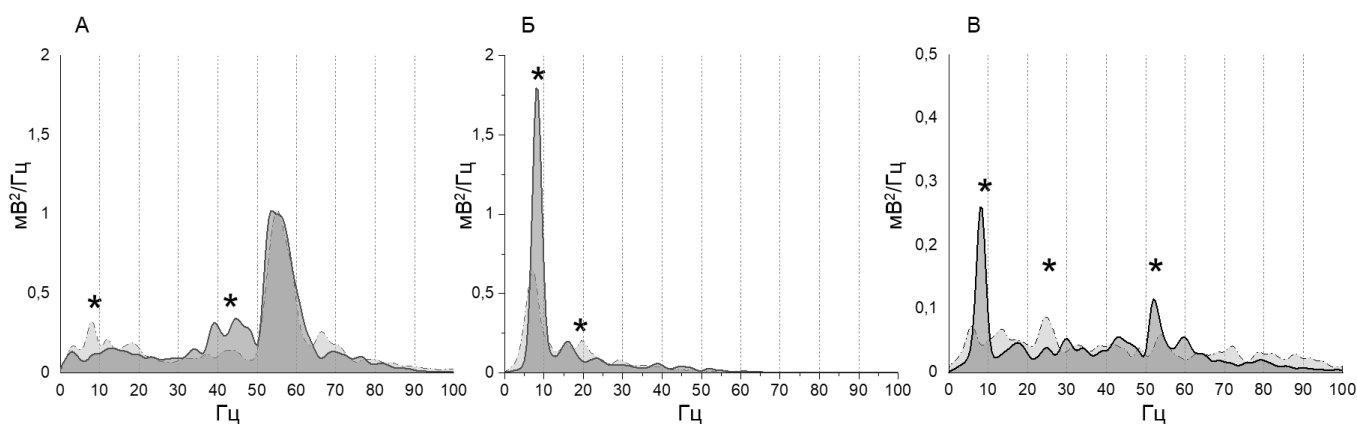


Рис. 2. – Схема друкованої плати прототипу чотирьох-канальної бездротової телеметричної системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів та знімок роботи прототипу під час розвитку епілептичного статусу

Нами був виготовлений прототип системи та проведено тестування на щурах як у спокійному стані, так і під час ініціації епілептичного статусу (рис. 2). Отримані дані ми порівнювали з аналогічними результатами, які були записані на тих же щурах перед тестуванням за допомогою наявних повірених підсилювачів (Neurologger та A-M Systems). Сигнали, отримані за допомогою прототипу безпроводної системи реєстрації, повністю відповідали розрахунковим характеристикам та були використані для подальших дослідів.

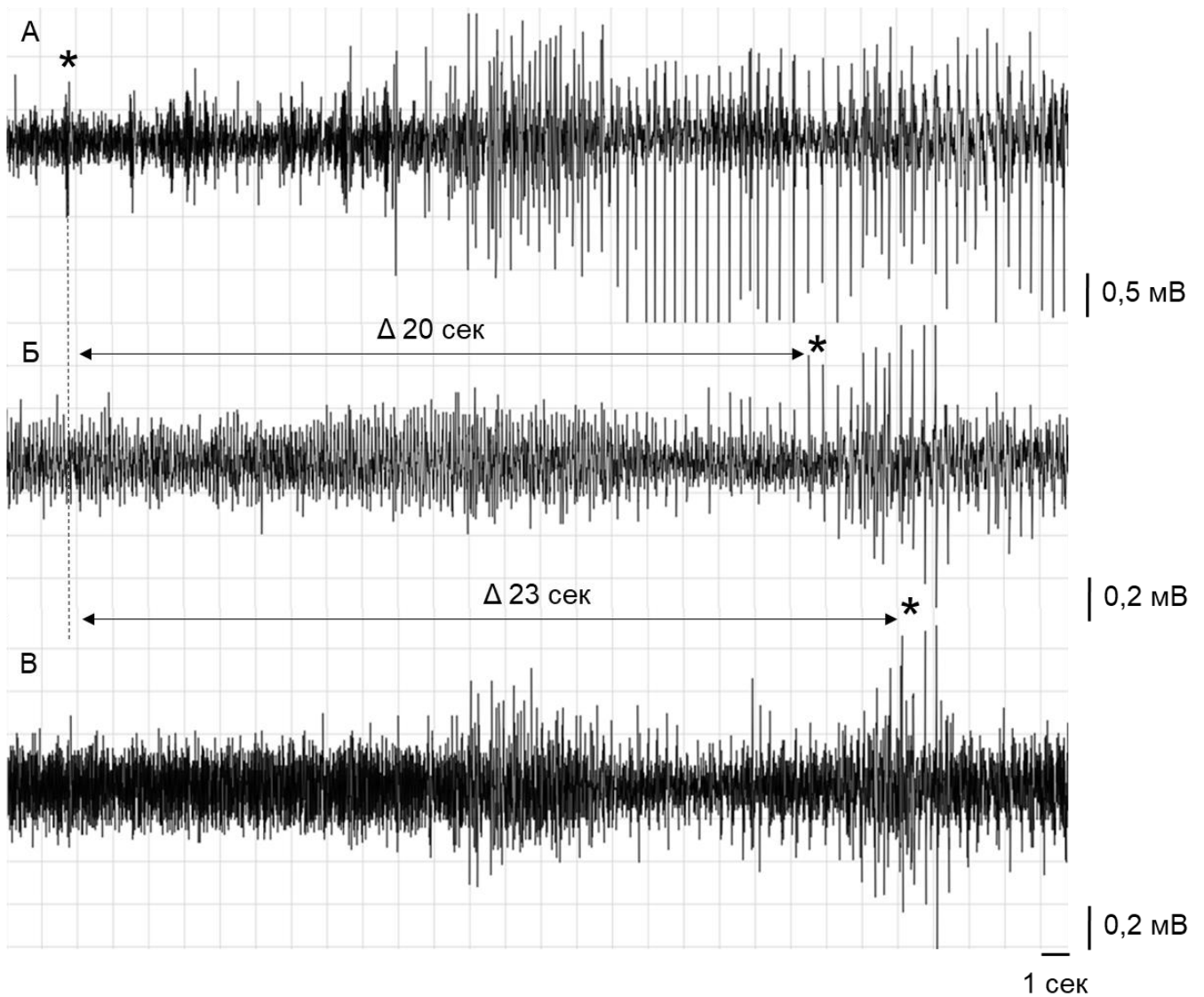
2. Зміни локальних потенціалів гіпокампа, мигдалеподібного тіла та нюхової цибулини під час розвитку ЕС

Було показано, що після ЕС, порушення ГЕБ виникає у різних ділянках мозку, таких як гіпокамп, мигдалеподібне тіло, нюхова цибулина, кора та таламус (van Vliet et al., 2007). Отже, спираючись на існуючі данні, ми вирішили дослідити наявність патологічної активності та її розвиток у різних ділянках мозку, а саме у гіпокампі, мигдалеподібному тілі та нюховій цибулині під час становлення епілептичного статусу. Під час латентної фази потужність тета-ритму зростала у гіпокампі та мигдалеподібному тілі, а у нюховій цибулині, навпаки, зменшувалась. Також відбулися зміни у бета-ритмі гіпокампа та мигдалеподібного тіла, та у гамма-ритмі нюхової цибулини та мигдалеподібного тіла (рис. 3).



*Рис. 3. – Репрезентативні зміни спектральної густини потужності локальних потенціалів (А) нюхової цибулини, (Б) гіпокампа та (В) мигдалеподібного тіла після введення пілокарпіну (суцільна лінія) в порівнянні з базовою активністю (переривчаста лінія). * - позначено зміни потужності ритмів після введення пілокарпіну.*

Латентна фаза закінчувалась з появою перших іктальних спалахів. Ми виявили, що у нюховій цибулині перші іктальні спалахи з'являлися на 25 ± 7 секунд раніше ніж у гіпокампі та мигдалеподібному тілі (рис. 4).



*Рис. 4. – Репрезентативний запис появи перших іктальних спалахів у (А) нюховій цибулині, (Б) гіпокампі та (В) мигдалеподібному тілі. * - перші іктальні спалахи*

Іктальний спалах визначався як збільшення середньої потужності сигналу більш ніж у два рази. Отже, отримані дані свідчать про залучення нюхової цибулини у розвиток ЕС у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.

3. Ефект фармакологічної блокади ПАР1 на розвиток епілептичного статусу при літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.

Для вивчення впливу селективного антагоніста ПАР1 – SCH79797, дослідні тварини з ЕС були поділені на дві групи: Контроль, яким вводили NaCl (n = 7) та SCH, яким вводили блокатор (n = 7). Для оцінки впливу літію, значення потужності сигналу за 30 хв до ін'єкції LiCl встановлювали за базову лінію. Ділянки сигналу, вільні від артефактів, брали для оцінки змін, викликаних LiCl, через 1 год та через 4 год після ін'єкції. Отримані значення нормалізували відносно базового значення, та перевіряли

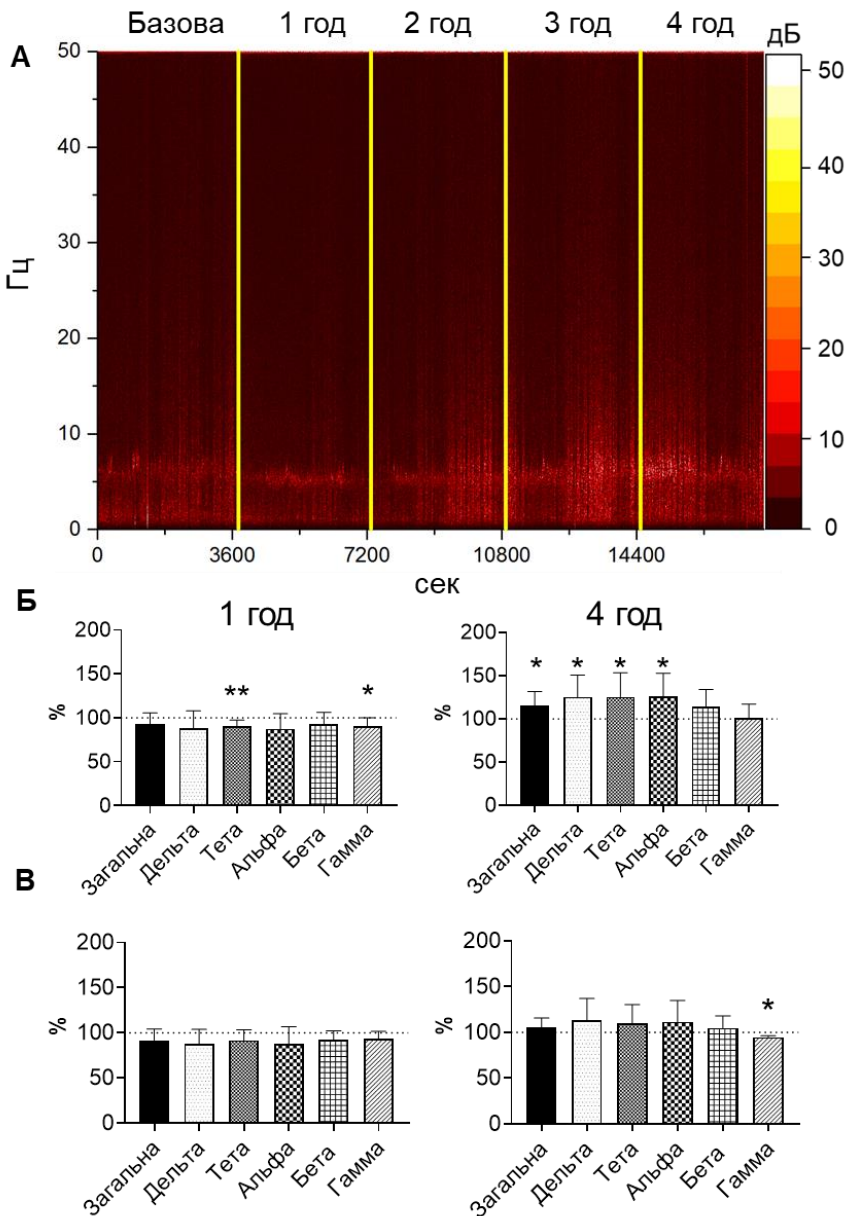


Рис. 5. – Вплив літію на локальні потенціали гіпокампа. (А) Репрезентативне спектральне зображення розподілу потужності сигналу. Нормалізовані значення потужності сигналу (вісь Y) через 1 та 4 год після ін'єкції LiCl у (Б) контрольних тварин та (В) тварин, яким вводили блокатор ПАР1 - SCH79797. За 100% взяте значення потужності сигналу перед веденням LiCl. *, ** $p < 0,05, 0,01$

щодо статистично значущих змін. Було встановлено, що у контрольних тварин через 1 год після введення LiCl спостерігалось статистично значуще зменшення потужності тета- та гамма-ритмів, а на 4 год навпаки, збільшення загальної потужності та дельта-, тета- та альфа ритмів, відносно базового значення (рис. 5Б). У тварин, які отримували SCH, змін не спостерігалось, окрім зниження потужності гамма-ритму на 4 год (рис. 5В). Але незважаючи на різні зміни потужності ритмів у групах відносно базового значення, ми не виявили статистично значущої різниці між групами протягом всього часу експерименту. Хоч зміни потужності ритмів у групі SCH були меншими, цих даних недостатньо, щоб стверджувати про вплив блокування ПАР1 на локальні потенціали після введення хлориду літію.

У контрольних тварин, після введення пілокарпіну, спостерігалось пригнічення потужності майже у всіх частотних діапазонах (латентна фаза, рис. 6А), окрім тета-риму ($p = 0,502$; рис. 5 Контроль). Латентна фаза закінчувалась з появою перших іктальних спалахів активності. Проміжок часу між першими іктальними спалахами та становленням ЕС - транзитна фаза. Під час

транзитної фази (рис. 6А) у контрольних тварин спостерігалось збільшення потужності відносно базового значення майже всіх ритмів, окрім дельта ($p = 0,9$). Однак слід зазначити, що дельта-ритм збільшився, як і всі ритми, відносно значення у латентній фазі (рис. 6Б, Контроль).

У тварин, яким вводили антагоніст ПАР1 - SCH79797, через декілька хвилин після першої ін'єкції пілокарпіну теж спостерігалось пригнічення потужності майже у всіх частотних діапазонах, окрім тета-риму ($p = 0,5$; рис. 6Б SCH). Під час транзитної фази у цих тварин відбулося збільшення потужності ритмів, але ми не виявили статистично значущих змін відносно базового значення (рис. 6Б SCH).

Отже, протягом латентної фази спостерігалось значне зменшення потужності ритмів, окрім тета-ритму, як у контрольних тварин, так і у тварин, яким вводили SCH79797.

Статистичний аналіз не виявив відмінностей між двома групами протягом латентної фази. Однак, у тварини з SCH79797 протягом транзитної фази спостерігалось значно менше збільшення потужності сигналу, ніж у контрольних тварин. Статистично значущу різницю було виявлено між тета- ($p = 0,001$) та гамма- ($p = 0,041$) ритмами. У тварин, яким вводили SCH79797 потужність цих ритмів була значно меншою, ніж у контрольних тварин (рис. 7).

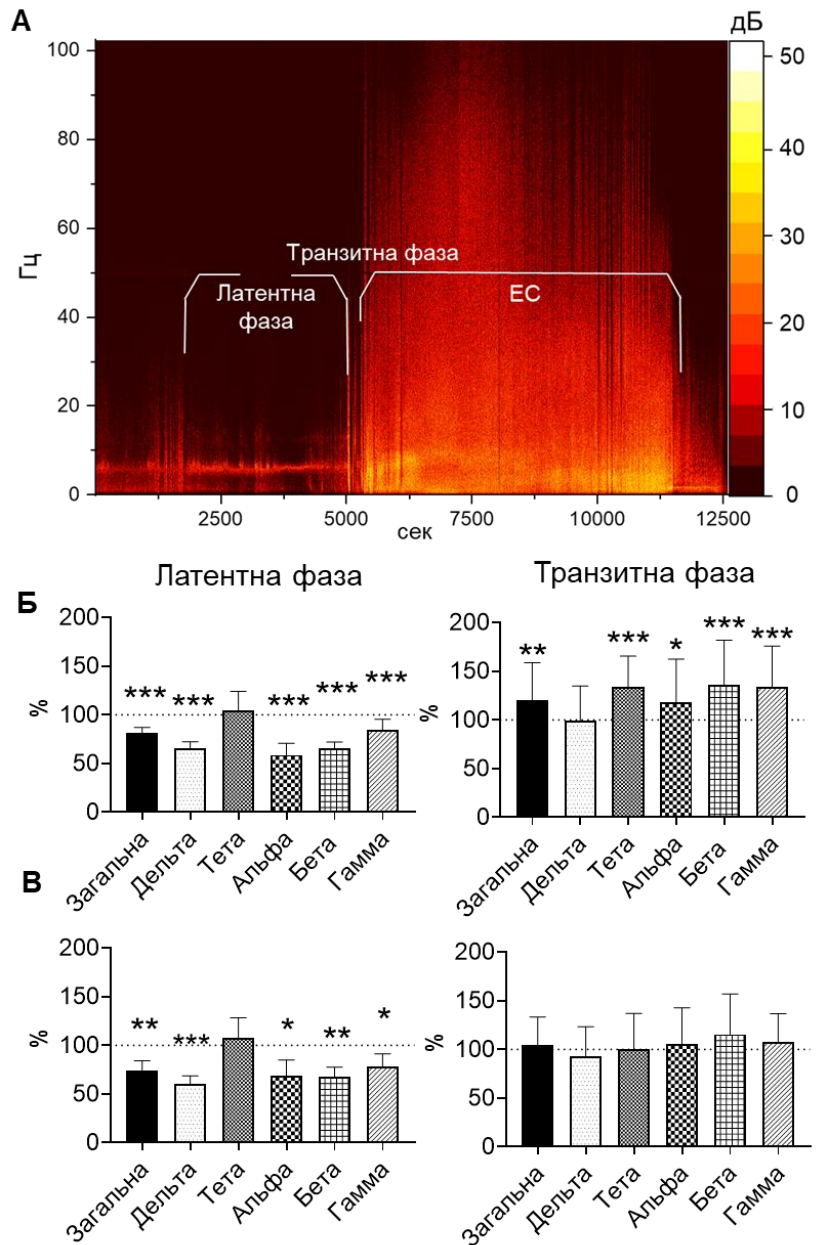


Рис. 6. – Зміни потужності локальних потенціалів гіпокампа під час розвитку ЕС. (А) Репрезентативне спектральне зображення розподілу потужності сигналу під час ініціації у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії у контрольних тварин в гіпокампі. Нормалізовані значення потужності сигналу (вісь Y) під час латентної та транзитної фази у контрольних тварин (Б) та тварин, яким вводили антагоніст ПАР1 – SCH79797 (В). За 100% взяте значення потужності сигналу перед веденням пілокарпіну. *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$

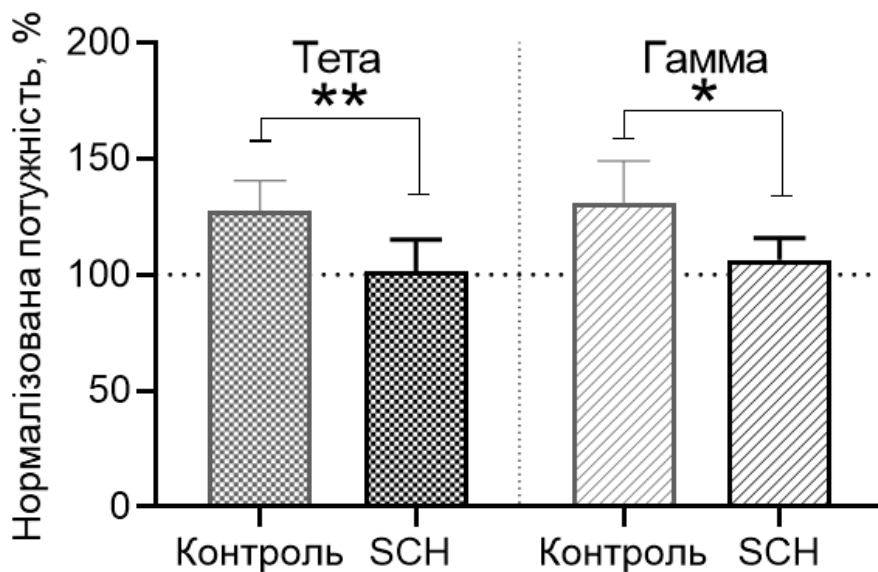


Рис. 7. - Порівняння нормалізованих значень потужності сигналу контрольних тварин та тварин з SCH79797 протягом транзитної фази ініціації ЕС. *, ** $p < 0,05$, $0,01$

Отримані дані можуть свідчити про те, що фармакологічне блокування ПАР1 за допомогою селективного антагоніста - SCH79797, не впливає на зміни локальних потенціалів гіпокампа, які були викликані літєм у щурів. Також не було виявлено відмінностей у зменшенні потужності сигналу, викликаному ін'єкцією пілокарпіну у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Проте було виявлено вплив блокатора на розвиток ЕС, а саме, на потужність тета- та гамма-ритмів під час транзитної фази розвитку ЕС у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Потужність тета- та гамма-ритмів на початку ЕС у тварин, які отримували селективний антагоніст ПАР1, була меншою, ніж у тварин без нього.

4. Вплив фармакологічної блокади ПАР1 на поведінкові реакції дорослих щурів

Перед проведенням поведінкових дослідів для вивчення впливу фармакологічної блокади ПАР1 на поведінкові реакції щурів у латентний та хронічний періоди розвитку епілепсії нами були проведені дослідження впливу блокування ПАР1 на поведінкові реакції контрольних щурів. Для цього здоровим щурам, яким не проводили індукцію ЕС, вводили антагоніст ПАР1 згідно протоколів для дослідження впливу пригнічення функцій ПАР1 у латентний та хронічний періоди епілепсії. Тварини були поділені на дві групи: Контроль - тварини без ЕС, яким вводився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; SCH - тварини без ЕС, але з ін'єкціями антагоністу (SCH79797) у дозі 25 мкг/кг маси щура. У тесті «відкрите поле» блокування ПАР1 не викликало змін у поведінці щурів (рис. 8А, Б). У тесті «хрестоподібний лабіринт» ми також не виявили змін у поведінці щурів з блокатором ПАР1 відносно контрольної групи (рис. 8В, Г). У тесті на дослідження зумовленого страху час завмирання перед (рис. 8Д) та під час (рис. 8Е) звукового сигналу у другий

«тренувальний» день не відрізнявся між групами. Проте, на «тестовий» день у групи з блокатором ПАР1 час завмирання перед сигналом був нижчий, а час завмирання під час сигналу не відрізнявся від групи без блокатора (рис. 8Е). Наведені вище результати отримані для контрольних тварин за протоколом дослідження поведінкових реакцій у хронічний період епілепсії. Але слід зазначити, що різниця спостерігається лише у одному параметрі, чого не достатньо для того, щоб зробити висновок що, пригнічення функцій ПАР1 впливає на рівень емоційно-зумовленої пам'яті у контрольних тварин. До того ж, у контрольних тварин за протоколом дослідження поведінкових реакцій у латентний період розвитку епілепсії ми не виявили різниці між тваринами за усіма тестами. Отже, загалом, можна стверджувати, що пригнічення функцій ПАР1 несуттєво впливає на поведінкові реакції дорослих щурів.

5. Вплив ЕС та фармакологічної блокади ПАР1 на поведінкові реакції щурів у латентний період розвитку епілепсії

Для цього експерименту тварини були поділені на три групи: Контроль (n = 10) – контрольні тварини без ЕС, яким вводився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; ЕС (n = 10) – тварини з епілептичним статусом, яким вводився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; ЕС + SCH (n = 10) - тварини з епілептичним статусом, яким вводили антагоніст ПАР1 – SCH79797. Через 14 діб після ЕС усі тварини проходили поведінкові тести.

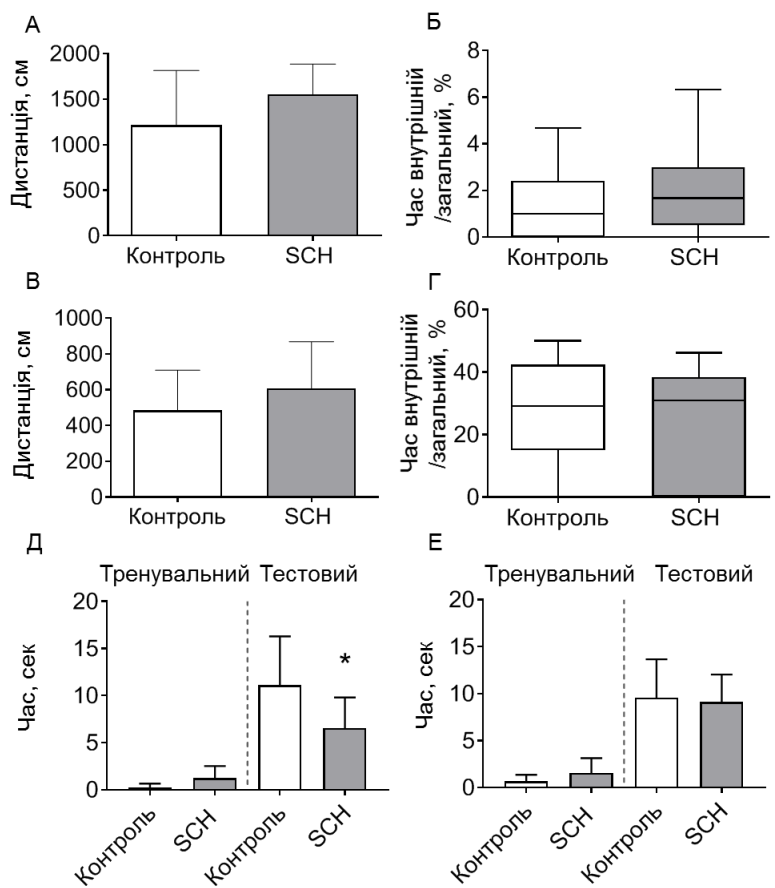


Рис. 8. – Вплив фармакологічної блокади ПАР1 на поведінкові реакції дорослих щурів. Загальна пройдена дистанція (А) та час проведений у внутрішньому периметрі відносно загального часу (Б) у тесті «відкрите поле». Загальна пройдена дистанція (В) та відсоток кількості входів у відкриту рукава (Г) у тесті «хрестоподібний лабіринт» (дані представлені у вигляді медіани з 25 %-м – 75 %-м перцентилем та min – max значеннями). Рівень обумовленого страху перед (Д - contextual conditioning) та під час (Е - conditioning to tone) звукового сигналу у «тренувальний» та «тестовий» дні. * $p < 0,05$

Зміни рівня тривожності та локомоторної активності внаслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у латентний період визначались за допомогою тестів «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт». За параметром загальної пройденої дистанції різниця між групами була виявлена лише у тесті «відкрите поле». Так, тварини груп ЕС та ЕС + SCH пройшли значно більшу дистанцію у цьому тесті, ніж контрольні тварини (рис. 9А). За часом знаходження у внутрішньому периметрі у тесті «відкрите поле» ми виявили різницю лише між групами ЕС та Контроль, показник групи ЕС + SCH не відрізнявся від інших груп (рис. 9Б). У тесті «хрестоподібний лабіринт» ми не виявили статистично значущої різниці між групами.

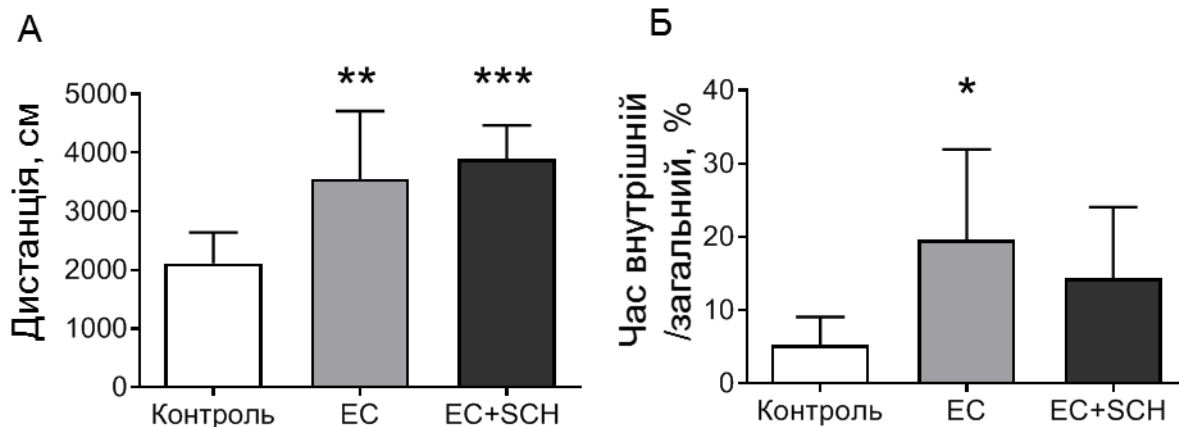


Рис. 9. – Ефект блокування ПАР1 на рівень тривожності та локомоторної активності щурів у тесті «відкрите поле» у латентний період розвитку епілепсії (А – загальна пройдена дистанція, Б - час знаходження у внутрішньому периметрі).
*, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$

Отримані дані свідчать про збільшення локомоторної активності в обох групах щурів з епілептичним статусом, хоча слід зазначити що, підвищення спостерігалось лише у тесті «відкрите поле». Рівень тривожності був меншим лише у тварин групи ЕС, що показано у тесті «відкрите поле». У тесті «хрестоподібний лабіринт» ми не виявили статистично значущих відмінностей між групами за усіма параметрами.

Зміни в процесах формування емоційно-зумовленої пам'яті в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у латентний період визначались як час завмирання протягом тесту. Реакція тварин перед та під час першого звукового сигналу у «тренувальний» день не відрізнялася між групами. Це свідчить про те що, до отримання негативного досвіду у вигляді електричного розряду тварини усіх груп однаково реагували на оточення в якому знаходились (contextual) та на звуковий стимул (tone). Реакція контекстуального страху (contextual conditioning), яка проявляється у вигляді підвищеного часу завмирання перед звуковим сигналом у «тестовий» день в порівнянні з «тренувальним», спостерігалася у груп Контроль та ЕС + SCH (рис. 10А). Також тварини групи Контроль завмирили значно більше в порівнянні з групою ЕС. У тварин групи ЕС спостерігалася тенденція до збільшення часу завмирання перед звуковим сигналом, але ми не виявили статистично значущої різниці. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на оточення, так званого контекстуального страху у групі тварин з епілептичним статусом.

Реакція зумовленого страху (conditioning to tone), яка характеризується підвищенням часу завмирання під час звукового сигналу у «тестовий» день в порівнянні з «тренувальним», також спостерігалася у груп Контроль та ЕС + SCH: (рис. 10Б). Але, як і у випадку до стимулу, реакція страху на звуковий стимул у тварин групи Контроль була вища у порівнянні з такою у групі ЕС (рис. 10Б). Ми також не виявили статистично значущої різниці у групі ЕС за часом завмирання під час стимулу. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на стимул, так званого зумовленого страху, у тварин з епілептичним статусом.

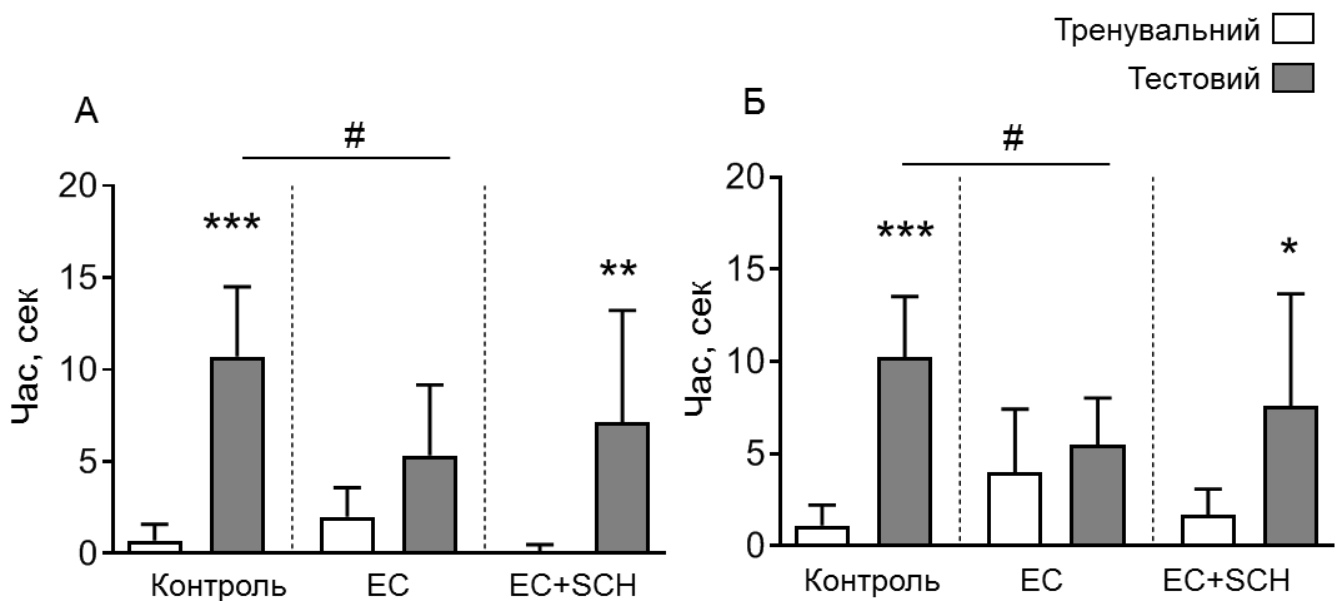


Рис. 10. - Ефект блокування ПАР1 на поведінку тварин під час тестів на пам'ять, зумовлену страхом у латентний період розвитку епілепсії. Час завмирання (А) до звукового стимулу (contextual conditioning), та (Б) протягом звукового стимулу у «тренувальний» день та «тестовий» день. «Тренувальний» та «тестовий» дні - *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$; порівняння у «тестовий» день між групами - # $p < 0,05$

Загалом, отриманні дані свідчать про те що, пригнічення функцій ПАР1 нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у латентний період розвитку епілепсії.

5. Вплив ЕС та фармакологічної блокади ПАР1 на поведінкові реакції щурів у хронічний період розвитку епілепсії

Для цього експерименту тварини були поділені на три групи: Контроль ($n = 20$) – контрольні тварини без епілептичного статусу, яким вводився фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі; ЕС ($n = 12$) – тварини з епілептичним статусом, яким вводили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі; ЕС + SCH ($n = 14$) - тварини з епілептичним статусом, яким вводили антагоніст ПАР1 – SCH79797.

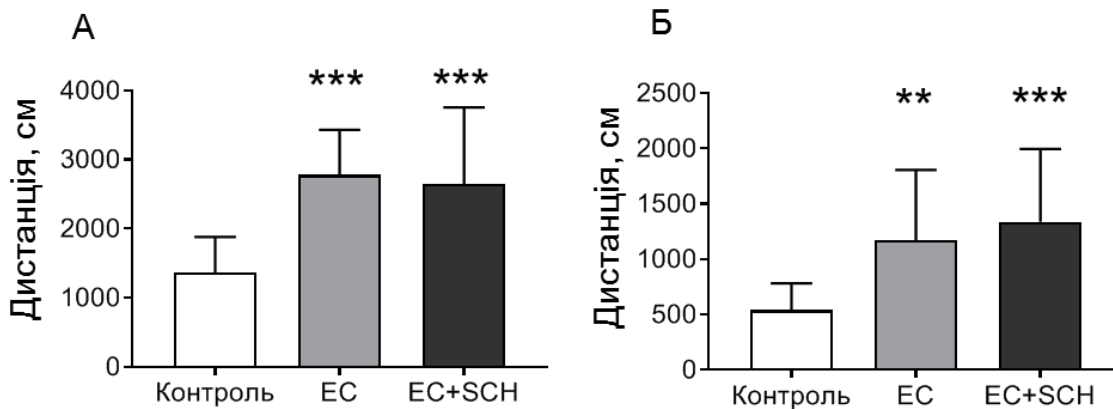


Рис. 11. – Вплив фармакологічної блокади ПАР1 на загальну пройдену дистанцію у тестах (А) «відкрите поле» та (Б) «хрестоподібний лабіринт» у хронічний період розвитку епілепсії. **, *** $p < 0,01, 0,001$

У хронічний період розвитку епілепсії, ми виявили статистично достовірну різницю за показником загальної пройденної дистанції у групах тварин ЕС та ЕС + SCH у порівнянні з контрольними тваринами, як у тесті «відкрите поле» (рис. 11А), так і у тесті «хрестоподібний лабіринт» (рис. 11Б).

Співвідношення часу знаходження у внутрішньому периметрі до загального часу у тесті «відкрите поле» було вищим відносно групи Контроль лише у групі ЕС (Рис. 12А). У тесті «хрестоподібний лабіринт» спостерігалось статистично значуще підвищення кількості входів у відкриті рукави у тварин групи ЕС, як відносно групи Контроль, так і відносно ЕС + SCH (рис. 12Б). Схожий результат був виявлений для часу проведеного у відкритих рукавах, він був вищий у тварин групи ЕС, як відносно групи Контроль, так і відносно ЕС + SCH (рис. 12В).

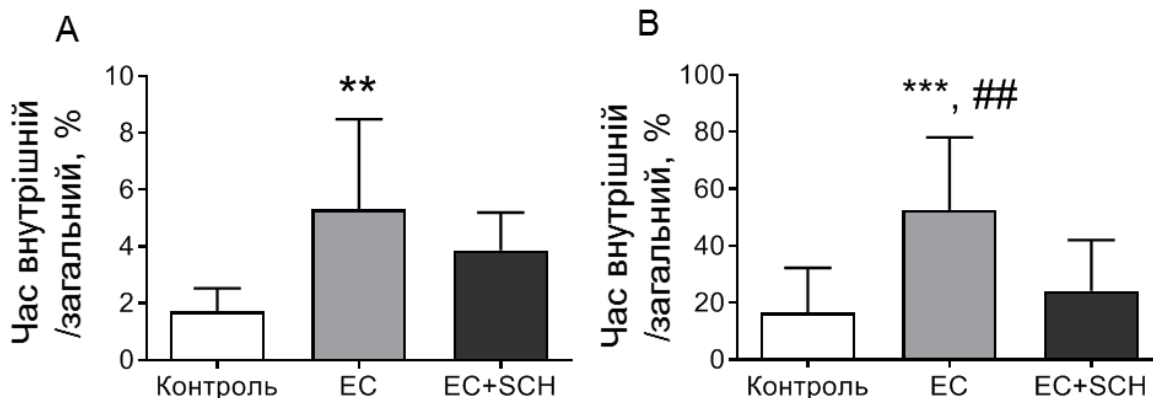


Рис. 12. - Вплив фармакологічної блокади ПАР1 на показники тривожності щурів у хронічний період розвитку епілепсії. Час проведений у внутрішньому периметрі відносно загального часу (А) у тесті «відкрите поле». Час у відкритих рукавах (Б) у тесті «хрестоподібний лабіринт». **, *** $p < 0,01; 0,001$ відносно Контроль; ## $p < 0,01$ відносно ЕС + SCH

Отримані дані вказують на збільшення загальної пройденної дистанції в обох групах щурів з епілептичним статусом. Але за часом проведеним у внутрішньому периметрі «відкритого поля» та у відкритих рукавах «хрестоподібного лабіринту» лише тварини з епілептичним статусом, яким не вводився блокатор, показали

підвищенні значення відносно інших груп. Це свідчить про те, що, пригнічення функцій ПАР1 не впливає на рівень локомоторної активності, але нормалізує рівень тривожності у дорослих щурів у хронічний період розвитку епілепсії.

У тесті на пам'ять, зумовлену страхом, час завмирання тварин не відрізнявся між групами перед та під час першого звукового сигналу у «тренувальний» день. Після отримання електричного розряду під час «тренувального» дня, тварини груп Контроль та ЕС + SCH на наступний «тестовий» день показали статистично значуще збільшення часу завмирання перед (contextual conditioning) звуковим сигналом (рис. 13А). Але, реакція страху на оточення у тварин групи Контроль була вища у порівнянні з такою у тварин інших груп. У тварин групи ЕС спостерігалася тенденція до збільшення часу завмирання перед звуковим сигналом, але ми не вияви статистично значущої різниці. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на оточення, так званого контекстуального страху у тварин з епілептичним статусом.

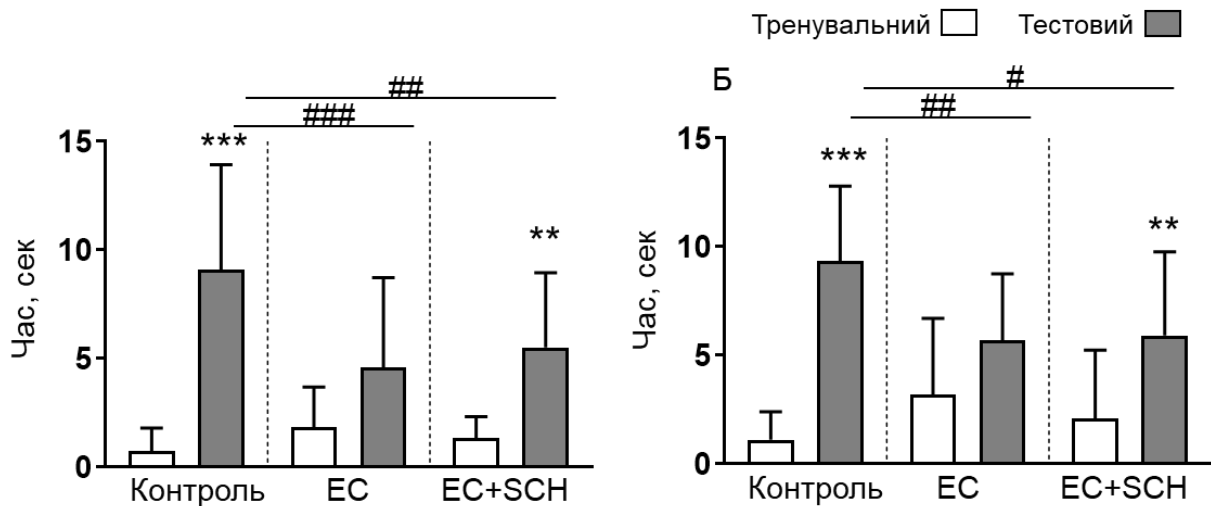


Рис. 13. - Вплив блокатора ПАР1 на поведінку тварин під час тестів на пам'ять, зумовлену страхом у хронічний період розвитку епілепсії. Час завмирання (А) до звукового стимулу (contextual conditioning), та (Б) протягом звукового стимулу на «тренувальний» день та «тестовий» день. «Тренувальний» та «тестовий» дні - **, *** $p < 0,01, 0,001$; порівняння у «тестовий» день між групами - ##, ### $p < 0,01, 0,001$.

Протягом звукового стимулу на другий день (conditioning to tone) реакція тварин груп Контроль та ЕС + SCH була схожа з реакцією до стимулу. Ці групи продемонстрували статистично значуще збільшення часу завмирання в порівнянні з «тренувальним» днем (рис. 13Б). Але, як і до стимулу, реакція страху на звуковий стимул у тварин групи Контроль була вищою ніж у тварин інших груп (рис. 13Б). У тварин групи ЕС спостерігалася тенденція до збільшення часу завмирання перед звуковим сигналом, але ми також не виявили статистично значущої різниці. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на стимул, так званого зумовленого страху у тварин з ЕС. Загалом, отриманні дані свідчать про те що, блокування ПАР1 нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих тварин у хронічний період розвитку епілепсії.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розроблена нами чотирьох-канальна бездротова система дозволяє одночасно реєструвати локальні потенціали різних ділянок мозку з частотою дискретизації до 200 Гц. Оскільки система спроможна передавати дані у режимі реального часу та проводити довготривалий, до 12 годин, запис електричної активності мозку під час ЕС та поведінкових тестів, вона була успішно використана для дослідження змін локальних потенціалів нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалеподібного тіла щурів під час розвитку ЕС.

Підвищення проникності ГЕБ пов'язують з різними неврологічними порушеннями, включаючи скроневу епілепсію. Порушення ГЕБ було виявлено у гіпокампі, корі, таламусі, мигдалеподібного тіла та нюховій цибулині протягом різних періодів епілептогенезу (van Vliet et al., 2007). Ми виявили що перші іктальні спалахи розвиваються у нюховій цибулині раніше ніж у гіпокампі та мигдалеподібному тілі. Також зміни потужності під час транзитної фази розвитку ЕС були значно більшими у нюховій цибулині в порівнянні з іншими ділянками. Отже, отримані дані свідчать про залучення нюхової цибулини у розвиток ЕС у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.

Ми досліджували вплив фармакологічного блокування ПАР1 на зміни локальних потенціалів під час становлення ЕС. Підвищення активності гіпокампа у контрольній групі після введення хлориду літію, узгоджується з дослідженнями впливу різних доз літію на активність гіпокампа, а саме з підвищенням ритмів та загальної потужності потенціалів (Nanak et al., 2017; Jiang et al., 2018). Після введення пілокарпіну, зміни в локальних потенціалах відбувались у три фази (Phelan et al., 2014): латентна фаза, протягом якої пригнічується активність потенціалів; транзитна фаза, яка починається з першим іктальним проявом активності і закінчується становленням ЕС; та фаза ЕС. У тварин з фармакологічною блокадою ПАР1, після ін'єкції хлориду літію, ми не спостерігали значного підвищення активності, а навпроти виявили зменшення гамма-ритму, а після введення пілокарпіну ми виявили зменшення потужності тета- та гамма-ритмів під час транзитної фази. Літій, якщо його вводити за 24 години до пілокарпіну, активізує каскад запалення і підвищує проникність ГЕБ, тим самим знижуючи поріг для настання нападів (Marchi et al., 2007b). Збільшення проникності ГЕБ призводить до підвищення концентрації тромбіну у ЦНС (Suzuki et al., 1992). Тромбін же здатен активувати ПАР1, що може призводити до змін у процесах синаптичної передачі та впливати на електричну активність гіпокампа (Maggio et al., 2013). Тому можна припустити, що зміни активності у групі тварин, яким вводили блокатор ПАР1, викликані зменшенням ролі тромбін/ПАР1-залежних механізмів, які здатні модулювати електричну активність гіпокампа, у розвитку ЕС.

У нашому дослідженні ми показали що, ЕС зменшує рівень тривожності у тестах «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт». Наші дані узгоджуються з кількома дослідженнями з використанням пілокарпінової та каїнатної моделей епілептичного статусу, в яких виявлено меншу тривожність в епілептичних щурів (Inostroza et al. 2011; Dos Santos et al. 2005). Зниження тривожності спостерігалось також у щурів з ураженням вентрального гіпокампа (McHugh et al. 2004), області, яка

зазвичай найбільш ушкоджується при скроневій епілепсії, у порівнянні з дорсальним гіпокампом (Ekstrand et al. 2011).

Ми припускаємо, що ефект пригнічення функцій ПАР1 на тривожність щурів з ЕС, який спостерігається в тестах «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт», можна принаймні частково пояснити нейропротекторним ефектом інгібування ПАР1 у гіпокампі (Isaev et al. 2015). У нашому дослідженні пригнічення функцій ПАР1 призвело до зниження рівня реакції страху на оточення у контрольній групі, але суттєво покращило ці параметри у групі з епілептичним статусом. Також, у групі з ЕС інгібування ПАР1 призвело до покращення реакції зумовленого страху. Таким чином, гальмування ПАР1 після ЕС має терапевтичний ефект. Роль ПАР1 у формуванні гіпокампальних пам'яті та синаптичної пластичності добре встановлена. Було показано, що ПАР1 - / - миші демонструють дефіцит у тесті на пасивне уникання та в контексті кон'юнктурного та умовного страху (Almonte et al. 2013). Ми вважаємо що ПАР1 залучений до процесів які впливають на зміни рівня тривоги та страху спричинені ЕС.

Підсумовуючи наші дослідження, нами було продемонстровано залученість нюхової цибулини у розвиток ЕС, вплив ПАР1 на локальні потенціали гіпокампа в цей період та залучення ПАР1 у регуляцію тривожної поведінки епілептичних щурів, а також, доповнено інформацію щодо ключової ролі ПАР1-залежної сигналізації у формуванні пам'яті, зумовленої страхом, у дорослих щурів. Отже, отриманні результати свідчать про те, що системне інгібування ПАР1 впливає на формування ЕС та має протиепілептогенний ефект. Це вказує на те, що ПАР1 може бути перспективною мішенню для протиепілептогенної терапії.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети й завдань було досліджено зміни локальних потенціалів різних ділянок мозку при становленні ЕС, а також показана роль ПАР1 у змінах локальних потенціалів гіпокампа при цих умовах. Розглянуто вплив фармакологічної блокади ПАР1 на такі поведінкові реакції дорослих щурів як тривожність та емоційно-зумовлена пам'ять у латентному та хронічному періодах епілептогенезу. Отримані дані свідчать про внесок ПАР1 у розвиток епілептичного статусу при літій – пілокарпіновій моделі епілепсії та їх роль у поведінкових розладах, пов'язаних з епілепсією у дорослих щурів.

1. Розроблена багатоканальна бездротова система реєстрації електрофізіологічних потенціалів, яка дозволяє одночасно реєструвати локальні потенціали різних ділянок мозку під час епілептичного статусу та проведення поведінкових тестів.
2. Розвиток епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії у дорослих щурів супроводжується ранньою появою інтеріктальних спалахів та збільшенням потужності локальних потенціалів у нюховій цибулині в порівнянні з гіпокампом та мигдалеподібним тілом.

3. Фармакологічне блокування протеазаактивованих рецепторів у дорослих щурів призводить до зменшення потужності тета- та гамма-ритмів гіпокампа під час становлення епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.
4. У дорослих щурів без епілептичного статусу пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу не призводить до змін локомоторної активності, тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті.
5. Фармакологічне блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу призводить до нормалізації рівня тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні результати роботи:

1. **Bogovyk R.**, Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Holmes G.L., Isaeva E. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy & Behavior* – 67:66-69; [PMID: 28088683](#). *(Особистий внесок здобувача: проведення поведінкових досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).*
2. М.О. Semenikhina, **R.I. Bogovyk**, М.Р. Fedoriuk, О.В. Stasyshyn, А.В. Savotchenko, Е.В. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, *Fiziol. Zh.* 2018; 64(6): 17-22. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz64.06.017>. *(Особистий внесок здобувача: Автором виконана розробка та адаптація поведінкової установки, розробка протоколу виконання тестів, впровадження системи автообробки експериментальних відеофайлів та статистичне опрацювання результатів дослідження).*

Патенти:

1. **Боговик Р.І.**, Федорюк М.П., Перебейніс В.В., Натаров Р.М., Чернінський А.О., Максимюк О.П., Ісаєв Д.С. «Бездротовий пристрій з bluetooth передавачем для реєстрації електричних потенціалів головного мозку у щурів». Патент на корисну модель: 142040 12.05.2020. *(Особистий внесок здобувача: Розробка концепту пристрою, участь у проектуванні схеми та розробці алгоритмів роботи системи, проведення збірки пристрою та тестування).*
2. Федорюк М.П., **Боговик Р.І.**, Перебейніс В.В., Натаров Р.М., Пристрій для реєстрації електрокортикограми головного мозку у щурів: пат. 140101, Україна. № 201906705; заявл. 14.06.2019; опубл. 10.02.2020. *(Особистий внесок здобувача: Розробка друкованої плати пристрою, участь у проектуванні схеми та розробці алгоритмів роботи системи, проведення збірки пристрою та тестування).*

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. Natarov, R., Dyka, Z., **Bogovyk, R.**, Fedoriuk, M., Isaev, D., Sudakov, O., Maksymyuk, O., Krishtal, O. and Langendörfer, P., 2020, June. Artefacts in EEG Signals Epileptic Seizure Prediction using Edge Devices. In 2020 9th Mediterranean Conference on Embedded Computing (MECO) (pp. 1-3). IEEE. DOI: [10.1109/MECO49872.2020.9134076](https://doi.org/10.1109/MECO49872.2020.9134076).
2. **Bogovyk R.**, Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 after status epilepticus modulates emotionally driven behavioral responses of epileptic rat. VII International Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, Ukraine, June 7 – 11, 2017.
3. Savotchenko A., **Bogovyk R.**, Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Isaeva E. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. Barcelona Young Neuroscientists Symposium, Barcelona, Spain, June 15-16, 2017.
4. E. Isaeva, M. Semenikhina, **R. Bogovyk**, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, Lina T. AlKury, A. Savotchenko, O. Krishtal. Protease-activated receptor 1 inhibition rescues impaired synaptic plasticity and anxiety-related behavior but does not affect spatial learning deficit in juvenile rat after status epilepticus. SfN meeting, Chicago, USA, 2019.
5. M. Semenikhina, **R. Bogovyk**, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 restores hippocampal synaptic plasticity and converts behaviour deficits in a model of temporal lobe epilepsy, 35th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine Rare diseases: From mechanisms to therapy and beyond, Cologne, Germany, 2019.
6. M. Semenikhina, **R. Bogovyk**, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of PAR1 restores hippocampal synaptic plasticity and affects emotionally-modulated behavior in rat at lithium-pilocarpine model of status epilepticus, 20-й з'їзд Українського фізіологічного товариства, Київ, Україна, 2019.
7. Semenikhina M., **Bogovyk R.**, Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Isaeva E. Inhibition of par1 affects on emotionally-modulated behaviour and synaptic plasticity in rat at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, Україна, 2018.
8. Semenikhina M., **Bogovyk R.**, Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus, Oxford autumn school in neuroscience, Oxford, UK, 2018.
9. **Р.І. Боговик**, М.П. Федорюк Зміни ритмів гіпокампу, амігдали та нюхової цибулини під час розвитку епілептичного статусу у щурів при літій –

- пілокараїновій моделі епілепсії. XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2020», Житомир, Україна, 2020.
10. M.O. Semenikhina, **R.I. Bogovyk**, M.P. Fedoriuk, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, International scientific and practical forum "Ukraine of the future", Berdyans'k, Ukraine, 2018.
 11. Semenikhina M., **Bogovyk R.**, Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 affect on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus, Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology, Kyiv, Ukraine, 2018.
 12. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, **Ruslan Bogovyk**, Mykhailo Fedoriuk, Elena Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 affects on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus Scientific activity for forming Professional competence of future profession, Sumy – 2017, Sumy, Ukraine, 2017.
 13. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, **Ruslan Bogovyk**, Mykhailo Fedoriuk and Elena Isaeva Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on the synaptic plasticity following status epilepticus in young adult rat, VII International Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, Ukraine, 2017.

АНОТАЦІЯ

Боговик Р.І. Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у розвитку епілептичного статусу та його наслідків у щурів – 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.

В дисертаційній роботі викладені результати досліджень з визначення впливу протеазаактивованих рецепторів типу 1 (ПАР1) на зміни локальних потенціалів у гіпокампі під час розвитку епілептичного статусу та на поведінкові реакції під час латентного і хронічного періоду розвитку епілепсії у дорослих щурів. Розроблена чотирьох-канальна бездротова система для реєстрації електрофізіологічних потенціалів мозку щурів, яка дозволяє проводити запис під час епілептичних нападів та виконання поведінкових тестів. За допомогою цієї системи, визначено, що інтеріктальні спалахи нейрональної активності, які співвідносять з початком нападу, з'являлись раніше у нюховій цибулині, ніж у гіпокампі та мигдалевидному тілі. Зміни потужності локальних потенціалів нюхової цибулини виявились значно більші, ніж у гіпокампі та мигдалеподібному тілі. Блокування ПАР1 рецепторів призводило до зменшення потужності тета- та гамма-ритму під час транзитної фази становлення епілептичного статусу, але не впливало на зміни потужності ритмів під час латентної фази, що свідчить про зменшення гіперсинхронізованості нейронних мереж перед становленням ЕС. Блокування ПАР1 перед становленням епілептичного статусу,

нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у латентний період розвитку епілепсії, та покращує ці показники у хронічний період. Таким чином, в роботі продемонстровано не тільки залученість нюхової цибулини у розвитку ЕС, а і вплив ПАР1 на локальні потенціали гіпокампа під час розвитку епілептичного статусу та залучення цих рецепторів у регуляцію тривожної поведінки епілептичних щурів. Доповнено інформацію щодо ключової ролі ПАР1-залежної сигналізації у формуванні пам'яті у дорослих щурів, зумовленої страхом.

Ключові слова: епілептичний статус, літій-пілокарпінова модель, протеазаактивований рецептор 1, локальні потенціали, поведінкові реакції.

АННОТАЦІЯ

Боговик Р.И. Роль протеазаактивированных рецепторов первого типа в развитии эпилептического статуса и его последствий у крыс - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 - биофизика. - Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2020.

В диссертационной работе изложены результаты исследований по определению влияния протеазаактивированных рецепторов типа 1 (ПАР1) на изменения локальных потенциалов в гиппокампе при развитии эпилептического статуса и на поведенческие реакции во время латентного и хронического периода развития эпилепсии у взрослых крыс. Разработана четырехканальная беспроводная система для регистрации электрофизиологических потенциалов мозга крыс, которая позволяет производить запись во время эпилептических припадков и выполнения поведенческих тестов. С помощью этой системы определено, что интериктальные всплески нейрональной активности, которые соотносят с началом приступа, появлялись раньше в обонятельной луковице, чем в гиппокампе и миндалевидном теле. Изменения мощности локальных потенциалов обонятельной луковицы выявились значительно больше, чем в гиппокампе и миндалевидном теле. Блокирование ПАР1 рецепторов приводило к уменьшению мощности тета- и гамма-ритма во время транзитной фазы становления эпилептического статуса, но не влияло на изменения мощности ритмов во время латентной фазы, что свидетельствует об уменьшении гиперсинхронизованности нейронных сетей перед становлением ЕС. Блокирование ПАР1 перед становлением эпилептического статуса, нормализует уровень тревожности и эмоционально-обусловленной памяти в латентный период развития эпилепсии, и улучшает эти показатели в хронический период. Таким образом в работе продемонстрировано не только вовлеченность обонятельной луковицы в развитии ЕС, а и влияние ПАР1 на локальные потенциалы гиппокампа во время развития эпилептического статуса и привлечения этих рецепторов в регуляции тревожного поведения эпилептических крыс. Дополнен информация о ключевой роли ПАР1-зависимой сигнализации в формировании памяти у взрослых крыс, обусловленной страхом.

Ключевые слова: эпилептический статус, литий-пилокарпиновая модель, протеазаактивированный рецептор 1, локальные потенциалы, поведенческие реакции.

SUMMARY

Bohovyk R. The role of protease-activated receptors of type 1 in the development of status epilepticus and its consequences in rats - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

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

The dissertation is devoted to the determination of the influence of protease - activated receptors of type 1 (PAR1) on the changes of local potentials in the hippocampus during the development of status epilepticus and on behavioral reactions during the latent and chronic period of epilepsy development in adult rats. The study shows changes in local potentials in the olfactory bulb during the development of status epilepticus (SE), together with the simultaneous registration of local potentials of the hippocampus and amygdala. To conduct these experiments, a four-channel wireless system was developed allowing to record the electrophysiological potentials of the rat brain during epileptic seizures and behavioral tests. Using this system, we have found that the interictal spikes of neuronal activity, which correspond to the onset of the seizure, appeared earlier in the olfactory bulb. We found that in the olfactory bulb the first ictal flares appeared 25 ± 7 seconds earlier than in the hippocampus and amygdala. The changes in the power of local potentials of the olfactory bulb were much greater than in the hippocampus and amygdala. There were changes in the beta rhythm of the hippocampus and the amygdala, and in the gamma rhythm of the olfactory bulb and the amygdala. These data indicate at a possible role of olfactory bulb in the development of status epilepticus. The changes in the local potentials in the rat hippocampus during the development of status epilepticus in the lithium-pilocarpine model of epilepsy in conditions of inhibit function of PAR1 were also studied. Blocking of PAR1 reduced the power of theta and gamma rhythms during the transit phase of status epilepticus, but did not affect the changes in rhythm power during the latent phase, indicating a decrease in the hypersynchronization of neural networks before SE formation. The effect of PAR1 blockade on the behavioral responses of rats with status epilepticus was also determined. Locomotor activity of animals, the levels of anxiety and emotional memory were studied. Thus, it was determined that the blocking PAR1 before the formation of status epilepticus, normalized the level of anxiety and emotional memory in the latent period, and blocking after SE led to the improvement in these indicators in the chronic period of epilepsy. Thus, the study demonstrates not only the involvement of the olfactory bulb in the development of EC, but also the effect of PAR1 inhibition on the local potentials of the hippocampus during the development of status epilepticus and the involvement of these receptors in regulating the anxiety behavior of epileptic rats. The key role of PAR1-dependent signaling in the formation of fear-induced memory in adult rats has been demonstrated.

Key words: status epilepticus; lithium-pilocarpine model; protease-activated receptor 1; local potentials; behavioral reactions.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ЕС – епілептичний статус

ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр

ПАР1 – протеазаактивовані рецептор першого типу

SCH79797 – селективний блокатор протеазаактивованих рецепторів

LiCl – хлорид літію

RMS - середнє квадратичне значення