

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

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

**Запухляк Ольга Сергіївна**

УДК 59.085:611.813.14:612.825.3

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

### **Епілептиформна активність гіпокампа щурів за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі**

Спеціальність 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Біологічні науки

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

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

Київ – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Запухляк О.С.* Епілептиформна активність гіпокампа щурів за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – «Фізіологія людини та тварин». – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2021.

В дисертаційній роботі досліджено характеристики епілептиформної активності гіпокампа в свіжоізольованих зрізах мозку щурів в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі. Гіпокамп має високу схильність до реверберації збудження та генерації синхронізованої активності нейронів. Навіть під час блокади синаптичної передачі гіпокампальні нейронні мережі здатні генерувати та підтримувати судомоподібну активність. Метою даної роботи було визначити характеристики та механізми виникнення спонтанної епілептиформної активності в свіжоізольованих зрізах гіпокампа щурів в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі. Було застосовано наступні методи: отримання свіжоізольованих зрізів мозку щурів, індукція епілептиформної активності шляхом суперфузії зрізів мозку модифікованими розчином штучної спинномозкової рідини, реєстрація позаклітинних польових електричних потенціалів в свіжоізольованих зрізах гіпокампа щурів. В даній роботі повна блокада синаптичної передачі досягалась шляхом суперфузії зрізів мозку розчином із низьким вмістом кальцію та кадмійвмісним розчином. Оскільки вивільнення нейротрансмітера з пресинаптичної терміналі є кальційзалежним процесом, то зниження концентрації позаклітинного кальцію ( $\leq 0.4$  мМ) або блокада кальцієвих каналів кадмієм є умовами, що блокують активну синаптичну передачу. В даній роботі кадмійвмісний розчин було обрано з метою дослідити епілептиформну активність гіпокампа за відсутності синаптичної передачі, але в умовах наявності кальцію (1 мМ) у позаклітинному середовищі. Умови часткової блокади синаптичної передачі досягались шляхом суперфузії зрізів гіпокампа

розчином, який містив суміш антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів. Порівняно з низькокальцієвим та кадмійвмісним середовищем, розчин з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами не створює умов блокади вивільнення нейротрансмітерів; цей розчин було обрано з метою з'ясування додаткових механізмів синхронізації гіпокампальної активності, що не залежать від глутаматергічної та ГАМКергічної передачі. В роботі було порівняно характеристики епілептиформної активності гіпокампа зон СА3 та СА1 в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі; показано, що під час суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим або кадмійвмісним розчинами, характерним патерном епілептиформної активності є популяційні спайки; під час суперфузії зрізів розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами виявлено відмінний патерн епілептиформної активності – польові розряди. Польові розряди – повільні та ритмічні зсуви позаклітинного потенціалу, було зареєстровано лише під час суперфузії зрізів розчином з АМПА, НМДА- та ГАМК-антагоністами, натомість популяційні спайки було зареєстровано як при повній та і при частковій блокаді синаптичної передачі.

В дисертаційній роботі було порівняно рівень синхронізації польових потенціалів в зонах гіпокампа СА3 та СА1 під час епілептиформної активності в несинаптичних умовах. Для оцінки рівня синхронізації польових потенціалів було застосовано метод крос-кореляційного аналізу. Отримані результати показали, що під час часткової блокади синаптичної передачі рівень СА3–СА1-синхронізації був вищим ніж в умовах повної блокади. Це вказує на можливість існування додаткового механізму синхронізації активності нейронів СА3–СА1 в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Аплікація кадмію хлориду пригнічувала генерацію та СА3–СА1-синхронізацію польових потенціалів в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами, що вказує на залежність цього процесу від активації кальцієвих каналів та синаптичну природу польових розрядів. Спостереження синхронізації активності між зонами СА3 та СА1 гіпокампа в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів має

фундаментальний інтерес, враховуючи що переважна більшість синаптичних зв'язків між CA3 та CA1 є глутамат- або ГАМКергічними.

В дисертаційній роботі також показана роль зони CA3 гіпокампа в генерації епілептиформної активності в несинаптичних умовах. Встановлено, що після розрізу між зонами CA3 та CA1, польові розряди зникають в CA1, але не в CA3. Результати демонструють, що ділянка CA3 здатна до генерації та передачі синхронної активності в CA1 незалежно від глутамергічної та ГАМКергічної передачі.

В роботі також досліджено вплив холінергічних антагоністів на синхронізацію епілептиформної активності, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Аплікація мускаринового антагоністу атропіну не мала істотного впливу на CA3–CA1-синхронізацію епілептиформної активності в розчині зі вказаними антагоністами, натомість, аплікація неселективних нікотинових антагоністів мекаміламіну та тубокурарину призводила до пригнічення генерації та CA3–CA1-синхронізації епілептиформної активності. Отримані результати вказують, що активація нікотинових ацетилхолінових рецепторів сприяє синхронізації активності нейронів ділянок гіпокампа CA3 та CA1 незалежно від основних синаптичних систем: глутаматних рецепторів АМПА і НМДА та ГАМК рецепторів.

В гіпокампі основними підтипами нікотинових холінорецепторів є  $\alpha 7$ -,  $\alpha 4\beta 2$ - та  $\alpha 3\beta 4$ -підтипи. В даній роботі було досліджено вплив відповідних антагоністів: метиллікаконітин (MLA), дигідро- $\beta$ -еритроїдином (Dh $\beta$ E) та мекаміламін на CA3–CA1-синхронізацію епілептиформної активності, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Виявлено, що антагоністи  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів – MLA та Dh $\beta$ E не впливають на генерацію та CA3–CA1-синхронізацію епілептиформної активності, а мекаміламін – пригнічує її. Неефективність антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів в

припиненні CA3–CA1-синхронізації активності нейронів вказує на можливу роль  $\alpha 3\beta 2$ -підтипу нікотинових рецепторів в цьому процесі.

В дисертаційній роботі також було досліджено вплив холінергічних антагоністів (мекаміламін, MLA, Dh $\beta$ E) на епілептиформну активність в гіпокампі, індуковану антагоністом ГАМК-рецепторів бікукуліном, блокатором калієвих каналів 4-амінопіридином та низькомагнієвим розчином. Результати даних експериментів показали, що мекаміламін пригнічує епілептиформну активність індуковану бікукуліном, але не має істотного впливу на активність в розчині з 4-амінопіридином та низьким вмістом магнію. Це вказує на роль н-холінорецепторів в розвитку гіперсинхронізації активності гіпокампа під час блокади гальмівної синаптичної передачі.

Одержані в дисертаційній роботі результати мають практичне значення для розробки нових засобів контролю та запобігання судомної активності в гіпокампі. Показано, що антагоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів мекаміламін припиняє синхронізацію епілептиформної активності в межах CA3 та CA1 в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа. Мекаміламін є зареєстрованим фармакологічним засобом та останні декілька років вивчається вплив мекаміламіну в лікуванні різних форм зловживання речовинами (алкоголь, кокаїн, нікотин), а також в нейропатологічних та психіатричних станах, серед яких депресія, тривожність, біполярні розлади та епілепсія. Отримані в дисертаційній роботі результати щодо здатності мекаміламіну зменшувати синхронізацію активності між зонами CA3 та CA1 гіпокампа можуть частково пояснити механізми терапевтичної дії мекаміламіну в ЦНС, а також вказують на можливу роль нікотинових холінорецепторів в якості фармакологічної мішені для протиепілептичних засобів. Одержані результати мають практичне значення для розробки нових засобів контролю судомної активності гіпокампа та дозволяють поглибити сучасне розуміння механізмів синхронізованої активності ЦНС.

**Ключові слова:** епілептиформна активність, нікотинові ацетилхолінові рецептори, гіпокамп, АМПА, НМДА, ГАМК, мекаміламін.

## SUMMARY

*Zapukhliak O. S.* Epileptiform activity in the rat hippocampus under conditions of complete and partial blockade of synaptic transmission. – Manuscript.

The dissertation on a scientific degree of the candidate of biological sciences for specialty 03.00.13 – "Physiology of human and animals". – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation work is devoted to the investigation of the epileptiform activity in the hippocampal rat brain slices under conditions of complete and partial blockade of synaptic transmission. Due to its unique anatomical structure, the hippocampus has a high propensity to reverberate excitation and generate seizure activity. Even during the blockade of synaptic transmission, the hippocampal network is able to generate and maintain synchronized bursting. Understanding the mechanisms of nonsynaptic epileptiform activity in hippocampus is crucial for effective treatment of epileptic hypersynchronization. The aim of this study was to investigate the characteristics of spontaneous epileptiform activity in CA3–CA1 hippocampus during the complete and partial blockade of synaptic transmission and to determine conditions necessary for its induction. Next experimental methods were used: preparation of acute rat brain slices; induction of the epileptiform activity by perfusion of brain slices with a modified artificial cerebrospinal fluid (aCSF): recording of extracellular electrical potentials in the hippocampal slices. Complete blockade of synaptic transmission was achieved by perfusion of brain slices with low-Ca<sup>2+</sup> or cadmium-containing aCSF. Because neurotransmitter release from presynaptic terminal is a calcium-dependent process, a decrease in the extracellular calcium concentration ( $\leq 0.4$  mmol) or blockade of calcium channels by cadmium are sufficient conditions to block active synaptic transmission. In present work, a cadmium-containing aCSF was chosen to investigate nonsynaptic

epileptiform activity in the presence of calcium in extracellular milieu. Partial blockade of synaptic transmission was achieved by perfusion of hippocampal slices with aCSF containing antagonists of AMPA-, NMDA- and GABA-receptors. Compared with low-calcium and cadmium-containing aCSF, this synaptic-blockers-containing aCSF does not prevent the release of neurotransmitters, which is why this solution was chosen to study hippocampal hypersynchronization that does not depend on glutamatergic and GABA-ergic transmission. Hippocampal epileptiform activity under conditions of complete and partial blockade of synaptic transmission has distinct patterns. Under low-calcium or cadmium-containing conditions epileptiform activity manifests as fast population spikes, while in presence of AMPA-, NMDA- and GABA-antagonists – it is field discharges. Field discharges – are slow and rhythmic shifts of extracellular potential, which were recorded only during partial blockade with AMPA-, NMDA- and GABA-antagonists, while population spikes were recorded under both complete and partial blockade of synaptic transmission.

Level of synchronization of epileptiform activity between CA3 and CA1 zones under nonsynaptic conditions was also compared. Cross-correlation analysis was used to assess the level of field potential synchronization. Obtained results show that during partial blockade of synaptic transmission level of CA3–CA1-synchronization was higher than under conditions of complete blockade. This suggests an additional mechanism of neuronal synchronization in the synaptic-antagonists-aCSF. Application of cadmium blocked CA3–CA1-synchronization of field discharges, indicating on its dependence on the activation of calcium channels and thus the synaptic origin of field discharges. The dissertation also concerns the role of the CA3 zone of the hippocampus in the generation of epileptiform activity under nonsynaptic conditions. After mechanical cut was made between CA3 and CA1, field discharges disappeared in CA1, but not in CA3. Results show that the CA3 region is capable of generating and transmitting synchronous activity in CA1 independently of glutamatergic and GABAergic transmission.

The effect of cholinergic antagonists on the CA3–CA1-synchronization of epileptiform activity in aCSF with AMPA-, NMDA- and GABA-receptor antagonists was also investigated. Application of muscarinic antagonist atropine has no significant effect on CA3–CA1-synchronization of epileptiform activity in synaptic blockers aCSF, while application of nonselective nicotinic antagonists mecamylamine and tubocurarine blocked generation of epileptiform activity and its CA3–CA1-synchronization. These data indicate that activation of nicotinic acetylcholine receptors promotes synchronization of neuronal activity between CA3 and CA1 hippocampus, independently from glutamate AMPA- and NMDA-receptors and GABA-receptors.

In the hippocampus, the main subtypes of nicotinic receptors are  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 4$ . Methyllaconitine (MLA), dihydro- $\beta$ -erythroidin (Dh $\beta$ E) and mecamylamine are respective antagonists that were used to study the role of nicotinic receptors in CA3–CA1-synchronization in the presence of AMPA-, NMDA- and GABA-antagonists. We found that antagonists of  $\alpha 7$ - and  $\alpha 4\beta 2$ -receptors – MLA and Dh $\beta$ E did not prevent CA3–CA1-synchronization, but mecamylamine did. The ineffectiveness of - and  $\alpha 4\beta 2$ -antagonists in terminating CA3–CA1-synchronization indicates on a possible role of the  $\alpha 3\beta 2$ -nicotinic receptors in CA3–CA1-synchronization in the hippocampus.

We also investigated the effect of the mentioned cholinergic antagonists on the seizure-like-activity of the hippocampus that was induced by the GABA-receptor antagonist bicuculline, potassium channel blocker 4-aminopyridine and low-magnesium solution. Results of these experiments showed that mecamylamine inhibits seizure-like-activity induced by bicuculin, but had no effect on the activity induced with 4-aminopyridine or low-magnesium. The results indicate on the role of nicotinic receptors in the development of hippocampal hypersynchronization during blockade of inhibitory synaptic transmission. Obtained results may partially explain the mechanisms of therapeutic action of mecamylamine in the CNS and also indicate on the possible role for nicotine cholinergic receptors as a pharmacological target for future antiepileptic drugs. Thus, the data obtained in dissertation might find its practical application in further development of the seizure control and prevention methods.



**Key words:** epileptiform activity, nicotinic acetylcholine receptors, hippocampus, AMPA, NMDA, GABA, mecamylamine.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ,

### в яких висвітлені основні результати роботи:

1. **Zapukhliak O**, Kachanovska V, Isaeva E, Netsyk O, Isaev D. Surface charge impact in nonsynaptic model of epilepsy in rat hippocampus. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2016; 62(2): 35-40. doi: 10.15407/fz62.02.035. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті)*.
2. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Rasulova O, Isaev D. Modulation of the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform synchronization in low-calcium model of epilepsy. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2016; 62(6): 19–24. PMID: 29762967 *(Особистий внесок здобувача: статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті)*.
3. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Isaev D. Synchronization of epileptiform activity between CA1 and CA3 hippocampal fields under synaptic and non-synaptic conditions in rat brain slices. *Medical Science of Ukraine*. 2020; 16(1): 3–7. doi.org/10.32345/2664-4738.1.2020.01 *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті)*.
4. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Isaev D. Nonsynaptic epileptiform activity in CA3-CA1 regions of the hippocampus in low-Ca<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>-containing milieu. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2020; 66(2-3): 21–26. doi: 10.15407/fz66.2-3.021. *(Особистий внесок здобувача: статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті)*.
5. **Zapukhliak O**, Isaev D. Mecamylamine modulates epileptiform discharges in low-Mg<sup>2+</sup> model of epilepsy. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2021; 67(1): 11–15.

*(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, графічне представлення результатів).*

6. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Romanov A, Maximyuk O, Oz M, Holmes GL, Krishtal O, Isaev D. Mecamylamine inhibits seizure-like activity in CA1-CA3 hippocampus through antagonism to nicotinic receptors. PLoS One. 2021; 16(3):e0240074. doi: 10.1371/journal.pone.0240074. PMID: 33711021.

*(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).*

**Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:**

1. 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. VI Міжнародний конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, Україна 2014.
2. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Romanov A, Krishtal O, Isaev D. Blockade of ASIC channels leads to inhibition of nonsynaptic seizures in rat hippocampus. VI Міжнародний конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, Україна 2014.
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. Proceedings of the Physiological Society. The Queen Elizabeth II Conference Centre, London, UK, 2014.

# ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	11
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРЕЧЕНЬ.....	15
<b>ВСТУП.....</b>	<b>16</b>
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ.....</b>	<b>22</b>
1.1 Сучасні уявлення про епілепсію.....	22
1.1.1 Класифікація епілепсій.....	23
1.1.2 Етіологія та патогенез епілептичних розладів.....	24
1.1.3 Скренева епілепсія.....	26
1.2 Морфо-функціональна характеристика гіпокампа.....	26
1.2.1 Особливості анатомічної будови гіпокампа білого щура.....	29
1.2.2 Медіаторні системи гіпокампа.....	34
1.2.3 Роль ацетилхоліну в модуляції активності гіпокампа.....	36
1.3 Експериментальне дослідження епілепсії <i>in vitro</i> .....	38
1.4 Несинаптичні механізми іктогенезу.....	42
1.5 Резюме.....	49
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>50</b>
2.1 Експериментальні тварини.....	50
2.2 Методика приготування розчинів штучної спинномозкової рідини.....	50
2.3 Методика приготування свіжоізольованих зрізів мозку щурів.....	51
2.4 Реєстрація польових потенціалів в свіжоізольованих зрізах мозку щурів.....	54

2.5 Індукція епілептиформної активності в свіжоізолюваних зрізах мозку щурів.....	55
2.5.1 Індукція несинаптичної епілептиформної активності.....	56
2.5.2 Індукція епілептиформної активності в розчині з 4-амінопіридином .....	58
2.5.3 Індукція епілептиформної активності у низькомагнієвому розчині.....	60
2.5.4 Індукція епілептиформної активності в розчині з бікукуліном.....	61
2.5.5 Модуляція епілептиформної активності нейронних мереж гіпокампа шляхом змін хімічного складу штучної спинномозкової рідини.....	62
2.5.6 Використані хімічні речовини.....	63
2.6 Статистичний аналіз даних.....	63
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>66</b>
3.1 Епілептиформна активність гіпокампа в несинаптичних умовах.....	66
3.1.1 Епілептиформна активність гіпокампа в низькокальцієвому розчині.....	66
3.1.2 Епілептиформна активність гіпокампа в кадмійвмісному розчині.....	69
3.1.3 Порівняння електрографічних характеристик епілептиформної активності в низькокальцієвому та кадмійвмісному середовищі.....	73
3.2 Вплив преінкубації зрізів гіпокампа у 4-АП-вмісному розчині на розвиток несинаптичної епілептиформної активності.....	75
3.3 Вплив позаклітинної концентрації магнію на несинаптичну епілептиформну активність у низькокальцієвому розчині .....	77
3.4 Синхронізація епілептиформної активності в зонах СА3 та СА1 гіпокампа в синаптичних та несинаптичних умовах.....	80
3.5 Епілептиформна активність гіпокампа індукована в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.....	84

3.5.1	CA3–CA1-синхронізація епілептиформної активності в розчині з АМПА, НМДА- та ГАМК-антагоністами.....	86
3.5.2	Вплив кадмію хлориду на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.....	88
3.5.3	Вплив механічного відокремлення ділянок зрізу гіпокампа на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами .....	91
3.6	Вплив холінергічних антагоністів на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами .....	94
3.6.1	Вплив атропіну на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА-, та ГАМК-антагоністами.....	96
3.6.2	Вплив тубокурарину на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.....	96
3.6.3	Вплив метиллікаконітину на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.....	97
3.6.4	Вплив дигідро- $\beta$ -еритроїдину на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.....	99
3.6.5	Вплив мекаміламіну на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.....	101
3.7	Вплив холінергічних антагоністів на бікукулініндуковану епілептиформну активність в гіпокампі.....	104
3.7.1	Вплив мекаміламіну на бікукулініндуковану епілептиформну активність в гіпокампі.....	104
3.7.2	Вплив антагоністів $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів на бікукулініндуковану епілептиформну активність в гіпокампі.....	107

3.8 Вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в низькомагнієвому та 4-АП-вмісному розчинах .....	109
<b>РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....</b>	<b>113</b>
4.1. Епілептиформна активність в зрізах гіпокампа в умовах повної блокади синаптичної передачі.....	113
4.2. Епілептиформна активність в зрізах гіпокампа за умов часткової блокади синаптичної передачі.....	116
4.3. Вплив холінергічних антагоністів на епілептиформну активність в гіпокампі.....	118
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>122</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>123</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

4-АП – 4-амінопіридин

АМПА –  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

ГАМК – гамма-аміномасляна кислота

ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр

ЕФА – епілептиформна активність

ЕЕГ – електроенцефалограма

ЕК – енторинальна кора

ЗЗ – зубчаста звивина

МПЕЛ – Міжнародна протиепілептична ліга

НМДА – N-метил-D-аспартат

CA1-3 - cornu ammonis

шСМР – штучна спинномозкова рідина

## ВСТУП

Епілепсія є поширеним неврологічним розладом, що має тривалу історію дослідження, складні соціо-економічні наслідки та досі нез'ясовані механізми розвитку [1].

Основною клінічною ознакою епілепсії є наявність неспровокованих та повторюваних періодів гіперсинхронної нейронної активності – епілептичних судом [2]. Епілептичні судоми мають широкий спектр клінічних проявів: від неконтрольованих м'язових конвульсій до вегетативних порушень та сенсорних галюцинацій [3]. Наявність судом не є виключно ознакою епілептичного розладу. Значна кількість патологічних процесів (лихоманка, гіпергідратація, алкогольна абстиненція, гіпоглікемія) можуть спровокувати судомний напад [3]. *Іктогенез* (від лат. “*ictus*” – удар) – це сукупність динамічних змін, що спричиняє початок, розповсюдження і припинення судомного нападу. З'ясування механізмів іктогенезу є необхідним для розробки нових методів фармакотерапії епілепсії. Ця проблема є високоактуальною, зважаючи на незадовільну ефективність більшості сучасних протиепілептичних засобів.

**Актуальність теми.** Одним з основних методів дослідження епілептичної активності нейронних мереж є вивчення її електроенцефалографічних (ЕЕГ) корелятивів. Умови, за яких в зрізах мозку щурів виникає спонтанна або індукована епілептиформна активність (ЕФА), широко використовують в *in vitro*-моделях епілепсії. В електрофізіологічних експериментах моделювання ЕФА *in vitro* має багато переваг; зокрема це дозволяє вивчати вплив факторів позаклітинного середовища (змін осмолярності, концентрації іонів і т.і.) на генерацію ЕФА, що важко або неможливо дослідити в умовах експериментів *in vivo*.

Внаслідок унікальної анатомічної структури та циклічності основних синаптичних зв'язків, гіпокамп має високу схильність до генерації та розповсюдження гіперсинхронної нейронної активності. Навіть в умовах блокади синаптичної передачі (наприклад, шляхом зниження концентрації кальцію у



позаклітинному середовищі до  $\leq 0.4$  мМ) гіпокампальні нейронні мережі здатні генерувати та підтримувати досить характерну ЕФА. Можна було чекати, що вивчення чинників, необхідних для індукції ЕФА у складі гіпокампограми під час блокади синаптичної передачі дозволить отримати нові істотні дані щодо механізмів схильності нейронних мереж гіпокампа до судомної гіперсинхронізації активності.

В даній роботі повна блокада синаптичної передачі досягалась шляхом суперфузії зрізів гіпокампа розчином штучної спинномозкової рідини (шСМР) з низьким вмістом кальцію або кадмійвмісним розчином ( $\text{CdCl}_2$  15 мкМ); в таких умовах відбувається блокування функції потенціалкерованих кальцієвих каналів та істотне пригнічення вивільнення нейротрансмітерів. Умови часткової блокади синаптичної передачі досягались шляхом суперфузії зрізів гіпокампа шСМР, котра містила суміш антагоністів глутаматних АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів. На відміну від низькокальцієвої та кадмійвмісної шСМР, розчин зі вказаними антагоністами не блокує вивільнення нейротрансмітерів, тому ЕФА, що виникає в таких умовах, не обов'язково буде наслідком дії лише несинаптичних механізмів. Оскільки переважна більшість синаптичних зв'язків між зонами гіпокампа СА3 та СА1 є глутамат- або ГАМКергічними, розчин з сумішшю АМПА-, НМДА-, та ГАМК-антагоністів використовували для з'ясування додаткових механізмів синхронізації в гіпокампальних нейронних мережах, котрі не залежать від стану цих основних синаптичних систем. В роботі також було досліджено вплив антагоністів холінорецепторів на генерацію ЕФА, що виникає в гіпокампі в умовах блокування глутамат- та ГАМКергічної синаптичної передачі.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано відповідно загальному плану наукових досліджень у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «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), «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343).

**Мета та завдання дослідження.** Основною метою даної дисертаційної роботи було *визначити характеристики та механізми виникнення спонтанної епілептиформної активності в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа щурів в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі.*

Для досягнення мети дослідження були поставлені наступні завдання:

1. Зареєструвати епілептиформну активність в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа під час повної або часткової блокади синаптичної передачі та порівняти відповідні характеристики гіпокампограм, отриманих в таких умовах.
2. Порівняти рівні синхронізації епілептиформної активності в зонах СА3 та СА1 гіпокампа в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі.
3. Визначити умови, критично необхідні для синхронізації епілептиформної активності в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа під час блокування глутаматергічної та ГАМК-ергічної синаптичної передачі.
4. Визначити типи синаптичних рецепторів, що беруть участь у синхронізації активності зон гіпокампу СА3 та СА1 в умовах блокади глутаматергічної та ГАМК-ергічної синаптичної передачі.
5. Визначити роль рецепторів, що беруть участь у СА3–СА1-синхронізації під час селективного блокування синаптичної передачі, в генерації епілептиформної активності в *in vitro*-моделях епілепсії.

*Об'єкт дослідження* – епілептиформна активність в мережах гіпокампа, не пов'язана з активацією глутаматергічної та ГАМК-ергічної провідностей.

*Предмет дослідження* – електрографічні кореляти епілептиформної активності та механізми її виникнення в зонах гіпокампа СА3 та СА1 під час повного або часткового блокування синаптичної передачі.

*Методи дослідження* – виготовлення свіжоізольованих зрізів мозку щурів, індукція спонтанної епілептиформної активності шляхом суперфузії зрізів мозку шСМР модифікованого складу, реєстрація позаклітинних електричних потенціалів в свіжоізольованих зрізах гіпокампа.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі вперше порівняно характеристики ЕФА зон СА3 та СА1 гіпокампа в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі в свіжоізольованих зрізах мозку щурів. Виявлено, що ЕФА, індукована в умовах блокування окремих видів синаптичної передачі (АМПА-, НМДА-глутаматних та ГАМК-рецепторів) має чіткі відмінності від активності при повній синаптичній блокаді. Показано, що рівень синхронізації ЕФА в зонах СА3–СА1 під час часткової блокади є вищим, ніж в умовах повної блокади. Результати роботи вказують на існування додаткового механізму синхронізації ЕФА гіпокампа, котрий не залежить від стану глутаматергічної та ГАМК-ергічної провідностей. Виявлено, що антагоністи нікотинових ацетилхолінових рецепторів припиняють синхронізацію ЕФА в зонах СА3–СА1, котра виникала в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів. Таким чином в дисертаційній роботі вперше показана роль нікотинових холінорецепторів в епілептиформній синхронізації активності нейронів гіпокампа в умовах блокади глутамат- та ГАМКергічної передачі. Виявлено, що антагоністи  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не впливають на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, а неспецифічний антагоніст мекаміламін її істотно пригнічує. Неефективність антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -холінорецепторів в припиненні синхронізації в зонах СА3–СА1 вказує на можливу роль  $\alpha 3\beta 4$ -підтипу

нікотинних рецепторів у синхронізації активності в зонах CA3–CA1. В роботі також вперше показано, що мекаміламін пригнічує ЕФА, індуковану антагоністом ГАМК бікукуліном; це вказує на істотну роль н-холінорецепторів в розвитку бікукулініндукованої гіперсинхронізації в гіпокампі.

**Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.** Одержані результати свідчать, що активація нікотинних ацетилхолінових рецепторів сприяє синхронізації ЕФА в ділянках CA3 та CA1 гіпокампа, незалежно від стану основних синаптичних систем (АМПА- і НМДА-глутаматних рецепторів та ГАМК-рецепторів). Результати даної роботи вказують на потенційну роль нікотинних холінорецепторів як можливої фармакологічної мішені при розробці протиепілептичних засобів. Показано, що антагоніст нікотинних ацетилхолінових рецепторів мекаміламін (зареєстрований антигіпертензивний препарат) припиняє синхронізацію ЕФА в межах CA3 та CA1 в свіжоізольованих зрізах гіпокампа. Цей факт дає підстави для подальшого вивчення можливих протиепілептичних властивостей мекаміламіну. Одержані дані мають практичне значення для розробки нових засобів контролю та запобігання судомної активності в гіпокампі.

**Особистий внесок.** Усі експериментальні дослідження виконувалися за безпосередньої участі дисертантки. Отримання свіжоізольованих зрізів гіпокампа, реєстрація ЕФА, кількісна обробка результатів та їх графічне представлення виконувалось особисто автором роботи. Дисертантка брала участь в плануванні експериментів, аналізі результатів та підготовці публікацій разом з науковим керівником роботи акад. НАН України О. О. Кришталею, а також к.б.н. Д. С. Ісаєвим та к.б.н. О. В. Нецик, з якими автор має спільні публікації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи були представлені у публікаціях на VI Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ 2014) та Фізіологічній конференції Центра Королеви Єлизавети II (Лондон 2014).

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано шість статей у фахових наукових журналах та три тези доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та обговорення, а також висновків та списку використаних джерел (207 найменувань). Робота викладена на 141 сторінках, проілюстрована 63 рисунками та містить 2 таблиці.

# РОЗДІЛ 1

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

### 1.1 Сучасні уявлення про епілепсію

Епілепсія – неврологічний розлад, що супроводжується повторюваними судомними нападами, відомий людству не одну тисячу років [1]. Незважаючи на тривалу історію досліджень, навіть визначення терміну «епілепсія» досі є предметом обговорення серед епілептологів [2]. Так, до сьогодні залишається невирішеним питання, чи вважати епілепсію окремим захворюванням чи комплексом неврологічних розладів [3]. Також суперечки виникають стосовно класифікації епілепсії як психіатричного та / або неврологічного розладу [4]. В 2018 році Міжнародна ліга боротьби з епілепсією (Міжнародна Протиепілептична Ліга, МПЕЛ, *International League against epilepsy, ILAE*) оприлюднила чергові оновлення власної позиції щодо термінології та класифікації епілепсій [5]. МПЕЛ визначає *епілепсію* як неврологічний розлад, що характеризується рецидивними та непередбачуваними порушеннями нормальної функції мозку – *епілептичними судомами*, а також нейробіологічними, когнітивними, психологічними і соціальними наслідками цих станів [5].

Значення терміну «судоми» також є предметом постійного уточнення. За сучасними уявленнями, епілептичні судоми є тимчасовим явищем, що супроводжується набором клінічних ознак та симптомів, зумовлених ненормальною, надлишковою синхронною активністю нейронів головного мозку [5-7]. Судомні напади мають багато можливих клінічних проявів, серед яких порушення сенсорних, моторних та вегетативних функцій, зміни рівня свідомості та емоційного стану, ушкодження пам'яті, когнітивних функцій та поведінки [6].

Згідно із сучасним визначенням, умовами, необхідними для встановлення діагнозу епілепсія, є наявність двох неспровокованих судомних нападів або

одного неспровокованого нападу на тлі високої ймовірності виникнення наступного [5].

### ***1.1.1 Класифікація епілепсій***

Сучасні класифікації епілепсії мають на меті систематизувати різноманітні клінічні прояви епілептичних станів [8]. В першу чергу за характеристиками ЕЕГ визначають тип епілептичних нападів – *фокальні* (парціальні) чи *генералізовані* [9-11]. Фокальна епілепсія характеризується нападами, які починаються в одній півкулі мозку або в певній частці. Під час генералізованої епілепсії вогнища епілептичної активності одночасно виникають в обох півкулях мозку [12].

Рівень свідомості людини під час епілептичного нападу є наступною важливою ознакою для класифікації епілептичного розладу [13]. Під час фокальних нападів свідомість може бути частково порушена або ж не мати змін [14]. Генералізовані епілептичні напади завжди супроводжуються порушенням свідомості в певній мірі [15]. В залежності від функціональної ролі ділянок мозку, в яких спостерігається патологічна епілептична активність, судоми можуть не супроводжуватись м'язовими скороченням та проявлятися у сенсорних або вегетативних порушеннях чи змінах. Окремий тип генералізованих нападів – *абсанс* напади (від фр. *absence* — «відсутність») можуть проходити непоміченими, оскільки тривають декілька секунд та, окрім короткочасної втрати свідомості, не супроводжуються іншими змінами [16].

З метою стандартизації методів лікування та полегшення діагностики набори певних клінічних ознак, що зустрічаються разом та супроводжують судомні напади (як то вік, коли відбулися перші напади, тип судом, характеристики ЕЕГ та інші ознаки) сукупно визначають як *епілептичні синдроми* [17, 18].

Проблемою сучасних класифікацій залишається те, що вони не ґрунтуються на механізмах та причинах розвитку епілептичних станів, оскільки останні в більшості випадків залишаються нез'ясованими [1, 19].

### ***1.1.2 Етіологія та патогенез епілептичних розладів***

В клінічній практиці при класифікації епілептичних розладів за етіологією виділяють наступні групи: структурна, генетична, інфекційна, метаболічна та імунна [3, 20].

До *структурної етіології* відносять епілепсії, пов'язані з наявністю структурних змін в головному мозку внаслідок певних патологічних процесів (інсульт, травми, пухлини мозку) [20].

До *генетичної етіології* відносять епілепсії, що спричинені генетичною мутацією, наприклад, мутації SCN1A, які пов'язані з синдромом Драве [21-22]. Зазначається, що епілепсія генетичної етіології не обов'язково є успадкованою, оскільки існує ймовірність, що генетичні мутації виникли *de novo*, тим не менш така епілепсія може бути генетично передана наступному поколінню.

Епілепсії *інфекційної етіології* супроводжуються рецидивними судомними нападами на трі тривалого інфекційного захворювання [23]. Широкий спектр інфекцій може спричинити епілептогенез: туберкульоз, ВІЛ, церебральна малярія, підгострий склерозуючий паненцефаліт, церебральний токсоплазмоз та отримані від матері інфекції, такі як вірус Zika та цитомегаловірус [23-25].

Окремо виділяють епілепсії *метаболічної етіології*, тобто такі, що спричинені дефектом метаболізму, як то порфірія, уремія, аміно-ацидопатії [26]. Також окремо розглядаються епілепсії *імунної етіології* (ті, що розвиваються на фоні аутоімунного запалення в мозку), оскільки наявність аутоімунного процесу вимагає окремого підходу до лікування таких епілепсій [28].



*Механізми патогенезу епілепсії* на сьогодні залишаються не до кінця зрозумілими. *Епілептогенез* – це набір пластичних змін у мозку, що обумовлюють подальшу здатність нервової тканини до генерації *спонтанних* та повторюваних епілептичних нападів [29-31]. Епілептогенез є повільним процесом та складається з трьох основних етапів: ініціації, латентного періоду та періоду хронічних судомних нападів [32]. *Ініціацією* епілептогенезу можуть стати будь-які патологічні зміни в мозку, серед яких запалення, травми, інсульт, а також тривалі (більше 30 хвилин) епілептичні судоми – *епілептичний статус* [33]. Процеси, що мають місце під час перелічених патологічних станів, запускають складні та різноманітні компенсаторні механізми, що ведуть до структурних та функціональних змін зв'язків між нейронами. Під час епілептогенезу протягом всього *латентного періоду* відбувається перебудова синаптичних контактів, нейрогенез, ріст аксонів (*спрутінг*), відбувається збільшення збудливості мембран нейронів [32, 33]. Латентний період епілептогенезу може тривати від тижнів до декількох років [34]. Клінічним проявом та наслідком перелічених патологічних змін є поява спонтанних епілептичних нападів, що є завершальним етапом епілептогенезу.

Наявність клінічних судом не є однозначною ознакою епілепсії [35, 36]. До генерації судомної активності може призводити значна кількість патологічних процесів – такі напади вважаються *спровокованими* і не підпадають під визначення епілептичних [37]. *Іктогенез* – це сукупність динамічних змін, що спричиняють початок судомного нападу, його розповсюдження і припинення [38]. Переважна більшість *in vitro*-моделей епілептиформної синхронізації активності нейронів розроблена з метою дослідження клітинних та молекулярних процесів іктогенезу [19].

З'ясування механізмів епілептогенезу та іктогенезу має велике значення для ефективної розробки протиепілептичних препаратів, що є актуальною проблемою, враховуючи, що в 20–30% випадків сучасні фармакологічні та навіть хірургічні методи лікування епілепсії є неефективними [38].

### **1.1.3 Скронева епілепсія**

Скронева епілепсія — це вид фокальної епілепсії, що характеризується спонтанними судомними нападами зумовленими епілептичною активністю у скроневій частці головного мозку [39-41]. Скронева епілепсія – найбільш розповсюджена форма епілепсії.

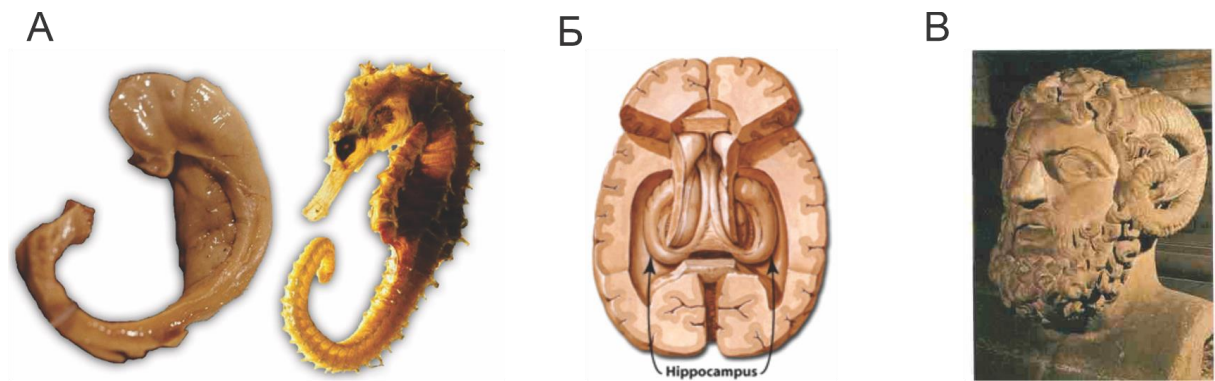
Залежно від локалізації вогнища епілептичної активності (в межах скроневої частки великих півкуль) скронева епілепсія поділяється на наступні форми:

- амигдалярна,
- гіпокампальна,
- латеральна,
- інсулярна.

Також в клінічній практиці використовують поділ скроневої епілепсії на 2 групи: латеральну та медіальну (медіо-базальна або амигдало-гіпокампальна) [41, 42]. Медіальна скронева епілепсія складає 65% від усіх фокальних епілепсій [43]. Переважна більшість медіальних скроневих епілепсій супроводжується склерозом гіпокампа [44].

## **1.2 Морфо-функціональна характеристика гіпокампа**

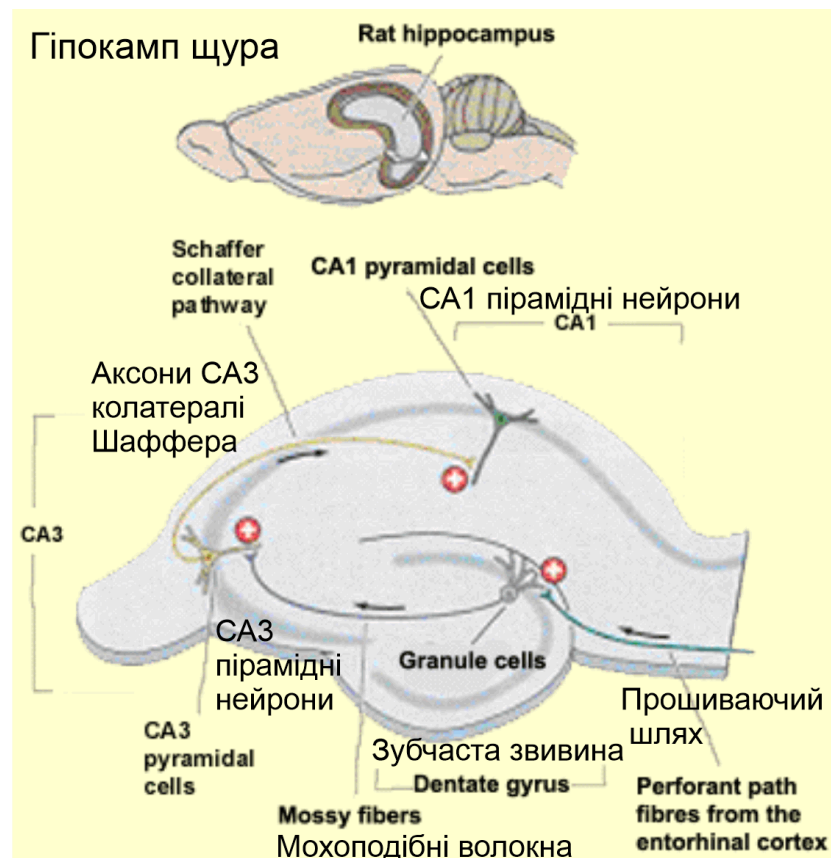
Гіпокамп (*hippocampus, морський коник*) – довгаста структура аллокортексу, яку вперше було описано у шістнадцятому сторіччі венеціанським анатомом Юлієм Цезар Аранзі (*Julius Caesar Aranzi, 1587*) [45]. В вісімнадцятому сторіччі було запропоновано назву Амонів ріг – *cornu Ammonis*, від подібності гіпокампа та прилеглих структур до рогів барана [46], з якими часто зображали стародавнього єгипетського бога Амона (рис. 1.1). Аббревіатура від *Cornu Ammonis* (CA) зберіглася до сьогодні та використовується для позначання трьох основних ділянок гіпокампа: CA1, CA2, CA3 (рис. 1.2).



**Рис. 1.1. Походження назви «гіпокамп». А) Гіпокамп людини та морський коник (рід *Hippocampus*). Б) Розташування гіпокампа в горизонтальній площині великих півкуль нагадує роги барана. В) Скульптура бога Амона з рогами барана.**

Перші значні кроки у розумінні функцій гіпокампа пов'язані з історією пацієнта Генрі Молісона (*пацієнт Н.М., Henry Molaison, 1926-2008*), якому було видалено обидва гіпокампа та прилеглі структури з метою припинення епілептичних нападів [47-49]. Після операції в пацієнта Н.М. розвинулась важка форма антероградної амнезії – він втратив здатність до консолідації пам'яті та формування нових спогадів [50]. Сьогодні пацієнт Н.М. вважається найбільш дослідженою людиною в історії нейрофізіології, а гіпокамп – найбільш вивченою структурою головного мозку [51].

З гіпокампом як з об'єктом досліджень пов'язано відкриття довготривалої синаптичної пластичності – феномена, що зумовив початок досліджень пам'яті в галузі нейрофізіології, а не психології [52]. Також в гіпокампі (в ділянці CA1) було зареєстровано електричну активність окремих нейронів («клітини місця», *place cells*), яка залежала та була обумовлена лише одним чинником – положенням тварини у просторі [53]. У 2014 році ці дослідження були відзначені Нобелівською премією з фізіології та медицини: «за відкриття клітин, що становлять систему позиціонування в мозку», нагороджені *John O'Keefe, May-Britt Moser та Edvard I. Moser* [54].



**Рис. 1.2.** Схематичне зображення розташування гіпокампа в мозку щура та поперечний зріз гіпокампа з зонами CA3 та CA1.

За сучасними уявленнями вважається, що в процесі еволюції гіпокамп спочатку мав функцію кодування положення організму в просторі та створення «ментальної мапи» місцевості. Сьогодні відомо, що ураження гіпокампа щурів в експериментах *in vivo* погіршує результати тварин в тестах на просторову орієнтацію [55], а гіпокамп лондонських водіїв таксі в середньому більше за гіпокамп звичайної людини [56]. Проте в людини, а можливо і в щурів, функція гіпокампа, окрім навігації, пов'язана з формуванням епізодичних спогадів – «ментальної мапи» подій, що відбулися. Епізодичні спогади – це інформація про події навколо суб'єкта, в яких вони брали участь [57]. На відміну, семантичні спогади – це інформація, що стосується об'єктивних понять та характеристик навколишнього світу (факти). Як показали зокрема чисельні дослідження пацієнта Н.М., людина з ураженням гіпокампа може навчитися нових понять про цей світ (семантичні знання), але не буде здатна пригадати послідовність власних дій в

останні півгодини (епізодичні спогади) [59]. Також, люди з ушкодженим гіпокампом відчують складність, коли їх просять уявити себе, наприклад, на березі моря. Такі люди здатні перелічити семантичні характеристики, як то «море», «пісок», «сонце», проте, їм важко описати власні відчуття в даних обставинах, як то «я чую шум моря та теплий пісок під ногами» [59-61].

Таким чином, за сучасними уявленнями, гіпокамп це система навігації мозку, яка в процесі еволюції набула здатності кодувати епізодичні спогади [60, 61].

### ***1.2.1 Особливості анатомічної будови гіпокампа білого щура***

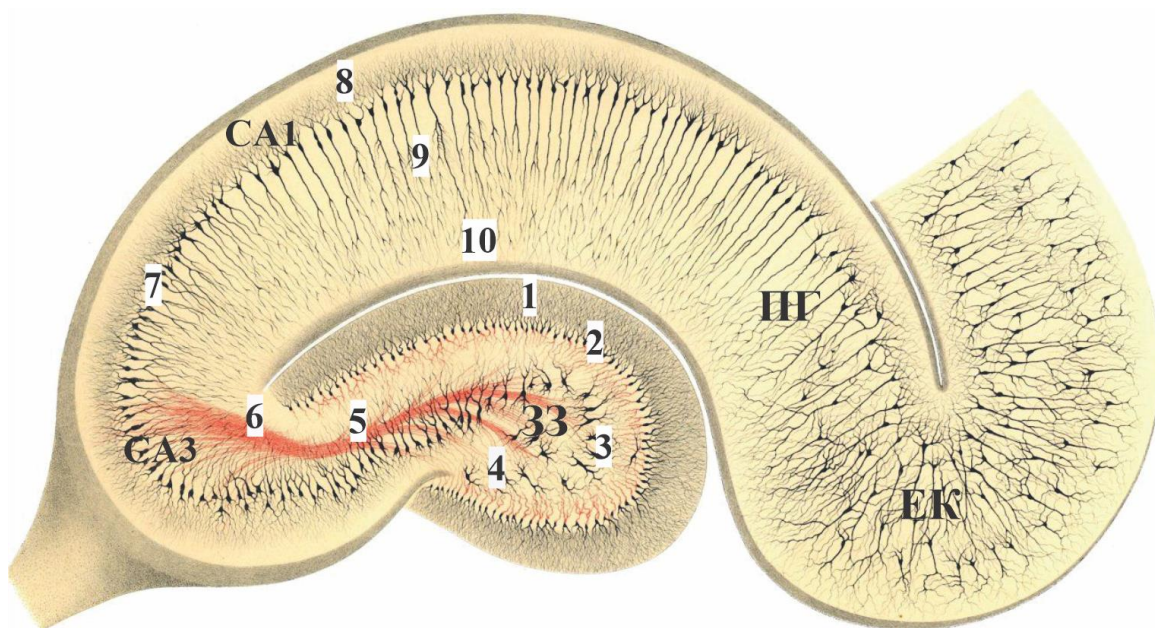
Головною особливістю анатомічної структури гіпокампа є упорядкована клітинна організація та ламінарно спрямовані внутрішні зв'язки – шари та зони гіпокампа легко ідентифікувати, що зумовлює зручність гіпокампа в *in vitro*-дослідженнях [62].

Гіпокамп є частиною гіпокампальної формації, до якої також відносять зубчасту звивину, підставку гіпокампа, а також (не завжди) енторинальну кору (ЕК) [46, 47]. Переважно під терміном «гіпокамп» розуміють власне Амонів ріг, тобто ділянки CA3 та CA1 разом з зубчастою звивиною (рис. 1.2).

***Особливості анатомічної та функціональної організації зубчастої звивини.*** Зубчасту звивину функціонально можна розглядати як «ворота» гіпокампальної формації; нейрони зубчастої звивини є релейною структурою аферентного входу в гіпокамп з кори. Анатомічно в зубчастій звивині виділяють *зернистий, молекулярний та багатоближний шари* (рис. 1.3).

В щільно упакованому *зернистому шарі (str. granulare)* зубчастої звивини містяться основні клітини – *зернисті нейрони*. Товщина цього шару складає приблизно 60 мкм, що відповідає 4–8 рядкам зернистих клітин. Всього в цьому шарі налічують приблизно 1.2 млн клітин [63, 64].

Натомість, у *молекулярному шарі (str. moleculare)* клітин майже немає (не враховуючи невеликої кількості інтернейронів); товщина молекулярного шару в щурів складає приблизно 250 мкм [64, 65]. В цьому шарі дендрити зернистих клітин формують контакти з аксонами нейронів енторинальної кори, що мають назву *прошиваючий шлях*.



**Рис. 1.3.** Анатомічна структура гіпокампальної формації: (ЕК) енторинальна кора, (ПГ) підставка гіпокампа, (ЗЗ) зубчаста звивина; 1) молекулярний шар, 2) зернистий шар, 3) багатоблибний шар, 4) мохоподібні клітини, 5) мохоподібні волокна; 6) *str. lucidum*; 7) пірамідний шар; 8) орієнтовний шар, 9) променевий шар, 10) молекулярно-затоковий шар

*Багатоблибний шар* зубчастої звивини (*str. polimorphe, hilus*) містить аксони зернистих нейронів, що прямують до ділянки СА3 та мохоподібні клітини [64]. На межі між зернистим та багатоблибним шарами містяться гальмівні нейрони зубчастої звивини – *пірамідні кошикові клітини* [65].

Зубчаста звивина формує зв'язок лише з ділянкою СА3. Аксони гранулярних клітин формують *мохоподібні волокна* та прямують до зони СА3, шару *str. lucidum*, де іннервують до половини всіх пірамідних клітин.

Особливістю цих волокон є те, що вони формують гігантські пресинаптичні термінали [66]. В середньому один зернистий нейрон іннервує всього лише 15–20 пірамідних нейронів СА3, що складає приблизно 0.1% від можливої кількості синаптичних контактів [63]. Цю морфологічну особливість пов'язують з потенційною здатністю (за сприятливих умов) лише однієї зернистої клітини викликати потенціал дії в пірамідному нейроні ділянки СА3 [63, 64]. Щоб досягти такої вибіркової стимуляції пірамідних клітин, кількість зернистих нейронів зубчастої звивини значно перевищує кількість пірамідних нейронів СА3. Так, в дорсальному гіпокампі співвідношення зернистих клітин до пірамідних нейронів СА3 сягає 12:1. В середньому не більше 50 зернистих клітин конвергують на одному нейроні СА3 [63].

### ***Особливості анатомічної та функціональної організації ділянки СА3–СА1***

В зонах СА3–СА1 виділяють наступні шари:

- орієнтовний шар (*str. oriens*, містить базальні дендрити пірамідних клітин, рис. 1.3-8);
- пірамідний шар (*str. pyramidale*, містить тіла пірамідних нейронів, рис. 1.3-7);
- *str. lucidum* (є лише в СА3, тут розташовані аксони мохоподібних волокон, рис. 1.3-6);
- променевий шар (*stratum radiatum*, містить апікальні дендрити пірамідних нейронів, рис. 1.3-9);
- молекулярно-затоковий шар (*str. lacunosum-moleculare*, розташований в ділянці СА1, містить аференти з III шару енторинальної кори, рис. 1.3-10).

Ділянка гіпокампа СА3 має декілька унікальних характеристик [67, 68]. Як вже було зазначено, кількість клітин в зоні СА3 значно менша, ніж в зубчастій звивині: від 210000 до 360000 клітин залежно від різновиду щура (лінія *Wistar* в середньому має менше клітин, ніж *Sprague-Dawley*) [64]. Аксони пірамідних нейронів СА3 формують рекурсивну мережу глутаматергічних зв'язків, що

сприяє, як вважається, реверберації збудження в цій ділянці мозку. Загальна довжина аксона одного пірамідного нейрону СА3 сягає 150–300 мкм, з яких 30% – це розгалуження в межах СА3. Терміналі одного аксона СА3 поширюються на 70% повздовжньої вісі гіпокампа та формують від 30000 до 60000 синаптичних контактів, тобто на порядок вище ніж середня кількість синаптичних контактів нейронів в мозку [64].

Наступною особливістю ділянки СА3 є випадковий характер синаптичних зв'язків. Окремий нейрон СА3 не обов'язково віддає перевагу синаптичним контактам з сусідніми нейронами, натомість пірамідні клітини СА3 формують синаптичні контакти з віддаленими нейронами з такою ж вірогідністю, як і з сусідніми, і ця вірогідність складає 2–5% [64, 68].

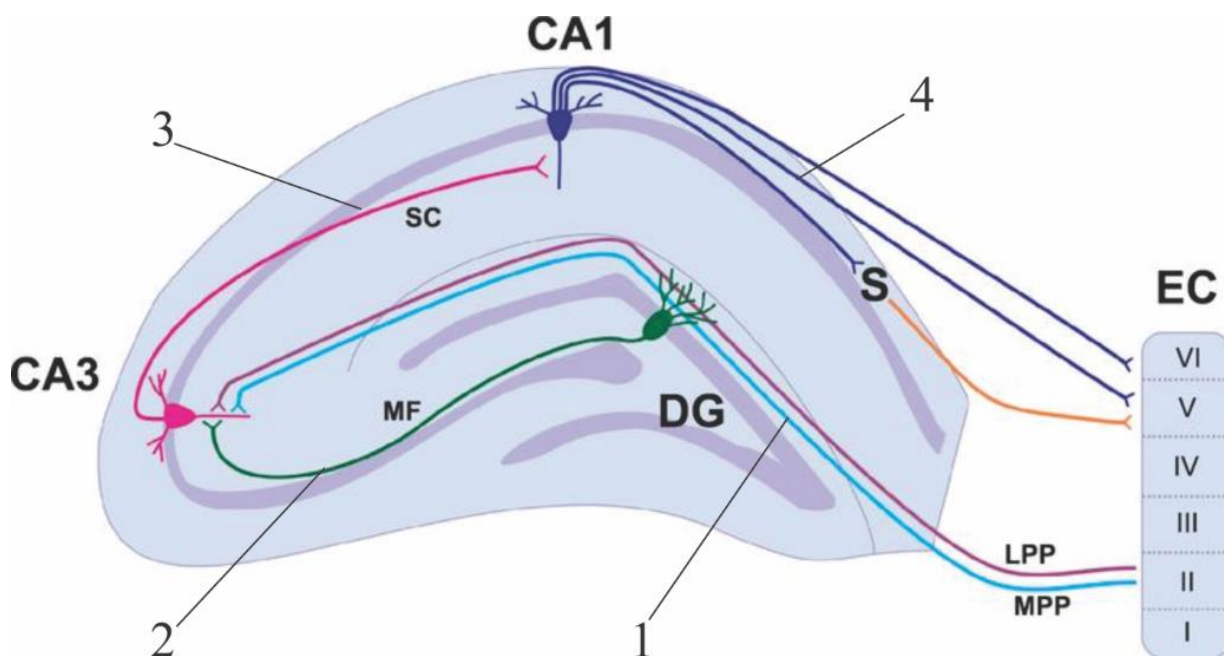
Унікальні анатомічні особливості ділянки СА3 формують клітину основу для функцій цієї зони гіпокампа. Вважається, що саме рекурентні зв'язки СА3 відповідають за формування автоасоціативної пам'яті [68], яка дозволяє відтворювати запам'ятовану раніше інформацію за наявності її неповного фрагменту. Також, ймовірно завдяки великій кількості зворотних зв'язків між нейронами, ділянка СА3 є генератором епілептичної активності в багатьох моделях епілепсії *in vitro* [69].

Аксоли ділянки СА3 (коллатералі Шаффера) формують синаптичні контакти з базальними та апікальними дендритами пірамідних нейронів СА1, відповідно в орієнтовному та проміневому шарах. В СА1 *пірамідний шар* містить 5-8 рядків клітин – пірамідних нейронів (рис.1.3).

**Структура внутрішніх зв'язків гіпокампа.** Особливістю гіпокампа є односпрямованість переважної частини синаптичних контактів. Деякі дослідники розглядають гіпокамп як обчислювальний авто-асоціативний модуль кори, оскільки він отримує аференти з енторинальної кори, яка є одночасно і основним реципієнтом еферентного виходу з гіпокампа [70].



В найпростішому схематичному представленні структуру внутрішніх гіпокампальних зв'язків уявляють у вигляді «трисинаптичного шляху». Трисинаптичний шлях – це послідовність синаптичних контактів гіпокампа у поперечному перетині, що починається та закінчується в енторинальній корі, формуючи таким чином замкнене коло (рис. 1.4) [71]. Енторинальна кора (ЕК) формує головний аферентний вхід до гіпокампа. Аксони нейронів II шару ЕК формують синаптичні контакти з дендритами зернистих клітин зубчастої звивини; аксони III шару ЕК прямують до СА1 молекулярно-затокового де вони іннервують дистальні дендрити пірамідних клітин.



**Рис. 1.4. Схема трисинаптичного шляху гіпокампа: 1) прошиваючий шлях, 2) мохоподібні волокна, 3) колатералі Шаффера, 4) аксони пірамідних нейронів СА1 прямують до підставки гіпокампа та енторинальної кори.**

Починається трисинаптичний шлях аксонами нейронів другого шару ЕК, що мають назву *прошиваючий шлях* (рис. 1.4-1). Волокна прошиваючого шляху формують синапси з нейронами зубчастої звивини – це перший синапс у трисинаптичному шляху. Далі, аксони зернистих клітин – *мохоподібні волокна*, (рис. 1.4-2) формують синапси з дендритами пірамідних нейронів СА3 – це другий синапс. Далі аксони пірамідних нейронів СА3 – *колатералі Шаффера*,

(рис.1.4-3) прямують до базальних та апікальних дендритів нейронів CA1 – третій синапс. Нейрони CA1, в свою чергу, посилають власні аксони знов до енторинальної кори (рис. 1.4-4), замикаючи таким чином коло трисинаптичного шляху [71].

Як вже було зазначено, односпрямованість та циклічність синаптичних зв'язків в гіпокампі формує клітинне підґрунтя для реверберації нейронного збудження. Унікальні особливості анатомічної будови морського коника зумовлюють високий рівень схильності цієї структури до судомної гіперсинхронізації активності нейронів [39, 40]. Додатково, ці характеристики гіпокампа, а саме ламінарна упорядкованість клітин та односпрямованість більшості синаптичних зв'язків, робить гіпокамп та прилеглі структури одним з найзручніших об'єктів для експериментальних досліджень в галузі нейрофізіології головного мозку.

### ***1.2.2 Медіаторні системи гіпокампа***

Синаптичний зв'язок є основним шляхом передачі інформації між нейронами. Подібно до інших кіркових структур, основним елементом цитоархітекτονіки гіпокампа є глутамергічні нейрони, які складають приблизно 90% гіпокамपालних нейронів (рис.1.5) [72].

Популяція гальмівних ГАМКергічних клітин складає приблизно 10% від загальної кількості нейронів гіпокампа. Різноманітні за будовою типи гальмівних нейронів в гіпокампі формують надзвичайно складну синаптичну мережу навколо пірамідних клітин.

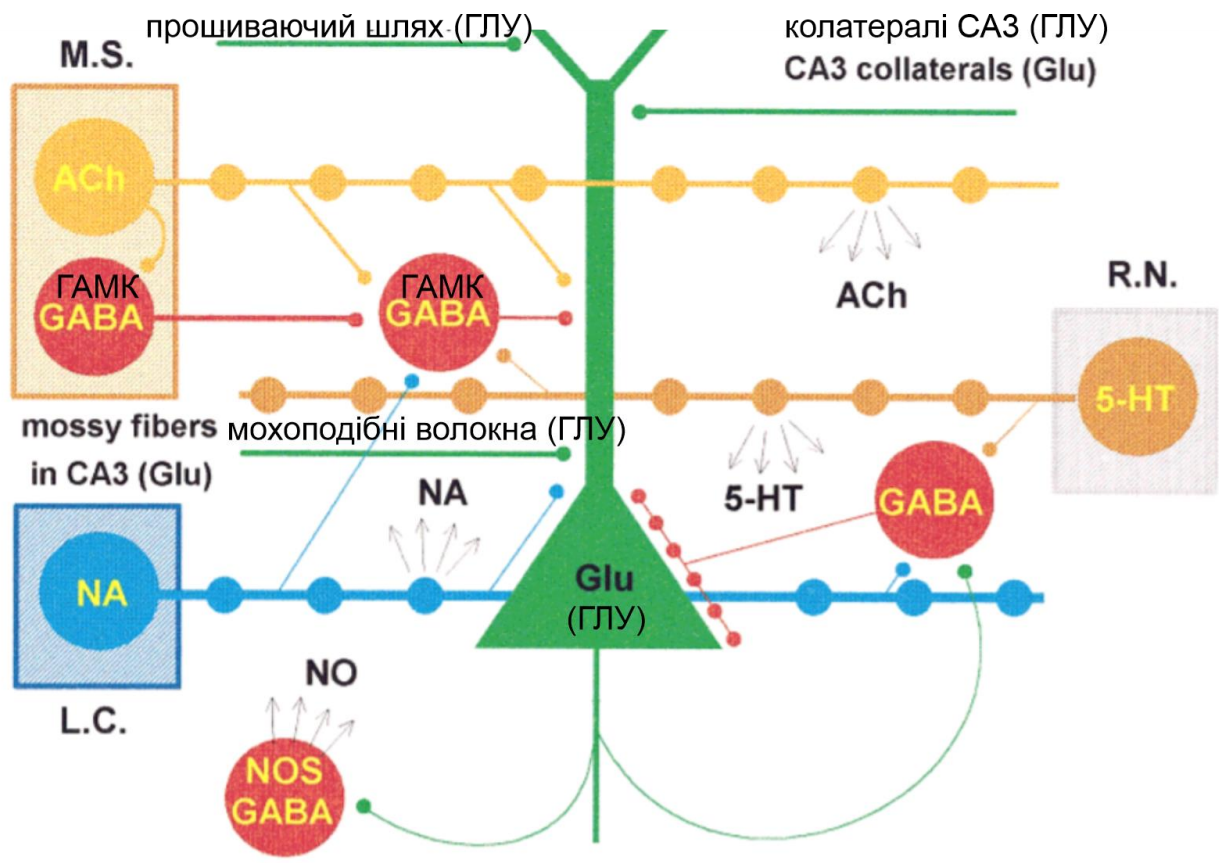


Рис. 1.5. Схематичне зображення основних аферентних шляхів гіпокампальної формації: пірамідні та зернисті нейрони (зелений трикутник) – глутаматергічні (ГЛУ); гальмівні нейрони (червоні) – ГАМКергічні; холінергічні (ACh) аксони від ядра перегородки (*medial septal nucleus* M.S.); серотонінергічні (5-HT) аксони ядра шва (R.N.); норадренергічні (NA) аксони блакитної плями (L.C.); NO – оксид азоту. Квадратами позначено екстрагіпокампальні аференти; стрілками позначено несинаптичне вивільнення нейротрансмітерів [72].

Окрім основних глутамат- та ГАМКергічних зв'язків, гіпокамп також містить норадренергічні, серотонінергічні та холінергічні терміналі аксонів (рис. 1.5), що є аферентними шляхами, які в основному походять, відповідно від блакитної плями (*locus coeruleus*), ядра шва (*raphe nucleus*) та ядер перегородки (*septal nuclei*) [73-75]. Більшість цих волокон (80–90%) не формує термінальних синаптичних контактів, тому вважається, що ці системи відіграють важливу роль у несинаптичному зв'язку між нейронами гіпокампа [75].

### 1.2.3 Роль ацетилхоліну в модуляції активності гіпокампа

Дослідження ролі ацетилхоліну в функції гіпокампальної формації ведуться не один десяток років [76]. Сьогодні відомо, що ацетилхолін бере участь в модуляції уваги, формуванні пам'яті та процесах синаптичної пластичності [77-79].

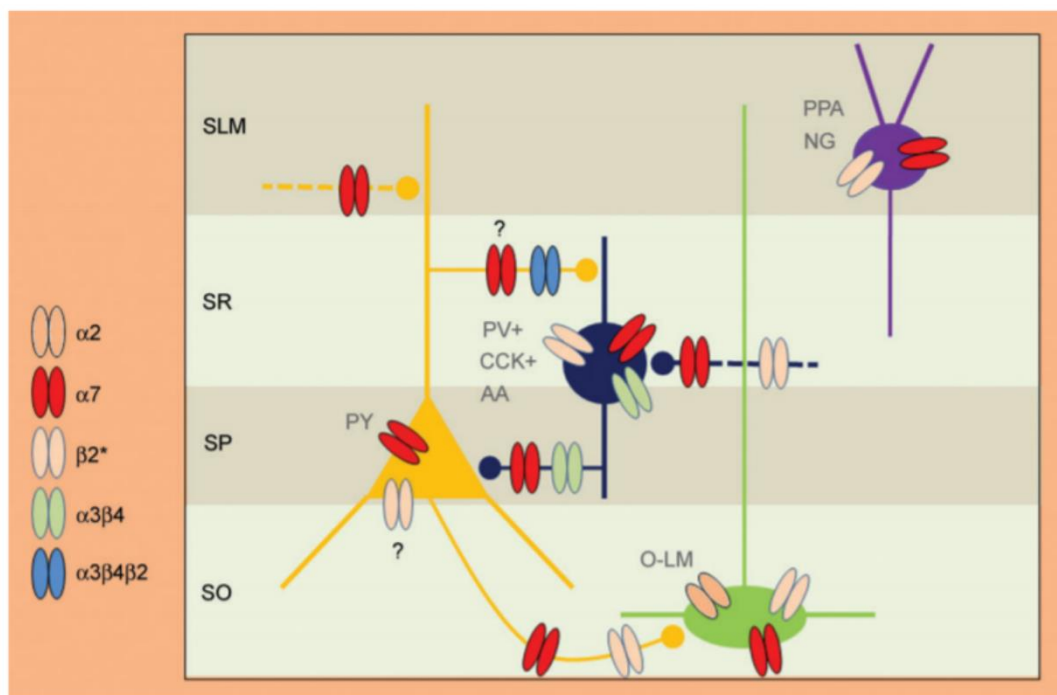
Дія ацетилхоліну опосередкована активацією двох типів ацетилхолінових рецепторів: *мускаринових та нікотинових* [80]. Мускаринові ацетилхолінові рецептори (м-холінорецептори) названі так завдяки агоністу мускарину – алкалоїду, що міститься в грибах *amanita muscaria* (мухомор червоний). Мускаринові рецептори є представниками родини G-білокспряжених рецепторів. Відомо п'ять їх ізоформ: M1-M5. Основні характеристики відомих ізоформ мускаринових рецепторів наведені в Таблиці 1.1 [за 77, 81].

**Таблиця 1.1. Характеристика м-холінорецепторів на нейронах гіпокампа**

Ізоформа	тип G-білка	Розташування в гіпокампі
M1	G <sub>q</sub>	сома, дендрити зернистих та пірамідних нейронів; парвальбумін-позитивні кошикові інтернейрони
M2	G <sub>i/o</sub>	пресинаптичні терміналі кошикових клітин та аксо-аксональні клітини в CA3 та CA1
M3	G <sub>q</sub>	сома та дендрити збудливих нейронів CA3 та CA1; холіцистокінін-позитивні кошикові нейрони; асоційовані з колатераліями Шаффера клітини CA1
M4	G <sub>i/o</sub>	сома непірамідних нейронів; пресинаптичні терміналі колатералей Шаффера; пресинаптично – на нехолінергічних волокнах ядра перегородки
M5	G <sub>q</sub>	низький рівень експресії

Завдяки розташуванню на пресинаптичних та постсинаптичних терміналях, мускаринові рецептори чинять істотний вплив на активність гіпокампальної мережі. Активація рецепторів M2 та M4 ( $G_{i/o}$ ) призводить до гальмування потенціалкерованих  $Ca^{2+}$ -каналів, зменшення цАМФ-опосередкованої сигналізації та пригнічення вивільнення нейротрансмітера з холінергічних, глутаматергічних та ГАМКергічних синаптичних терміналей [80, 81]. Активація M1, M3, M5 ( $G_{q/11}$ ) мускаринових рецепторів, навпаки, потенціює НМДА-струми, збільшує активність фосфоліпази С, інозитолтрифосфату, збільшує внутрішньоклітинну концентрацію кальцію, а також послаблює калієву провідність [82].

Другий тип ацетилхолінових рецепторів – нікотинові (н-холінорецептори) це різноманітна група гомо- та гетеромерних трансмембранних іонних каналів [83, 84]. Нікотинові рецептори складаються з альфа ( $\alpha 2$ - $\alpha 9$ ) та / або бета ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) субодиниць (рис. 1.6) [86].



**Рис. 1.6.** Схематичне зображення розташування нікотинових рецепторів на нейронах гіпокампа в зоні CA1: (SLM) str. lacunosum-moleculare; (SR) str. radiatum; (SP) str. pyramidale; (SO) str. oriens; (PV+) парвальбумін позитивні інтернейрони; (CCK+) холіцистокінін-позитивні інтернейрони; (AA) аксо-

аксональні інтернейрони; (OLM) підтип гальмівних нейронів; (PPA) клітини асоційовані з прошиваючим шляхом; (NG) нейрогліальні клітини. Пунктиром позначено глутаматергічні (жовті) та ГАМКергічні (сині) синаптичні терміналі [82].

В культурі гіпокампальних нейронів було досліджено три чітко відмінних типи ацетилхолінових струмів, що мають різну кінетику десенситизації [84]. Сукупні дані щодо типів нікотинових струмів та відповідних рецепторів на гіпокампальних нейронах представлені в *Таблиці 1.2* [84, 85].

*Таблиця 1.2. Характеристика нікотинових струмів на нейронах гіпокампа*

Тип струму	Кінетика десенситизації	Підтип рецептора	% нейронів гіпокампа	Антагоніст
IA	швидкий	$\alpha 7$	83	метиллікаконітин, альфа-бунгаротоксин
II	повільний	$\alpha 4\beta 2$	10	дигідро- $\beta$ -еритроїдин
III	повільний	$\alpha 3\beta 4$	2	мекаміламін

### 1.3 Експериментальне дослідження епілепсії *in vitro*

Препарати *in vitro* є цінним, корисним та зручним засобом дослідження ЕФА [86]. Відносна доступність цього методу дозволила розробити достатню кількість методів реєстрації ЕФА у свіжоізольованих зрізах мозку [87]. Найбільш поширеним об'єктом в даних дослідженнях є зрізи гіпокампа щурів [88].

Головним недоліком *in vitro* препаратів є неможливість відтворення головного клінічного прояву епілепсії – судомних нападів. З іншого боку, препарати *in vitro* мають багато переваг та дозволяють досліджувати значну кількість клітинних та молекулярних механізмів, що спричиняють генерацію судомних нападів [14]. Перевагами моделей епілепсії на свіжоізолюваних зрізах мозку є:

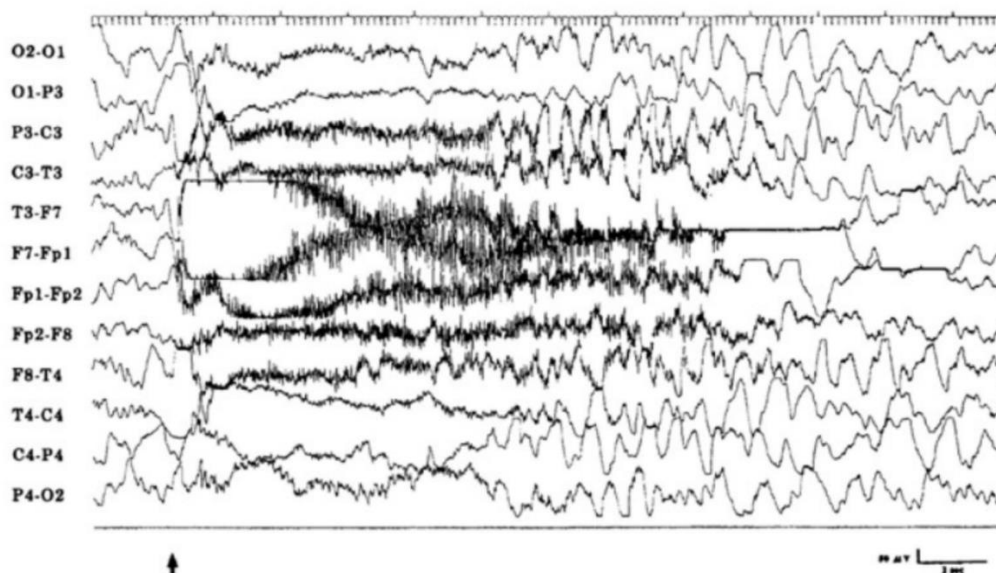
- 1) можливість контролювати та швидко вносити зміни у позаклітинне середовище;
- 2) можливість досліджувати вплив факторів та умов, таких що є несумісними з експериментами *in vivo*;
- 3) відсутність гематоенцефалічного бар'єру;
- 4) можливість більш точного розташування електродів;
- 5) відсутність впливу решти мозкових структур та ендогенних соматичних факторів;
- 6) можливість тривалої (протягом годин) та безперервної реєстрації ЕФА [88].

Ідеальна тваринна модель будь-якого захворювання має відтворювати клітинні або молекулярні процеси, що обумовлюють причини розвитку патологічного стану; відповідати на фармакологічні агенти, що використовуються для корекції патологічного стану, а також супроводжуватися фізіологічними та поведінковими проявами, подібними до тих, що наявні у людини [88]. Беручи до уваги велику кількість наявних синдромів епілепсії, їх різноманітну та часто нез'ясовану етимологію, а також суттєву обумовленість розвитку епілепсії набутими та генетичними чинниками, стає очевидним, що тваринні моделі епілепсії не здатні відтворити всього спектру епілептичних розладів людини, однак вони залишаються зручним та ефективним засобом дослідження патологічної синхронізації нейронних мереж.

### ***Електрографічні кореляти епілептичної активності нейронних мереж.***

ЕЕГ реєстрація є необхідним засобом вивчення епілептичної активності

нейронних мереж. Аномальна гіперсинхронна ЕЕГ-активність, зареєстрована від тих або інших церебральних структур *під час епілептичного нападу*, визначається як *іктальна активність* (рис. 1.7).



**Рис. 1.7.** Приклад іктальної ЕЕГ пацієнта з ADNFLE епілепсією, що виникла внаслідок мутації **CHRNA4-S284L** гену, який кодує  $\beta 2$  субодиницю н-холінорецептора [91].

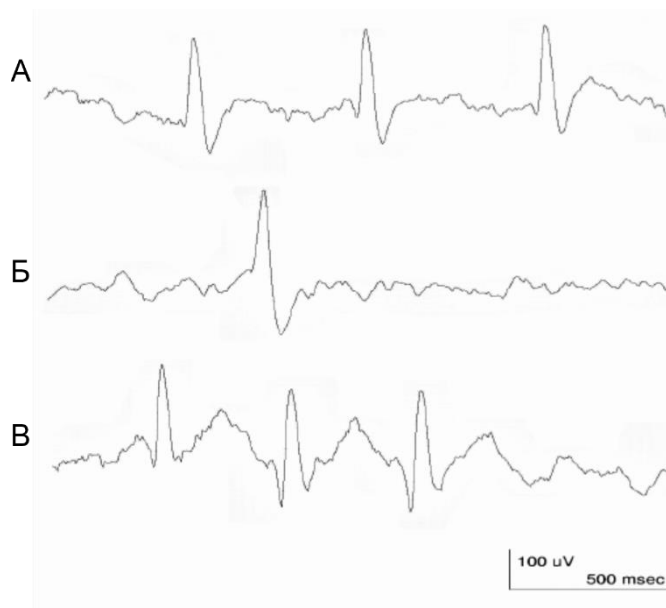
Пароксизмальні феномени в складі ЕЕГ, зареєстровані у пацієнта, що страждає на епілепсією, в період між епілептичними нападами, кваліфікують як інтеріктальну активність [89]. Іктальні та інтеріктальні прояви масової церебральної активності мають свої специфічні електрографічні характеристики; вони є предметом численних модельних досліджень [90]. Електрографічні кореляти, зареєстровані в зрізах мозку щурів *in vitro*, що є подібними до іктальних або інтеріктальних феноменів у складі ЕЕГ, визначаються як епілептиформна активність (ЕФА).

Абнормальні відхилення від фонової ЕЕГ, що реєструються в пацієнта з епілепсією в період часу між епілептичними нападами, називають інтеріктальними подіями. Серед основних корелятів інтеріктальної активності виділяють спайки та гострі хвилі (рис. 1.8) [87]. Епілептичним спайком



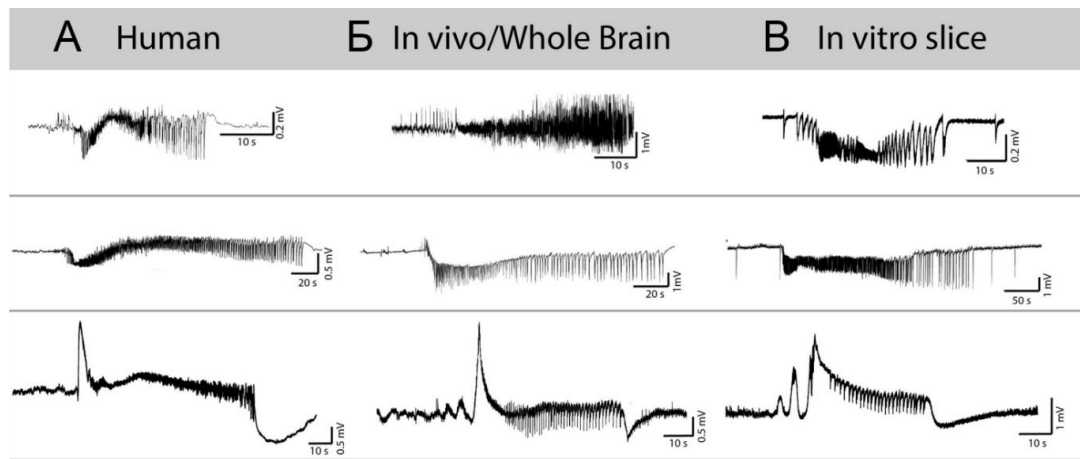
вважається патерн електричної активності, що чітко відрізняється від фонові активності та має тривалість 20–70 мс (рис. 1.8 А). Гострі хвилі – це патерн інтеріктальної активності, що триває 70–200 мс (рис. 1.8 Б).

Оскільки *in vitro* препарати позбавлені поведінкових корелятів судомного нападу, визначення електрографічних корелятів в *in vitro*-моделях епілепсії як таких, що мають стосунок до епілептичних судом, є до певної міри умовним.



**Рис. 1.8. Приклади інтеріктальних ЕЕГ корелятів епілептичної активності нейронів [92]. А) Епілептичні спайки. Б) Гострі хвилі. В) Комплекс «спайк-хвиля»**

Валідність експериментальних *in vitro*-моделей ЕФА зокрема базується на припущенні, що викликана електрична активність зрізів мозку має епілептичну природу, якщо вона електрографічно нагадує патерни ЕЕГ, котрі було зареєстровано в пацієнтів з клінічною епілепсією (рис. 1.9).



**Рис. 1.9.** Приклади іктальної ЕЕГ пацієнта, що страждає на епілепсією (А) та фрагменти отриманої експериментально спонтанної ЕФА, що було індуковано в цілому мозку (Б) та в свіжоізольованих зрізах мозку (В) [86].

Переважає більшість методик індукції ЕФА в свіжоізольованих зрізах мозку полягає в суперфузії зрізів розчином (шСМР) певного складу. Подібні шСМР створюють умови для фасилітації збудження або пригнічення гальмування в нейронних мережах. Наслідком суперфузії зрізів проепілептичними шСМР є генерація ЕФА, електрографічні кореляти якої можна зареєструвати позаклітинно на зрізах мозку [87, 89-92].

Тваринні моделі епілепсії та епілептичних нападів відіграють фундаментальну роль у розвитку сучасного розуміння основних механізмів іктогенезу та епілептогенезу. Експериментальні дослідження *in vitro* є невід'ємною ланкою на етапі доклінічних досліджень нових протиепілептичних препаратів [87, 90, 91, 93].

## 1.4 Несинаптичні механізми іктогенезу

Більше 120 років пройшло з моменту як термін "синапс" вперше було запропоновано у науковому суспільстві [94]. Сьогодні, на відміну від початку двадцятого сторіччя, вже не має сумніву, що саме хімічні, а не електричні, синапси забезпечують переважну більшість нервової передачі у головному мозку

хребетних. Необхідність у терміні «*несинаптичні механізми*» виникла на початку восьмидесятих років двадцятого сторіччя, коли вперше було опубліковано на той час дуже несподіване спостереження: у низькокальцієвому середовищі (шСМР без додавання солей кальцію) нейрони CA1 гіпокампа здатні спонтанно генерувати та тривалий час підтримувати значну епілептиформну синхронізацію активності [95-98]. Оскільки кальцій є необхідним для потенціалкерованого вивільнення нейротрансмітерів з пресинаптичної терміналі, суперфузія зрізів низькокальцієвим розчином створює несинаптичні умови. Таким чином, поняття «*несинаптичні механізми*» відображає сукупність чинників, які є необхідними або такими що сприяють епілептиформній синхронізації активності нейронів у низькокальцієвому середовищі або за інших несинаптичних умов [98].

Серед механізмів, що забезпечують синхронізацію нейронної активності за відсутності швидкої синаптичної передачі, виділяють 4 групи:

- 1) електричні синапси;
- 2) ефапси;
- 3) польові електричні взаємодії;
- 4) коливання у концентрації позаклітинних іонів [98].

### ***Електричні синапси***

Електричні синапси (щілинні контакти, нексуси) – це вид контакту між мембранами сусідніх клітин, який забезпечує електричний та хімічний зв'язок, а також безпосередній контакт між цитоплазмами клітин шляхом вбудовування протеїнових пор у прилеглі ділянки мембран [99]. Середня відстань між мембранами у електричному синапсі складає 3.5 нм, що значно менше порівняно з відстанню між пре- та постсинаптичною мембранами хімічних синапсів (20 нм). Враховуючи швидкість передачі збудження через електричні синапси, цілком можливо, що електротонічний зв'язок є одним з механізмів розвитку несинаптичної синхронізації активності нейронів [99].

Структурно електричні синапси являють собою ансамблі трансмембранних протеїнів – *конексинів*, що в кількості шести одиниць формують канал крізь мембрану діаметром 1.5 нм. Електричні синапси проникні до молекул з вагою не більше 1 кДа. Шляхом введення всередину нейрона флуоресцентних фарб (біоцетин, МВ = 372 Да, Люцифер жовтий МВ = 457 Да) можливо опосередковано дослідити кількість електричних синапсів, порашувавши кількість пофарбованих сусідніх клітин [100]. Недоліком цієї експериментальної методики є велика кількість артефактів, що, вірогідно, зумовило сумніви, стосовно ролі електричних синапсів в ЦНС ссавців. Дослідники дійшли згоди щодо наявності електричних синапсів в окремих відділах ЦНС, серед яких нижнє оливне ядро, середньомозкове ядро трійчастого нерву, латеральне вестибулярне ядро та нейроендокринні клітини гіпоталамуса [99, 101-103].

Сьогодні вважається, що роль електричних синапсів у функціонуванні кортикальних нейронів особливо помітна на ранніх стадіях ембріогенезу [104, 105]. Кількість електричних синапсів в неонатальних кортикальних зрізах є вищою, ніж така в зрізах мозку дорослих тварин [104]. Проте, в мозку дорослих тварин електричні синапси, вірогідно, мають певну функцію під час патологічних процесів [106-108]. Так, механічне ушкодження мозку, як, наприклад, під час приготування свіжоізольованих зрізів, викликає збільшення кількості електричних синапсів, що пов'язують з ураженням дендритів під час експериментальних процедур [98, 106].

Експериментальні дані свідчать, що за нормальних умов в гіпокампі щільними контактами пов'язані лише декілька сусідніх нейронів [107]. Яку саме участь беруть електричні синапси під час патологічної синхронізації активності нейронів (під час генерації ЕФА) досі не є остаточно зрозумілим [109]. Збільшення «фарбування» люцифером жовтим гіпокампальних нейронів було помічено у низькокальцієвому середовищі [106], що свідчить про збільшення кількості активних електричних синапсів в несинаптичних умовах. Таким чином, збільшення електротонічного зв'язку між нейронами гіпокампа у

низькокальцієвому середовищі є одним з вірогідних факторів передачі збудження між нейронами під час розвитку несинаптичної ЕФА [110].

### ***Ефапси***

Початково термін «ефапс» (*ephapse*) використовували в експериментальній практиці для позначення латерального контакту між немієлінованими волокнами двох нейронів; такий контакт забезпечує вплив електричної напруги від потенціалу дії однієї клітини на збудливість прилеглої мембрани іншої клітини. Щоб пояснити це явище та підкреслити його відмінність від синапсів, в 1941 році було запропоновано термін «ефапс» (від грецького “*εφαπτω*” – торкатися) [111]. Сьогодні деякі дослідники розширили початкове значення цього терміну та стали називати ефаптичною передачею будь-який вплив електричного поля на збудливість прилеглих мембран. Інші вважають, що подібні ефекти є перехідною стадією до наступної форми електричної взаємодії – польових ефектів [98, 112]. Умовою, необхідною для ефаптичної передачі, є щільний контакт між мембранами нейронів, щоб струми, які продукує мембрана однієї клітини, здатні були вплинути на потенціал мембрани сусідньої клітини. Чим вище електричний опір позаклітинного середовища, тим більша відносна роль ефаптичних контактів [113]. В експериментальних умовах зменшення електричної відстані між мембранами досягалось шляхом заміни позаклітинного розчину на мінеральну олію [98]. За нормальних фізіологічних умов в більшості мозкових структур ефапси не відіграють значної ролі у процесах нервової передачі. Протилежне має місце під час патологічних станів, зокрема таких, що супроводжуються процесами демієлінізації [114]. Так, в деяких випадках розсіяний склероз супроводжується судомними нападами, отже збільшення ефаптичних контактів між демієлінованими аксонами може бути одним з механізмів, що сприяє процесам іктогенезу у пацієнтів з цією патологією [114-116].

### ***Польові електричні ефекти***

Електричні струми, що їх продукують збудливі мембрани нейронів, сумарно накладаються та роблять внесок у формування позаклітинного електричного потенціалу [117]. Теоретично будь-який трансмембранний струм незалежно від його походження веде до змін у трансмембранному потенціалі. Швидкі трансмембранні струми, як, наприклад, під час розвитку потенціалу дії, формують значні зсуви у позаклітинному потенціалі, проте, ці зміни тривають декілька мілісекунд та не мають значного впливу на активність популяції нейронів. Зовсім інша ситуація складається, коли має місце синхронна активність великої популяції клітин, в такому разі сумарні струми продукують значні просторові градієнти в електричній напрузі [117]. Електрична провідність позаклітинного середовища сприяє тому, що мембрани нейронів здатні «детектувати» електричні градієнти [98, 118].

Питання щодо функціонального значення польових ефектів досі не має остаточної відповіді. З одного боку, цілком ймовірно, що позаклітинні електричні градієнти є лише епіфеноменом координованої мережевої активності нейронних популяцій. Проте, останнім часом з'являються експериментальні підтвердження протилежної точки зору: популяційна активність нейронів та ендогенні зміни у позаклітинному потенціалі в результаті цієї активності формують функціональний механізм зворотнього зв'язку, що є необхідним для нормальної функції мозку [117, 119]. За цією гіпотезою, флуктуації електричної активності викликають зміни позаклітинного потенціалу, що в свою чергу впливає на збудливість мембран нейронів, які генерують популяційну активність. Цілком можливо, що такий механізм зворотного зв'язку може служити функціональним засобом впливу на просторово-часову структуру активності нейронів [98, 117, 118].

Не всі структури мозку однаково схильні до генерації польових електричних ефектів. Важливим фактором, що сприяє польовим ефектам, є просторова організація клітин та їх відростків. Ламінарна організація таких кортикальних структур як гіпокамп і неокортекс, а саме загальна орієнтація і

щільне розташування нейронів, призводить до сумарної генерації значних електричних градієнтів, що створює сприятливі умови для польових ефектів.

Градiєнти позаклітинного електричного потенціалу залежать в значній мірі від опору позаклітинного середовища, та, відповідно, від його відносного об'єму. Маніпуляція цим чинником дозволяє впливати на збудливість нейронних популяцій шляхом змін осмолярності позаклітинного розчину [114, 121, 122]. Так, в гіпоосмолярному середовищі відносний об'єм позаклітинного простору зменшується за рахунок руху рідини всередину клітин, а електричний опір позаклітинного середовища за таких умов збільшується. Таким чином, польові електричні ефекти мають більш помітний вплив під час зменшення осмолярності позаклітинного середовища [98].

Отже, під час нормальних та патологічних умов активність нейронних мереж супроводжується генерацією градієнтів позаклітинного потенціалу, що є достатньо інтенсивними, щоб мати зворотній вплив на збудливість нейронних мембран.

### ***Коливання концентрації позаклітинних іонів***

Зміни у позаклітинній концентрації іонів мають значні ефекти на збудливість нейронної мембрани та мережеву активність [98, 110, 120, 121]. Одним з механізмів впливу позаклітинних іонів на збудливість нейронів є *екранування поверхневого заряду* двовалентними катіонами [120, 122]. Як відомо, між зовнішньою та внутрішньою частинами мембрани нейронів існує різниця електричних потенціалів (потенціал спокою); внутрішня поверхня мембрани має негативний заряд, а зовнішня – позитивний. Деполяризація – це процес зменшення різниці між електричними потенціалами на поверхні мембрани. Зміни електричного потенціалу викликають активацію потенціалкерованих іонних каналів, що мають «сенсор» локальної напруги навколо рецептору. Проте, окрім позитивного заряду (калій, кальцій, магній) зовнішня поверхня мембрани містить

також негативно заряджені компоненти, як то сіалові кислоти, фосфати ліпіди і т.і [122]. Цей негативний компонент заряду екранується, зокрема, двовалентними катіонами (кальцій, магній). Зменшення концентрації двовалентних катіонів зовні клітини зменшує екранування негативного поверхневого заряду, що в свою чергу призводить до локального зменшення різниці потенціалів навколо сенсору потенціалкерованих каналів на мембрані нейрона. Таким чином, зменшення концентрації двовалентних катіонів зменшує локальний потенціал навколо каналів-рецепторів; це, в свою чергу, призводить до полегшення активації потенціалкерованих каналів (слід зауважити що зміни потенціалу на мембрані клітини в цей час не відбувається). Збільшення ж концентрації позитивного заряду (двовалентних катіонів) біля потенціалкерованих каналів призводить до зменшення чутливості рецептору канала до змін у трансмембранному потенціалі. Тому, вважається, що одним з механізмів, який сприяє несинапатичній синхронізації ЕФА у низькокальцієвому середовищі, є саме зменшення екранування поверхневого заряду та деполяризація мембрани, викликані зменшенням позаклітинної концентрації кальцію [98, 122, 123].

Зміни у концентрації позаклітинного *магнію*, окрім впливу на поверхневий заряд, мають окремий власний ефект, пов'язаний з функцією НМДА-рецепторів. Особливістю цих глутаматкерованих рецепторів є те, що окрім хемочутливості, вони мають і потенціалкерований блок [124]. Цю функцію виконує іон магнію, що закриває пору НМДА каналу до тих пір, поки деполяризація мембрани не досягне певних значень. Відомо, що цей механізм має важливе значення у забезпеченні довготривалої синаптичної пластичності [125]. В експериментальних умовах, суперфузія гіпокампальних зрізів низькомагнієвим розчином є моделлю епілептогенезу *in vitro* [126].

Зміни у позаклітинній концентрації *натрію* не мають специфічної дії, проте концентрація натрію є важливим фактором позаклітинного осмотичного тиску, зміни якого пов'язані із зміною електричного опору позаклітинного середовища; це в свою чергу обумовлює здатність гіпоосмолярних розчинів підсилювати ЕФА



в *in vitro*-моделях епілепсії [110, 121]. Збільшення резистивності позаклітинного середовища, що було викликане зниженням осмотичного тиску, є одним з механізмів, за яким надмірна гідратація може спровокувати епілептичний напад в людини; так, стрімке зниження концентрацію натрію в плазмі є причиною смерті у випадках водної інтоксикації [127-129].

Концентрація калію зовні клітини в 40 разів менше за концентрацію натрію, тому інтенсивна активність нейронних популяцій здатна суттєво, в декілька разів, її змінити [98, 130]. Останнє має значні ефекти на збудливість нейронної мережі [131]. Суперфузія гіпокампальних зрізів розчинами з високим вмістом калію (> 7 мМ) викликає епілептиформні розряди [132, 133]. Накопичення позаклітинного калію під час тривалої ЕФА нейронів запропоновано як один з механізмів іктогенезу, що сприяє подовженню судомної активності [98, 131-133].

Отже, позаклітинні іонні флуктуації супроводжують нормальну та патологічну активність нейронів та є ефективним засобом впливу на збудливість нейронних мереж.

## **1.5 Резюме**

Моделювання ЕФА в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа дозволяє вивчати механізми розвитку синхронної діяльності нервової системи. Завдяки унікальним особливостям анатомічної будови гіпокампа має високу схильність до реверберації збудження та генерації судомоподібної активності. Навіть в умовах блокади синаптичної передачі гіпокампальні нейронні мережі здатні генерувати та підтримувати ЕФА. З'ясування чинників, що є необхідними для індукції ЕФА в гіпокампі під час блокади синаптичної передачі дозволить покращити розуміння механізмів гіпокампальної схильності до судомної гіперсинхронізації активності. Дослідження факторів та умов, які підсилюють або пригнічують розвиток несинаптичної ЕФА в гіпокампі дозволить вдосконалити сучасні методи лікування та запобігання епілептичних станів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Експериментальні тварини

В експериментах використовували білих щурів лінії Вістар WAG\GSto, котрих утримували в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Всі експериментальні процедури було виконано згідно з міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин: Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV. Проведення всіх експериментальних досліджень було узгоджено з Комітетом з біоетики інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України згідно протоколу від № 2/20 від 26.02.2020.

#### 2.2 Приготування розчинів штучної спинномозкової рідини

Розчин штучної спинномозкової рідини (шСМР, *artificial cerebrospinal fluid, aCSF*) – це водно-сольовий буферний розчин, який використовується експериментально для виділення мозку, отримання зрізів мозку, а також для подальшого збереження зрізів під час експерименту [134, 135]. Хімічний склад шСМР дозволяє підтримувати рівень рН та осмолярності в межах необхідних для свіжоізольованих зрізів [136-140].

В даній роботі для отримання зрізів мозку використовували шСМР стандартного складу, яка містила (мМ):  $NaCl$  125,  $KCl$  3.5,  $MgCl_2$  1.3,  $CaCl_2$  2.0,  $NaH_2PO_4$  1.25,  $NaHCO_3$  24, глюкоза 11. Розчин готували з дистильованою або деіонізованою водою кімнатної температури. Після додавання солей розчин карбогенізували та вимірювали рН. Процес карбогенізації полягав у пропусканні через розчин суміші газів «карбоген» (95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$ ). Після початку карбогенізації рН розчину приблизно становив 4.5–4.6; далі, при постійній

карбогенізації, додавали 50 мл розчину 0.5М NaHCO<sub>3</sub>, по 10–15 мл / 2–5 хвилин. Перед початком експериментів значення рН шСМР становило 7.3–7.4.

### 2.3 Приготування свіжоізольованих зрізів мозку щурів

В експериментах використовували щурів віком 10–14 днів. Цей вік тварин є загальноприйнятим для моделювання проепілептичних умов, оскільки постнатальний мозок є найбільш сприятливим до синхронізації активності нейронів [141, 142]. Для отримання зрізів мозку, тварин анестезували та швидко декапітували. Для анестезії використовували севоран, засіб для загальної анестезії (діюча речовина – севофлуран) [143]. Севоран змішували з киснем та подавали до інгаляційної камери, в котрій знаходився щур. Одразу після досягнення глибокої анестезії, швидко проводили декапітацію. Мозок вилучали у охолодженому шСМР (Т = 1–3° С) та скальпелем відрізували мозочок та лобові частки, як показано на рис. 2.1.



**Рис. 2.1.** Видалення мозочка та передньої третини великих півкуль мозку щура.

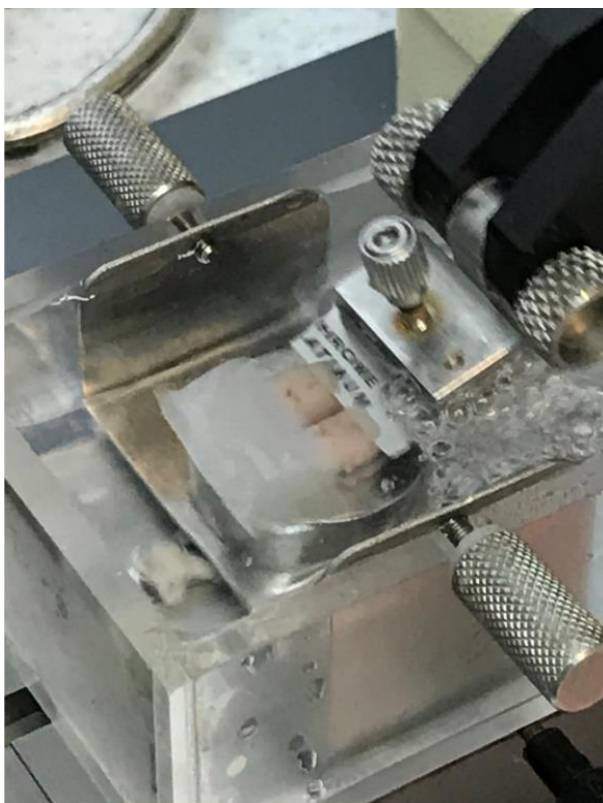
Далі мозок швидко підсушували, поклавши його вентральною частиною на фільтрувальний папір на декілька секунд та закріплювали на платформі вібротома (NVSL, World Precision Instruments, Sarasota, FL). Для кращої фіксації мозку на платформі вібротома встановлювали підставку з агар-агару, як показано на рис. 2.2.



**Рис. 2.2. Перенесення мозку на платформу вібротома, що містить підставку з агар-агару та тонкий шар клею.**

Далі, платформу з мозком закріплювали в камері вібротома, заповненій шСМР ( $T = 1-3^{\circ}C$ ) та при постійній карбогенізації розчину нарізали зрізи мозку 500 мкм завтовшки (рис. 2.3). Кожен зріз мозку окремо переносили до інкубаційної камери за допомогою пастерівської піпетки, як показано на рис.2.4.

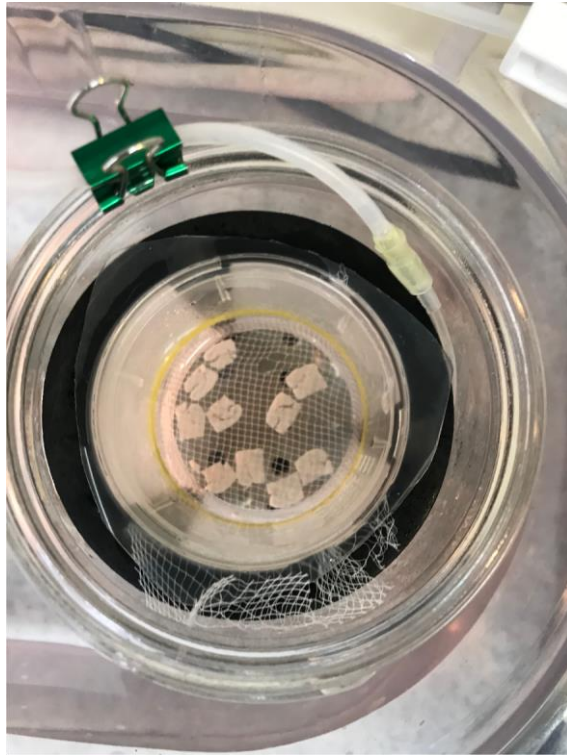
В інкубаційній камері зрізи розміщували на сітку (рис. 2.5). Температура розчину складала  $22-24^{\circ}C$ .



**Рис. 2.3. Виготовлення свіжоізольованих зрізів мозку щура.**



**Рис. 2.4. Перенесення зрізу мозку в Пастерівській піпетці.**



**Рис. 2.5. Горизонтальні зрізи мозку щура в інкубаційній камері.**

Перед початком експериментальних досліджень зрізи витримували 1.5–2.0 години в інкубаційній камері при постійній карбогенізації та температурі 23–24°C.

## **2.4 Реєстрація польових потенціалів в свіжоізольованих зрізах мозку щурів**

Для реєстрації позаклітинних польових потенціалів свіжоізольовані зрізи мозку розміщували у термостатичній камері повністю зануреного типу. Протягом реєстрації зрізи безперервно суперфузували шСМР, котру постійно карбогенізували. Середня швидкість подачі розчину складала 2–3 мл\*хв<sup>-1</sup>. Польові потенціали відводили хлорсрібними електродами від пірамідного шару ділянок СА3 та СА1 гіпокампа.

Електричні сигнали посилювали за допомогою диференційного підсилювача М1800 (А-М Systems, США) та оцифровували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача (NI PCI-6221; National Instruments, США) з

частотою 10 кГц. Запис електрографічних корелятів ЕФА виконували за допомогою програм WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Велика Британія) та Clampfit (Axon Instruments, США).

## 2.5 Індукція епілептиформної активності в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа

Спонтанну ЕФА викликали шляхом суперфузії зрізів мозку шСМР модифікованого складу [87, 135, 144]. Перед початком індукції ЕФА зрізи мозку суперфузували «контрольним» розчином протягом 2–5 хвилин, за умов стабільної «базової лінії» позаклітинного потенціалу, контрольний розчин заміняли на розчин для індукції ЕФА.

Корелятами ЕФА *in vitro* вважали повторювані пароксизмальні події – транзйентні зміни позаклітинного потенціалу тривалістю 20 мс або більше. Швидкі зміни потенціалу тривалістю 20–50 мс класифікували як *епілептиформні спайки* (рис. 2.6 А). Зміни потенціалу тривалістю 0.1–1.0 с класифікували як *епілептиформні розряди* або *польові події (field events, рис. 2.6 Б)*.

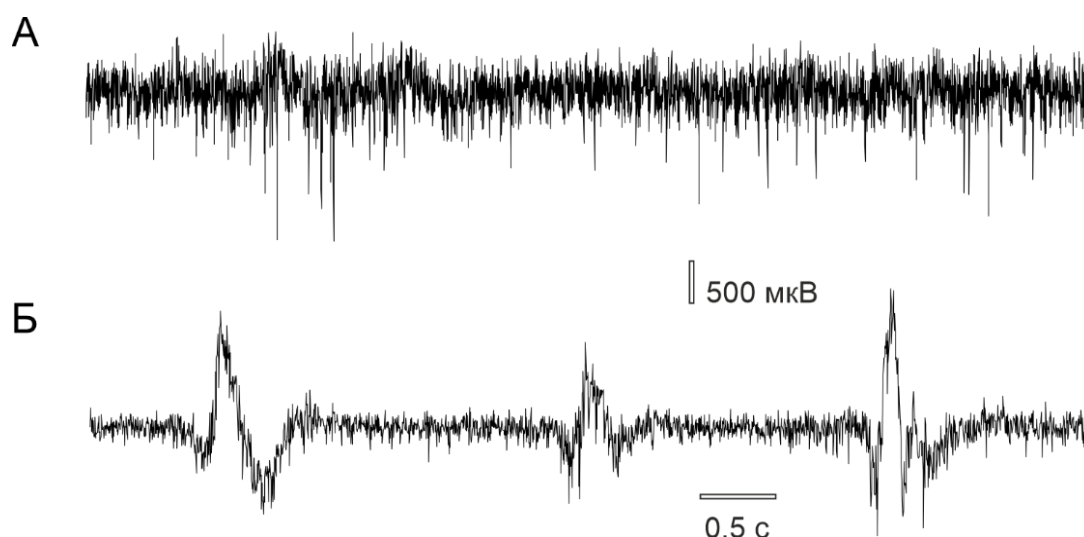
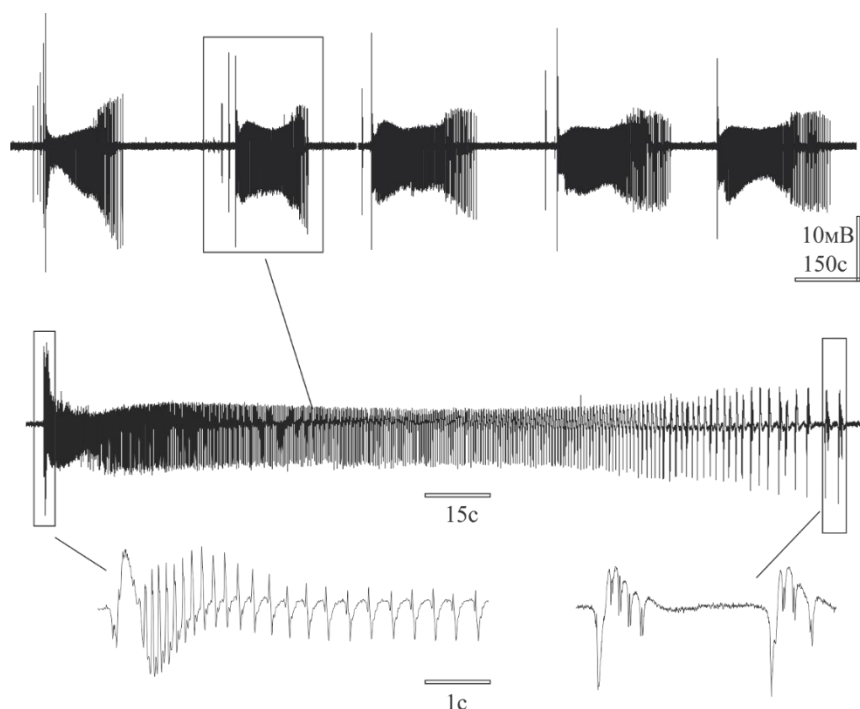


Рис. 2.6. Електрографічні кореляти ЕФА в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа щурів. А) Популяційні спайки, Б) польові розряди.

Згуртовану, повторювану ЕФА класифікували як сплески епілептиформної активності (рис.2.7).



**Рис. 2.7. Сплески ЕФА в зоні СА1 гіпокампа.**

В даній роботі використовували наступні розчини для індукції ЕФА в зрізах гіпокампа:

- 1) низькокальцієвий розчин;
- 2) кадмійвмісний розчин;
- 3) розчин з антагоністами АМПА, НМДА та ГАМК рецепторів;
- 4) низькомагнієвий розчин;
- 5) 4-АП-вмісний розчин;
- 6) бікукулін-вмісний розчин.

### ***2.5.1 Індукція несинаптичної епілептиформної активності***

В даній роботі несинаптичну ЕФА викликали шляхом суперфузії зрізів гіпокампа модифікованими шСМР, що створюють умови блокування переважної більшості синаптичної передачі між нейронами. Для дослідження ЕФА в



гіпокампі під час повної блокади синаптичної передачі зрізи мозку суперфузували низькокальцієвим та кадмійвмісним розчинами [95-97, 132,133]:

- 1) низькокальцієвий розчин (мМ) – *NaCl 115, KCl 5.0, MgCl<sub>2</sub> 1.3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 24, глюкоза 11*;
- 2) кадмійвмісний розчин (мМ) – *NaCl 115, KCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 1.0, MgCl<sub>2</sub> 1.3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 24, глюкоза 11*; перед початком експериментів додавали 15 мкМ CdCl<sub>2</sub>.

Для дослідження ЕФА в умовах часткового блокування синаптичної передачі використовували розчин з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами:

- 3) розчин з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами (мМ) – *NaCl 100, KCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 1.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 24, глюкоза 11*; перед початком експериментів додавали суміш наступних антагоністів:
  - АМПА-глутаматних рецепторів *DNQX (6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione) або CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)*, 10мкМ;
  - НМДА-глутаматних рецепторів *MK-801 ((5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate)* 2 мкМ;
  - ГАМК<sub>A</sub> рецепторів – бікукулін *((6R)-6-[(5S)-6-methyl-7,8-dihydro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-yl]-6H-furo[3,4-g][1,3]benzodioxol-8-one)* 10 мкМ.

Суперфузія зрізів мозку низькокальцієвим або кадмійвмісним розчином шСМР вважалась умовами *повної блокади синаптичної передачі*, оскільки в обох розчинах відбувається блокада функції потенціалкерованих кальцієвих каналів та пригнічення кальційзалежного вивільнення нейротрасмітерів. Суперфузія зрізів мозку розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами вважалась умовами *часткової блокади синаптичної передачі*, адже в таких умовах не відбувається блокування вивільнення нейротрансмітерів (на відміну від низькокальцієвої та

кадмійвмісної шСМР). ЕФА, індукована в таких умовах, не обов'язково є наслідком дії несинаптичних механізмів. В даній роботі позаклітинне середовище з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів було обрано, щоб дослідити додаткові механізми синхронізації активності нейронів в гіпокампальних мережах, які, очевидно, були менш помітними в «класичних» моделях індукції ЕФА.

### ***2.5.2 Індукція ЕФА в розчині з 4-амінопіридином***

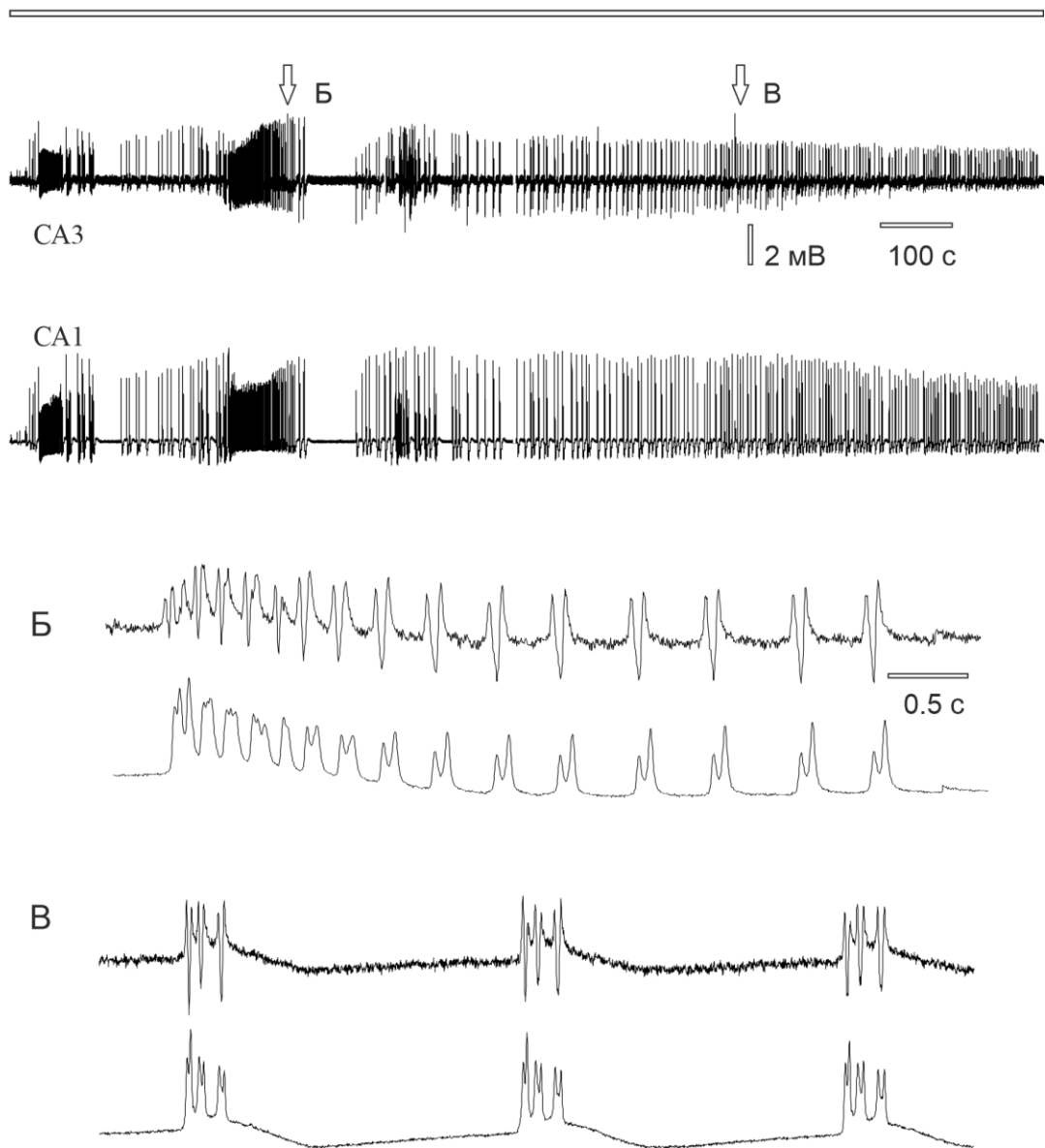
4-амінопіридин (4-АП) є одним з найбільш відомих проконвульсантів, який викликає потужну та легко відтворювану ЕФА (рис. 2.8) [145-148]. Механізм дії 4-АП пов'язують з його здатністю блокувати потенціалкеровані калієві струми, які відіграють ключові роль у реполяризації мембрани під час потенціалу дії [148,149]. Аплікація 4-АП в концентрації 50–100 мкМ викликає виражену ЕФА в зрізах гіпокампа (рис. 2.8).

Той факт, що ГАМК-керовані канали не є мішенню дії 4-АП, дозволяє моделювати за допомогою 4-АП ЕФА в умовах інтактної системи гальмування. Це вигідно відрізняє 4-АП від більшості проконвульсантів, котрі діють за рахунок зменшення ефективності ГАМК-опосередкованого гальмування. Механізми, що лежать в основі 4-АП-індукованих епілептиформних подій, досі не є остаточно зрозумілими, тим не менш, 4-АП-індукована активність залишається корисною та поширеною моделлю для дослідження патологічних процесів, пов'язаних з епілептичними станами [145, 146, 150].

Оскільки 4-амінопіридин є одним з найбільш ефективних проконвульсантів *in vitro*, дана модель також використовувалась для перевірки «життєздатності» свіжоізолюваних зрізів, тобто зрізи вважались непридатними для дослідження несинаптичної активності, якщо в зрізах не вдавалось викликати 4-АП-індуковану ЕФА.

A

4-АП 100 мкМ

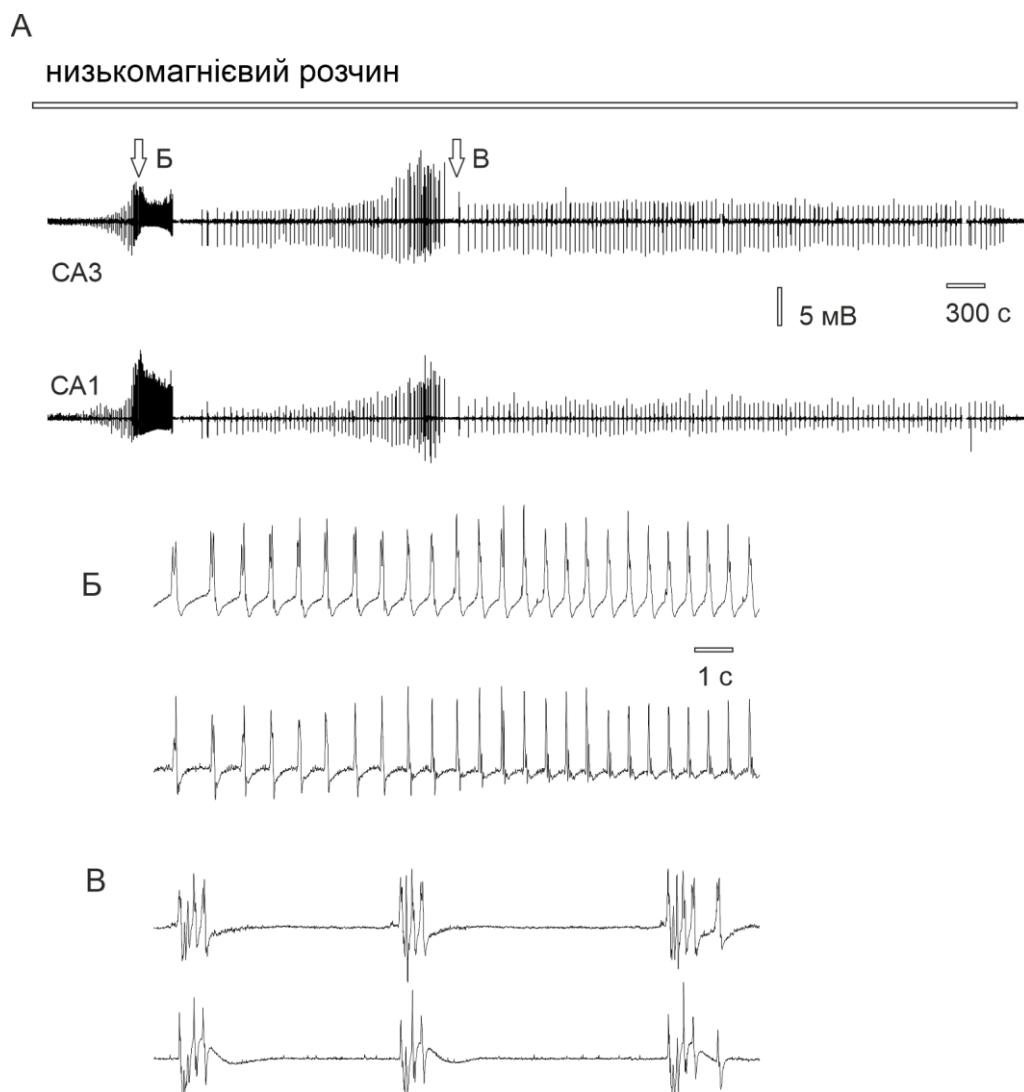


**Рис. 2.8. Приклад ЕФА індукованої 4-амінопіридином. А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах СА3–СА1 гіпокампа під час суперфузії зрізу шСМР з 4-АП. Б) Високочастотна іктоподібна активність. В) Ритмічні епілептиформні спайки.**

Для індукції 4-АП-індукованої ЕФА використовувався наступний розчин шСМР (мМ) – NaCl 115, KCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 1.0, MgCl<sub>2</sub> 1.3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 24, глюкоза 11; перед початком експериментів додавали 100 мкМ 4-амінопіридин (4-АП).

### 2.5.3 Індукція ЕФА у низькомагнієвому розчині

Низькомагнієва модель індукції ЕФА є, вірогідно, найбільш поширеною *in vitro*-моделлю епілепсії, а також епілептогенезу [151-156]. Викликана у низькомагнієвому середовищі ЕФА розвивається поступово та має тривалий латентний період розвитку (20–40 хв, рис.2.9).



**Рис. 2.9. Приклад ЕФА індукованої в низькомагнієвому середовищі. А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах гіпокампа СА3–СА1 під час суперфузії зрізу шСМР з низьким вмістом магнію. Б) Високочастотна іктоподібна активність, В) ритмічна ЕФА.**

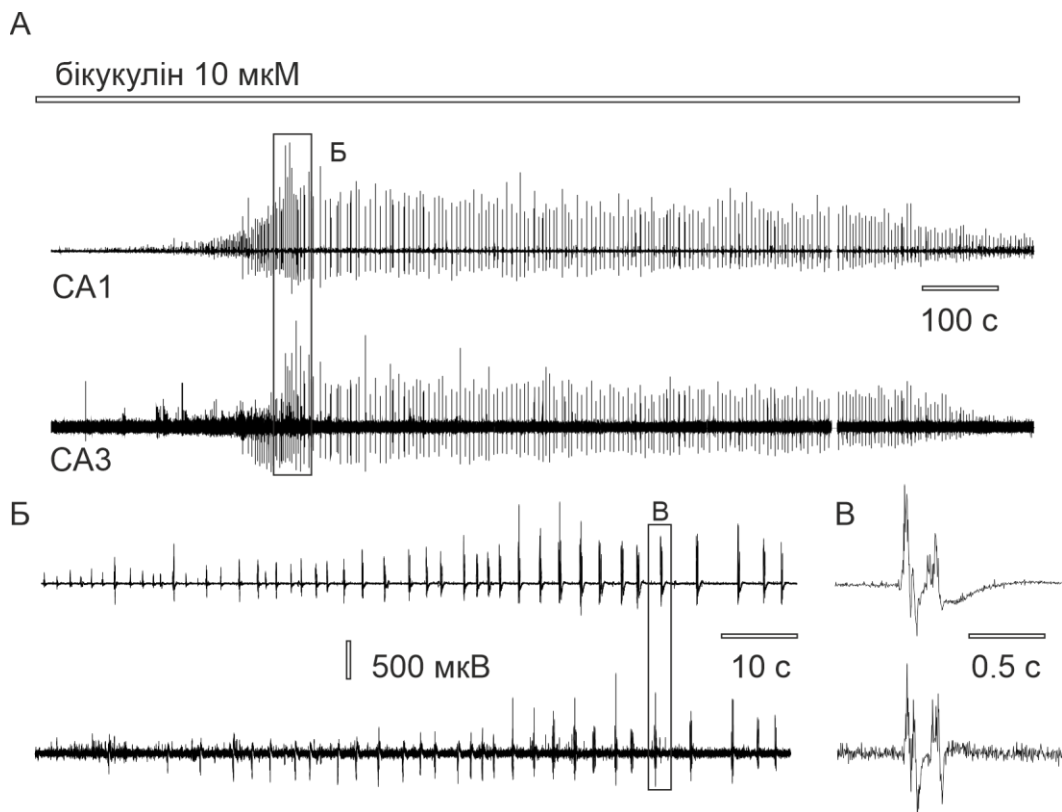
Через годину після початку польових розрядів низькомагнієва ЕФА стає нечутливою до дії бензодіазепінів, що є важливою характеристикою цієї моделі епілепсії [157, 158]. Параметрами, за допомогою яких оцінюють ефективність протиепілептичних агентів в цій моделі, є тривалість, частота та амплітуда епілептичних подій. Також, за допомогою цієї моделі вивчається здатність речовин запобігати розвитку ЕФА в першу годину суперфузії низькомагнієвим розчином та здатність речовин гальмувати ЕФА після першої години реєстрації польових потенціалів [156, 158].

Механізм розвитку ЕФА у низькомагнієвому середовищі пов'язують з двома основними чинниками: НМДА фасилітацією та зменшенням екранування поверхневого заряду [122, 124, 156]. Вважається, що у низькомагнієвому середовищі іони магнію, що блокують пору НМДА-каналів, вивільняються і, таким чином, прискорюють активацію цих рецепторів.

Для індукції низькомагнієвої ЕФА використовувався наступний розчин шСМР (мМ) – *NaCl 115, KCl 5.0, CaCl<sub>2</sub> 1.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 24, глюкоза 11.*

#### ***2.5.4 Індукція ЕФА в розчині з бікукуліном***

Бікукулін – конкурентний антагоніст ГАМК<sub>A</sub> рецепторів, що широко застосовується в дослідженні епілепсії та судомних нападів. В експериментах *in vitro* бікукулін використовується для фармакологічної блокади ГАМКергічної синаптичної передачі [160-162]. Аплікація бікукуліном викликає характерну ритмічну ЕФА в зонах СА3 та СА1 гіпокампа (рис. 2.10).



**Рис. 2.10.** Приклад бікукулініндукованої ЕФА А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах СА3–СА1 під час суперфузії бікукулінвмісним шСМР. Б) Збільшене зображення епілептиформних явищ та В) окремий польовий розряд.

Для індукції ЕФА бікукуліном використовували наступний розчин шСМР (мМ) –  $NaCl$  115,  $KCl$  5.0,  $CaCl_2$  1.0,  $MgCl_2$  1.3,  $NaH_2PO_4$  1.25,  $NaHCO_3$  24, глюкоза 11; перед початком експериментів додавали 10 мкМ бікукулін.

### ***2.5.5 Модуляція епілептиформної активності нейронних мереж гіпокампа шляхом змін хімічного складу штучної спинномозкової рідини***

Методика реєстрації позаклітинних потенціалів *in vitro* дозволяє досліджувати вплив компонентів позаклітинного середовища на збудливість гіпокампальної мережі [87, 98, 163, 164]. Це має особливо критичне значення під час дослідження синхронізації активності нейронів гіпокампа у несинаптичних умовах, оскільки за відсутності синаптичної передачі вплив несинаптичних

факторів (осмолярності позаклітинного середовища, екранування поверхневого заряду на мембрані і т.і.) стає значно більш помітним [98, 122].

Так, в розчинах для індукції ЕФА концентрація калію було збільшено до 5 мМ (порівняно з 3.5 мМ у стандартному, контрольному розчині шСМР) для уповільнення процесів реполяризації. Концентрацію натрію у проепілептичних розчинах було зменшено до 115–100 мМ (порівняно з 125 мМ у стандартному розчині шСМР), з метою зниження осмолярності позаклітинного розчину, як наслідок, збільшення опору позаклітинного середовища за рахунок зменшення його відносного об'єму. Концентрацію кальцію було зменшено до 1мМ у кадмійвмісному розчині з метою зменшення екранування поверхневого заряду двовалентними катіонами. Низькокальцієвий розчин готувався без додавання солей кальцію та не містив хелаторів кальцію. Зміни у концентрації іонів магнію використовували для дослідження впливу екранування поверхневого заряду двовалентними катіонами у несинаптичних моделях епілептиформної синхронізації. Також для збільшення збудливості мережі гіпокампа розчин шСМР с антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК- рецепторів не містив солей магнію.

### ***2.5.6 Використані хімічні речовини***

Всі хімічні реактиви, використані в даній роботі для приготування розчинів шСМР, було виготовлено фірмою Sigma (Сент-Луїс, США) або Tocris (Бристоль, Велика Британія).

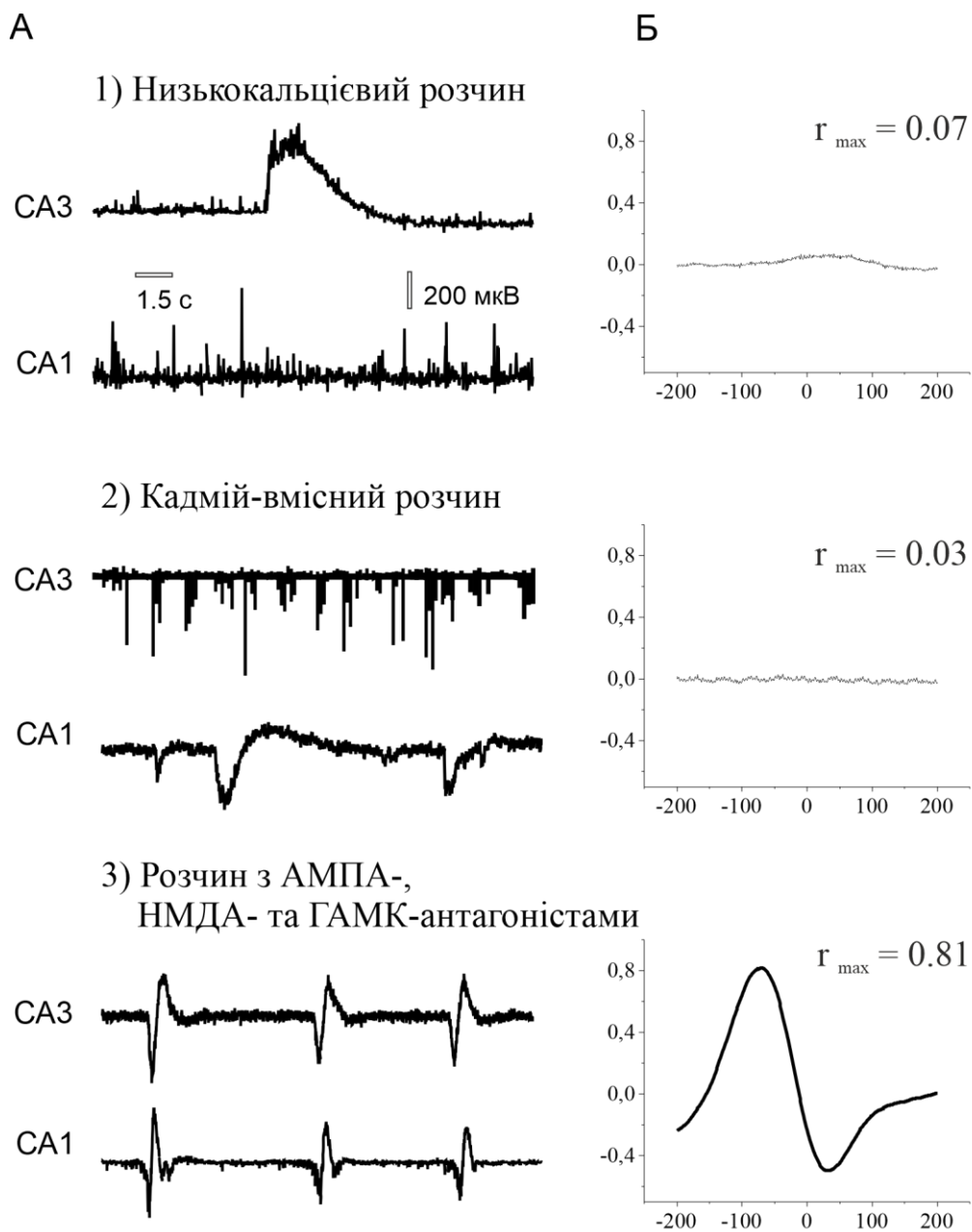
## **2.6 Статистичний аналіз даних**

Обробка та аналіз результатів проводились з використанням наступних програм: Clampfit (Axon Instruments, США), MiniAnalysis (Synaptosoft, version 6.0.7 США), Origin (OriginLab, version 7.0 США), GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, США), Minitab 17 (Minitab, LLC США). Представлення графічних даних та ілюстрацій було виконано за допомогою програми CorelDraw

X4 (Corel Corporation, Канада). Аналіз вибірок включав визначення середнього, стандартного відхилення (середнє квадратичне) та стандартної похибки середнього. Для перевірки гіпотези щодо відповідності розподілу емпіричних даних нормальному закону було застосовано критерій Шапіро-Уїлка. Для визначення статистичної вірогідності міжгрупових різниць було застосовано парний та непарний  $t$ -тест Ст'юдента, дисперсійний аналіз ANOVA, а також тест Колмогорова-Смирнова та парний тест Уїлкоксона. Результати представлені як середні значення  $\pm$  стандартне відхилення (s.d., середнє квадратичне).

Рівень синхронізації ЕФА в зонах CA1 та CA3 оцінювали за допомогою крос-кореляційного аналізу [113, 165-167]. Побудову функції крос-кореляції було застосовано для визначення рівня синхронізації ЕФА, відведеної двома електродами, котрі розташовувалися в зонах гіпокампа CA3 та CA1 [167]. Для крос-кореляційного аналізу брали сегменти одночасної реєстрації польових потенціалів в зонах CA3 та CA1 тривалістю 10–15 хвилин. Спочатку записи обробляли з використанням електронного фільтра Гауса (фільтра нижніх частот, 50 Гц). Далі за допомогою програм Clampfit або Minitab вираховували крос-кореляційну функцію для двох одночасних реєстрацій польових потенціалів у вказаних зонах гіпокампа (рис. 2.11). Для зменшення впливу рівня шуму на результати аналізу крос-кореляційні функції було оброблено за допомогою згладжувача LOWESS (*Locally Weighted Scatter plot Smoothing*) [168]. Максимум крос-кореляційної функції (*коефіцієнт крос-кореляції*) характеризував рівень синхронізації ЕФА між зонами CA3 та CA1 (рис. 2.11 Б). Результати представлені як середні значення коефіцієнтів крос-кореляції  $\pm$  стандартне відхилення (s.d.).





**Рис. 2.11. Крос-кореляційний аналіз. А) Приклади одночасної реєстрації ЕФА в зонах СА3 та СА1 гіпокампа в низькокальцієвому шСМР (1), кадмійвмісному (2) та розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами (3). Б) крос-кореляційні функції, що відповідають зображенням на (А) фрагментам ЕФА, де  $r_{\max}$  – значення максимуму крос-кореляційної функції, характеризує рівень СА3–СА1-синхронізації ЕФА в гіпокампі.**

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

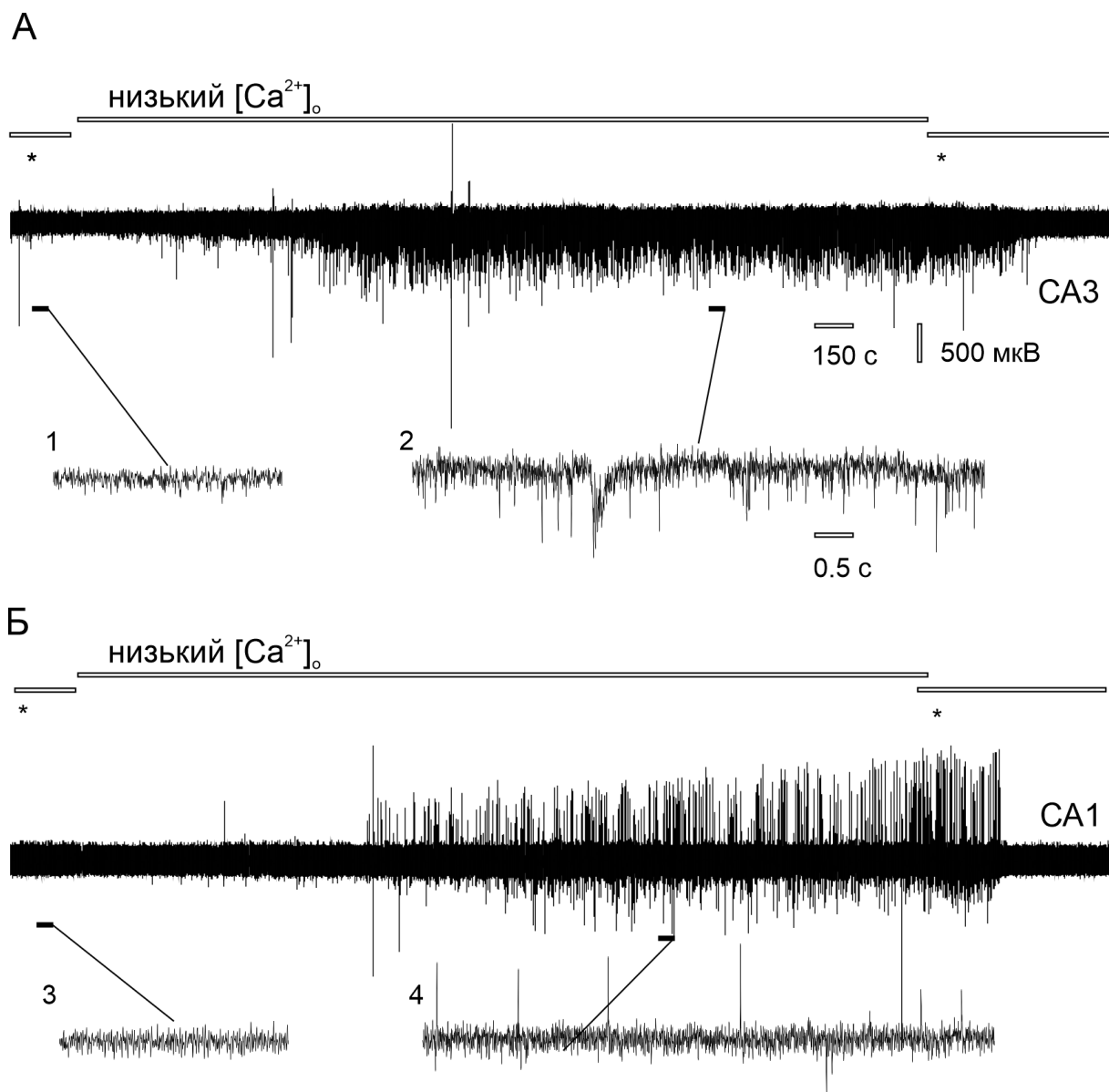
#### 3.1 Епілептиформна активність гіпокампа в несинаптичних умовах

##### *3.1.1 Епілептиформна активність гіпокампа в низькокальцієвому розчині*

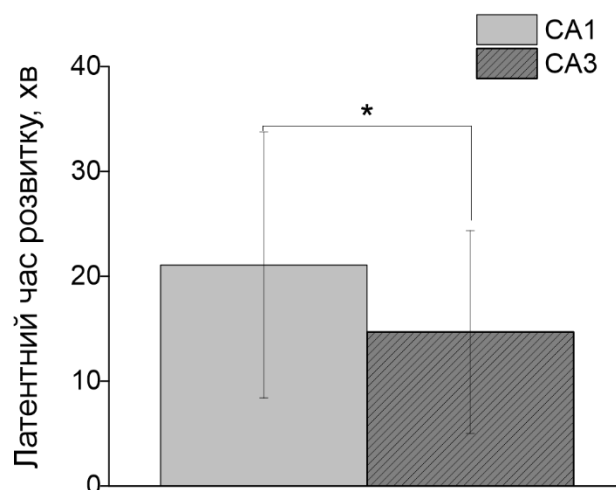
Суперфузія зрізів гіпокампа низькокальцієвою шСМР призводила до появи ЕФА в ділянках гіпокампа СА1 та СА3 ( $n = 31$ ; рис. 3.1). Під час суперфузії зрізів низькокальцієвим розчином, електрографічним корелятом ЕФА були, переважно, популяційні спайки (рис. 3.1 Б).

Латентний період розвитку ЕФА визначали як тривалість часу від початку суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвою шСМР і до появи перших корелят ЕФА. Несинаптична ЕФА в низькокальцієвому розчині розвивалась в зоні СА3 швидше, ніж така в СА1. Середнє значення латентного періоду розвитку ЕФА в СА1 складало  $21.08 \pm 12.68$  хв ( $n = 31$ ), а в СА3 –  $14.68 \pm 9.68$  хв ( $n = 29$ ,  $p = 0.03$ ; рис. 3.2).

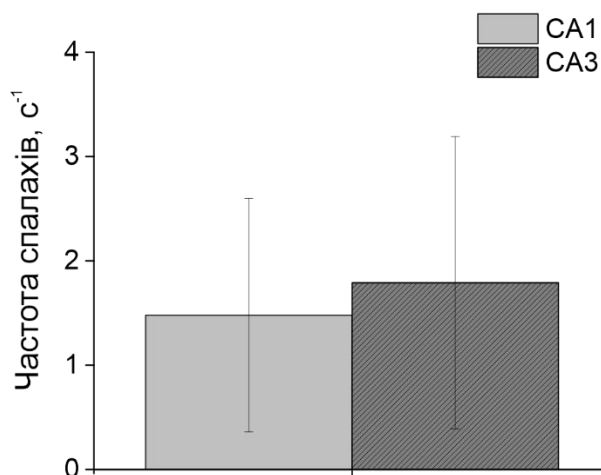
Під час суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвою шСМР частота популяційних спайків в ділянці СА1 не відрізнялась значуще від аналогічної частоти в СА3. Так, у зоні СА1 середнє значення частоти популяційних спайків складало  $1.48 \pm 1.12$  с<sup>-1</sup> ( $n = 31$ ), а в зоні СА3 –  $1.79 \pm 1.40$  с<sup>-1</sup> ( $n = 17$ ,  $p = 0.41$ ; рис. 3.3).



**Рис. 3.1.** Одночасна реєстрація польових потенціалів у зонах CA3 (А) та CA1 (Б) гіпокампа під час суперфузії зрізів контрольним розчином (\*) та низькокальцієвим розчином. 1) Запис позаклітинного потенціалу в CA1 в контрольних умовах («базова лінія»); 2) несинаптична ЕФА – популяційні спайки в CA3; 3) відсутність ЕФА в CA1 під час суперфузії контрольним розчином, 4) несинаптична ЕФА – популяційні спайки в CA1.



**Рис. 3.2.** Усереднені значення латентного періоду розвитку ЕФА в СА1 ( $n = 31$ ) та СА3 ( $n = 29$ ,  $p = 0.03$ ) під час суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим розчином.



**Рис. 3.3.** Усереднені значення частоти популяційних спайків в зонах СА1 ( $n = 31$ ) та СА3 ( $n = 17$ ,  $p = 0.41$ ) гіпокампа під час суперфузії зрізів низькокальцієвою шСМР.

Додатковим проявом ЕФА в низькокальцієвому розчині були сплески популяційних спайків (рис. 3.4 А), а також зсуви позаклітинного потенціалу –

«повільні хвилі» (рис. 3.4 В). Середнє значення частоти повільних хвиль потенціалу складало  $0.02 \pm 0.001 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 10$ ).

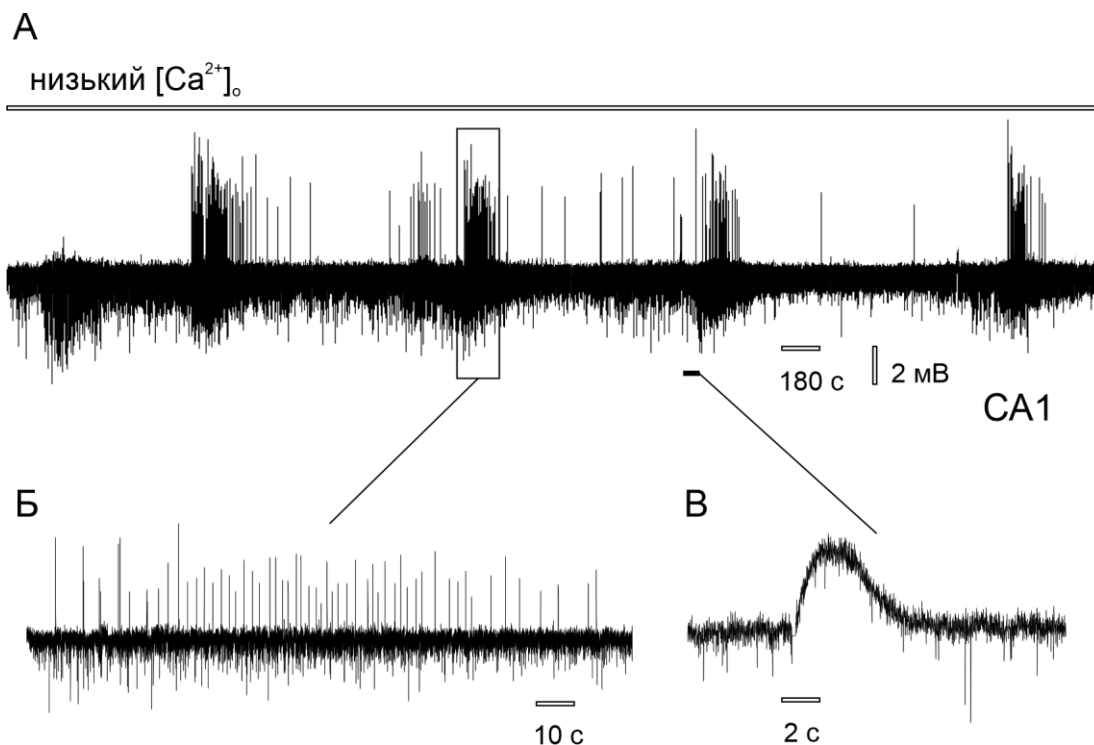
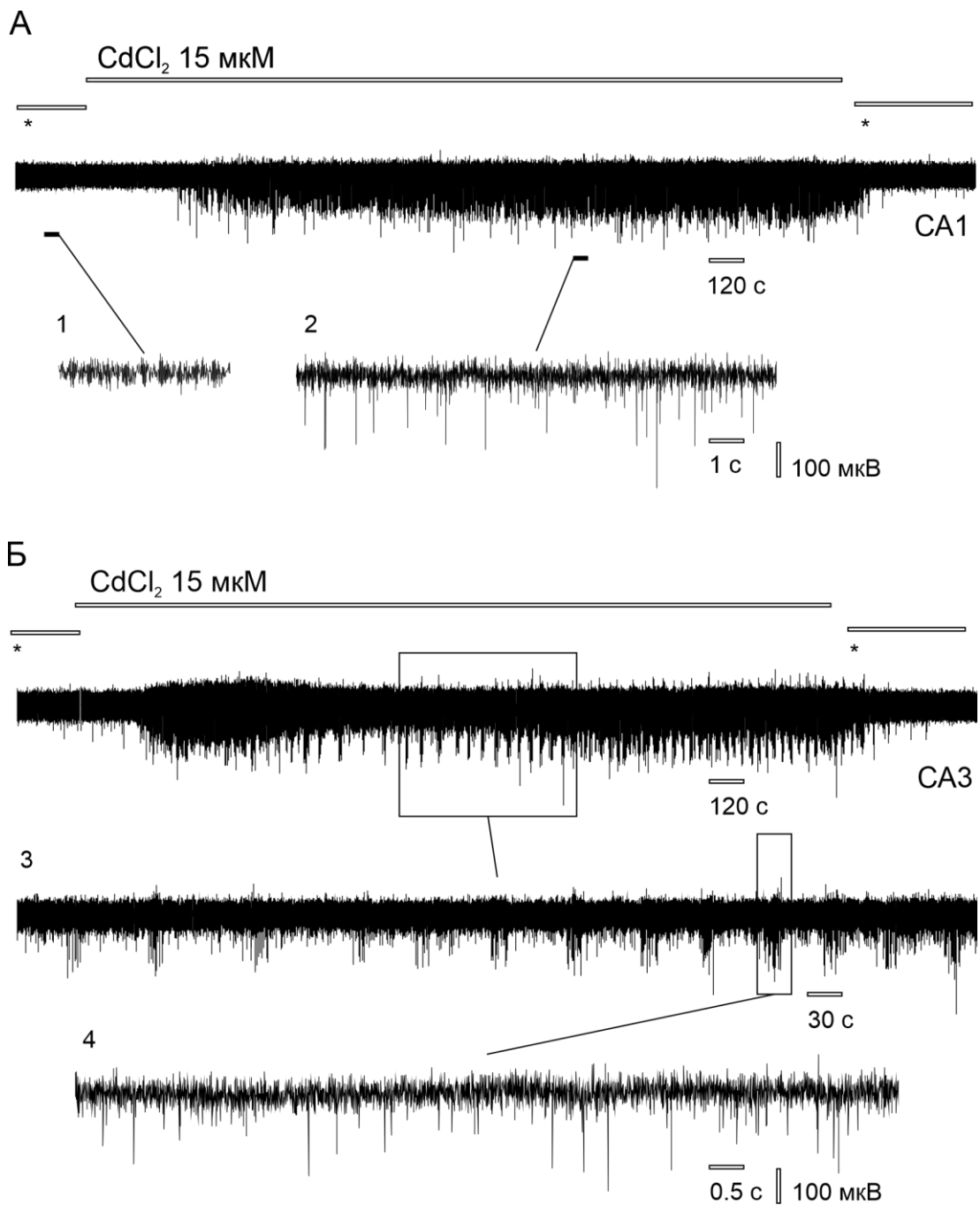


Рис. 3.4. Ритмічна ЕФА в низькокальцієвому шСМР. А) Сплески ЕФА в низькокальцієвому розчині, Б) популяційні спайки всередині сплеску, В) зсув позаклітинного потенціалу «повільна хвиля».

### *3.1.2 Епілептиформна активність гіпокампа в кадмійвмісному розчині*

Наявність іонів кадмію в позаклітинному розчині справляє антагоністичну дію на кальцієві канали. В даній роботі кадмійвмісний розчин ( $\text{CdCl}_2$  15  $\mu\text{M}$ ) було обрано для дослідження несинаптичної ЕФА в гіпокампі, але в умовах наявності у позаклітинному середовищі іонів кальцію ( $\text{CaCl}_2$  1  $\text{mM}$ ).

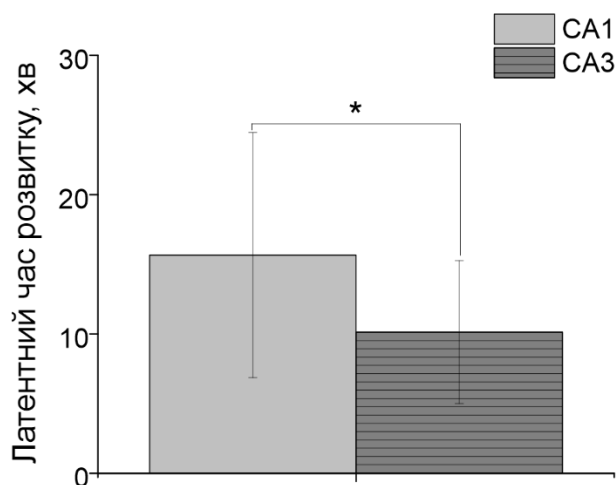
Суперфузія зрізів гіпокампа кадмійвмісним розчином призводила до появи ЕФА в ділянках CA1 та CA3 ( $n = 15$ , рис. 3.5).



**Рис. 3.5.** Польові потенціали в зонах CA1 (А) та CA3 (Б) під час суперфузії зрізів гіпокампа контрольним (\*) та кадмійвмісним розчинами. 1) Позаклітинний потенціал в контрольних умовах; 2) несинаптична ЕФА – популяційні спайки в CA1. 3) Повторювані сплески ЕФА в CA3; 4) популяційні спайки всередині сплеску.

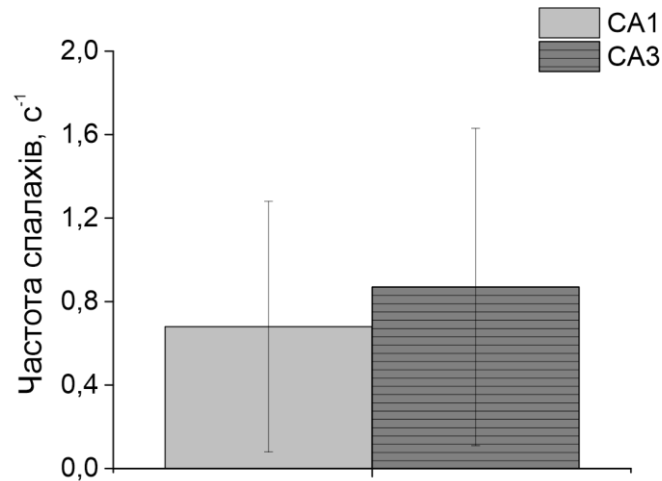
Подібно до ЕФА індукованої в низькокальцієвому середовищі, основним проявом синхронізованої активності нейронів в кадмійвмісному розчині була поява популяційних спайків (рис. 3.5-2,4).

Тривалість латентного періоду розвитку ЕФА в кадмійвмісному розчині була менше в зоні СА3 ніж в СА1. Так, в ділянці СА3 несинаптична ЕФА розвивалась в середньому за  $10.14 \pm 5.13$  хв ( $n = 14$ ), а в СА1 – за  $15.66 \pm 8.80$  хв ( $n = 15$ ,  $p = 0.05$ ; рис. 3.6).



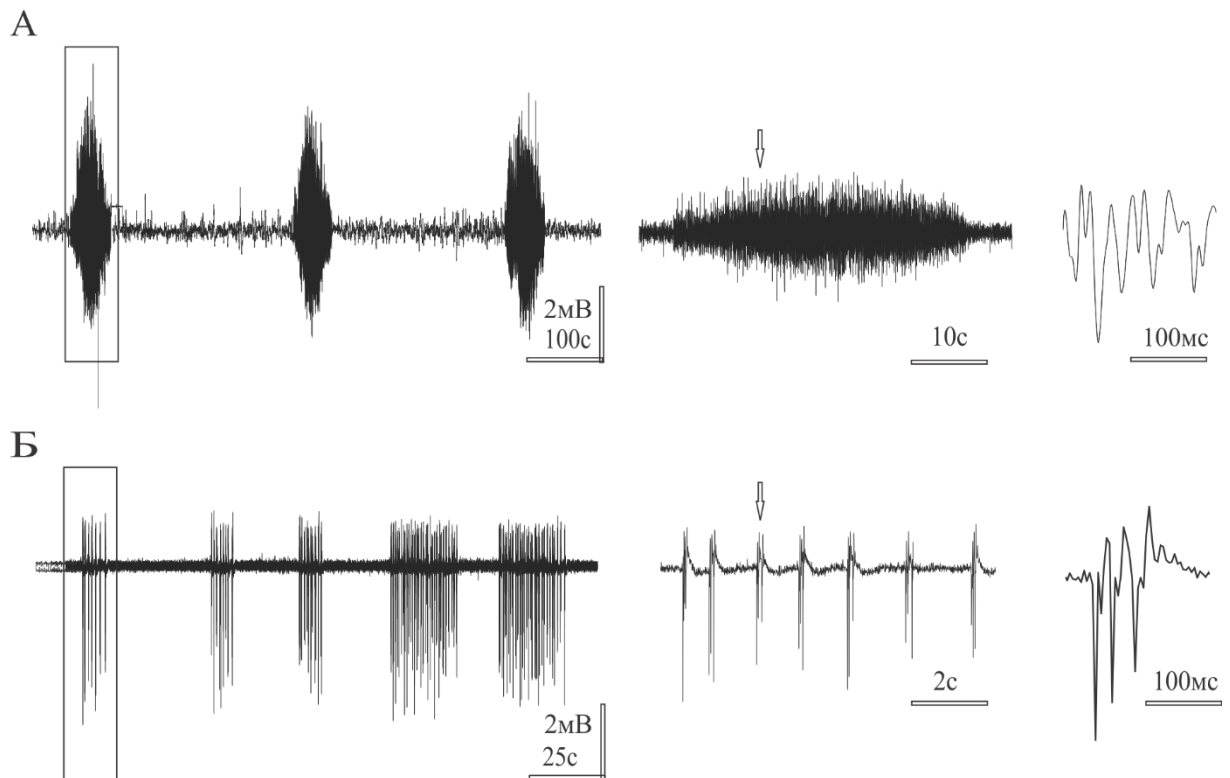
**Рис. 3.6.** Усреднені значення латентного періоду розвитку ЕФА в ділянках СА1 ( $n = 15$ ) та СА3 ( $n = 14$ ) під час суперфузії зрізів гіпокампа кадмійвмісним розчином ; \* позначено  $p \leq 0.05$ .

Під час суперфузії зрізів гіпокампа кадмійвмісним розчином частота популяційних спайків в СА1 не відрізнялась статистично значуще від аналогічної частоти в СА3. Так, в зоні СА1 середнє значення частоти популяційних спайків складало  $0.68 \pm 0.6$   $s^{-1}$  ( $n = 13$ ); а в СА3 –  $0.87 \pm 0.76$   $s^{-1}$  ( $n = 14$ ,  $p = 0.47$ ; рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Сукупні дані частоти популяційних спайків в ділянках CA1 ( $n = 13$ ) та CA3 ( $n = 14$ ,  $p = 0.47$ ) під час суперфузії зрізів гіпокампа кадмійвмісним розчином шСМР.

ЕФА, індукована в кадмійвмісному розчині (популяційні спайки), також формували повторювані сплески епілептиформних подій (рис. 3.8), також подібні до тих, що спостерігались в низькокальцієвому середовищі.





**Рис. 3.8. Типи сплесків епілептиформної активності в СА3 (А) та СА1 (Б) під час суперфузії кадмійвмісним розчином шСМР.**

Отже, отримані дані вказують на те, що ЕФА індукована шляхом суперфузії зрізів кадмійвмісною шСМР є аналогічною до активності, яка виникає під час суперфузії низькокальцієвим розчином. Таким чином, відсутність іонів кальцію у позаклітинному середовищі є достатньою, але не є необхідною умовою для індукції несинаптичної ЕФА в ділянках гіпокампа СА3 та СА1 *in vitro*.

***3.1.3 Порівняння електрографічних характеристик епілептиформної активності в низькокальцієвому та кадмійвмісному середовищі***

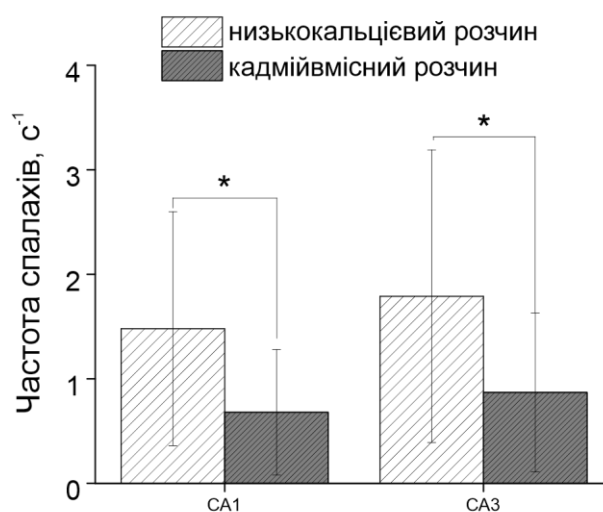
Порівняння характеристик ЕФА, індукованої в умовах низької концентрації позаклітинного кальцію та кадмійвмісному розчині, дозволило оцінити роль позаклітинного кальцію в генерації несинаптичної синхронізації активності нейронів гіпокампа в ділянках СА3 та СА1.

Так, порівняння середнього значення латентного періоду розвитку ЕФА в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах не виявило статистично значущих відмінностей між цими умовами індукції, однак в обох моделях цей показник був достовірно менше в ділянці СА3 ніж аналогічне значення в СА1 (рис. 3.2, 3.6).

Як в низькокальцієвому, так і в кадмійвмісному розчині, основним проявом ЕФА були популяційні спайки (рис. 3.1, 3.5) Також, як було наведено вище, в обох моделях несинаптичної активності не було виявлено достовірної різниці між середнім значенням частоти популяційних спайків в зоні СА3 порівняно з аналогічною частотою в СА1 (рис. 3.3, рис. 3.7).

Проте, порівняння частоти популяційних спайків ЕФА в умовах повної блокади синаптичної передачі, показало, що як в ділянці СА3, так і в СА1, частота

популяційних спайків в середньому є вищою в низькокальцієвому розчині порівняно з аналогічною частотою у кадмійвмісній шСМР (рис.3.9). Так, в зоні СА1 частота спайків ЕФА в низькокальцієвому розчині складала  $1.48 \pm 1.22 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 31$ ), а в кадмійвмісному –  $0.68 \pm 0.6 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 13$ ,  $p = 0.02$ ; рис.3.9). В зоні СА3 частота спайків в низькокальцієвому розчині складала  $1.79 \pm 1.14 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 17$ ), а в кадмійвмісному –  $0.87 \pm 0.76 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 13$ ,  $p = 0.02$ ; рис. 3.9), тобто була втричі вищою.



**Рис. 3.9.** Діаграма середніх частот популяційних спайків в ділянках СА1 та СА3 під час суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим та кадмійвмісним розчинами. При міжгруповому порівнянні  $p = 0.02$  та  $p = 0.01$  відповідно.

Отже, порівняння характеристик ЕФА, індукованої в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах, показало, що в несинаптичних умовах ділянки СА3 та СА1 гіпокампа продукують подібний патерн епілептиформної синхронізації активності нейронів – популяційні спайки. В обох зонах гіпокампа середнє значення частоти популяційних спайків в низькокальцієвому розчині є вищим порівняно з таким у кадмійвмісному розчині; проте середнє значення латентного періоду розвитку ЕФА не відрізняється значуще між цими двома несинаптичними умовами. Таким чином, наведені результати вказують на подібність характеру

ЕФА, що виникає в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа в умовах повної блокади синаптичної передачі.

### 3.2 Вплив преінкубації зрізів гіпокампа у 4-АП-вмісному розчині на розвиток несинаптичної епілептиформної активності

Метою наступних експериментів було визначити вплив преінкубації зрізів гіпокампа з 4-АП на тривалість латентного періоду розвитку несинаптичної ЕФА в низькокальцієвому розчині (рис. 3.10).

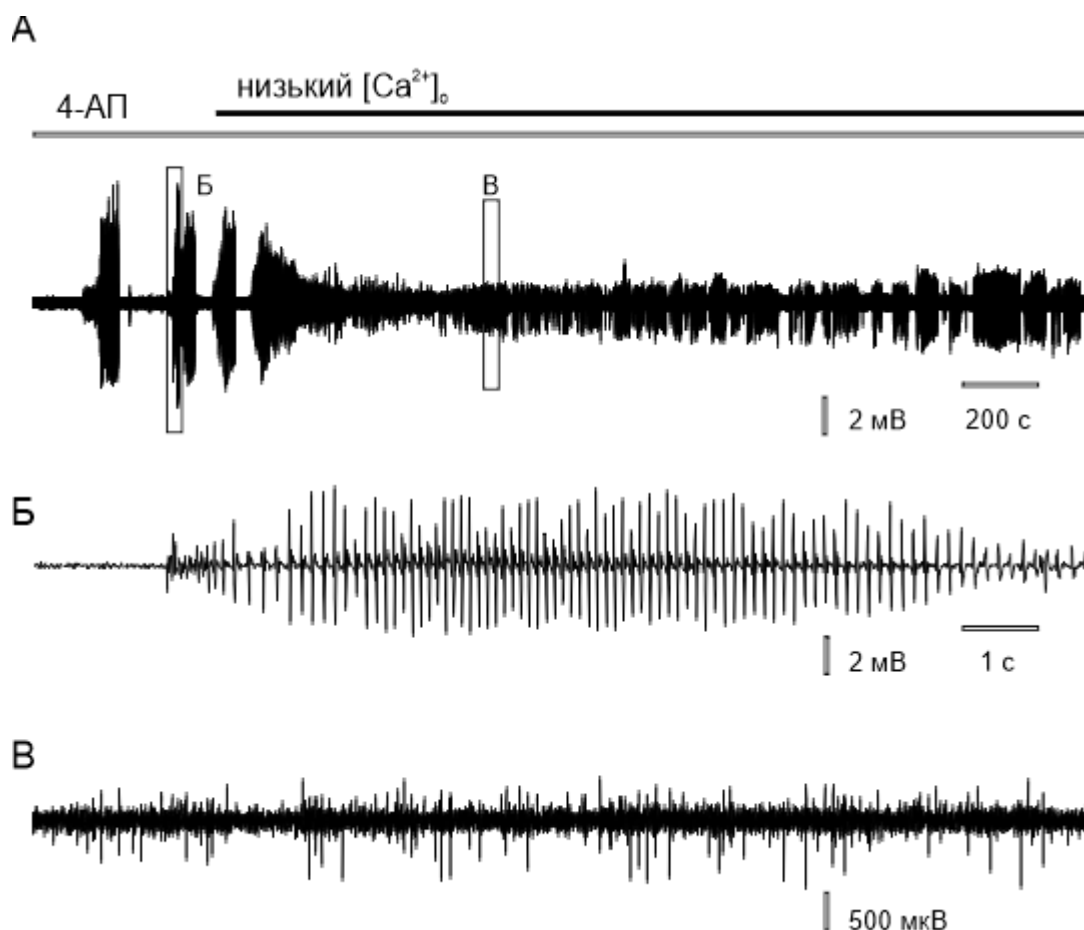
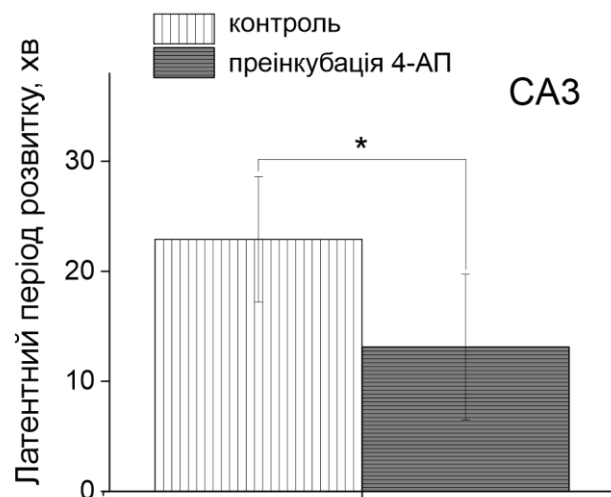


Рис. 3.10. Розвиток несинаптичної ЕФА та тлі 4-АП-індукованої активності. А) Польові потенціали в зоні СА1 гіпокампа під час суперфузії 4-АП-вмісним та низькокальцієвим розчином, Б) сплеск високочастотної ЕФА викликаної 4-АП; В) популяційні спайки в низькокальцієвому+4-АП розчині.

Перед початком індукції несинаптичної ЕФА, зрізи гіпокампа протягом двадцяти хвилин суперфузували шСМР, котра містила 100 мкМ 4-АП (рис. 3.10). Контрольні зрізи перед початком індукції несинаптичної ЕФА протягом 20 хвилин суперфузували стандартним розчином шСМР. В даних експериментах використовували низькокальцієвий розчини шСМР з вмістом натрію хлориду 125 мМ. Після початку суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвою шСМР характерна для 4-АР ритмічна високочастотна ЕФА (рис. 3.10 Б) поступово згасала та на її місці з'являлись несинаптичні популяційні спайки (рис. 3.10 В).

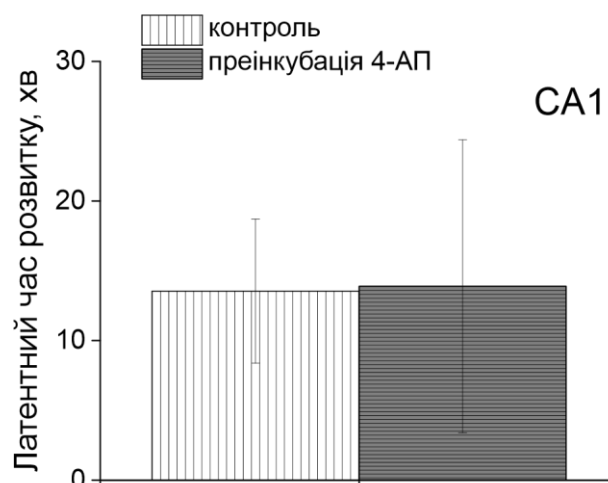
В даних експериментах латентний період розвитку несинаптичної ЕФА визначався як тривалість часу від початку суперфузії низькокальцієвим розчином і до появи чітко помітних на фоні базової лінії популяційних спайків на тлі пригнічення 4-АП-індукованої ЕФА (рис. 3.10 В).

В контрольних умовах латентний період розвитку несинаптичної активності в зоні СА3 становив  $22.9 \pm 5.69$  хв ( $n = 5$ ), а в групі з преінкубацією 4-АП цей показник зменшився та становив  $13.12 \pm 6.62$  хв ( $n = 8, p = 0.02$ , рис. 3.11).



**Рис. 3.11.** Усреднені значення латентного періоду розвитку несинаптичної ЕФА в зоні СА3, в контрольних умовах (низькокальцієвий розчин,  $n = 5$ ) та після преінкубації зрізів мозку з 4-АП ( $n = 8, p = 0.02$ ).

В зоні CA1 латентний період розвитку несинаптичної ЕФА в контрольних умовах становив  $13.54 \pm 5.15$  хв ( $n = 8$ ), проте, в групі з преінкубацією 4-АП цей показник значуще не змінився та становив  $13.89 \pm 3.70$  хв ( $n = 8$ ,  $p = 0.66$ ; рис. 3.12).



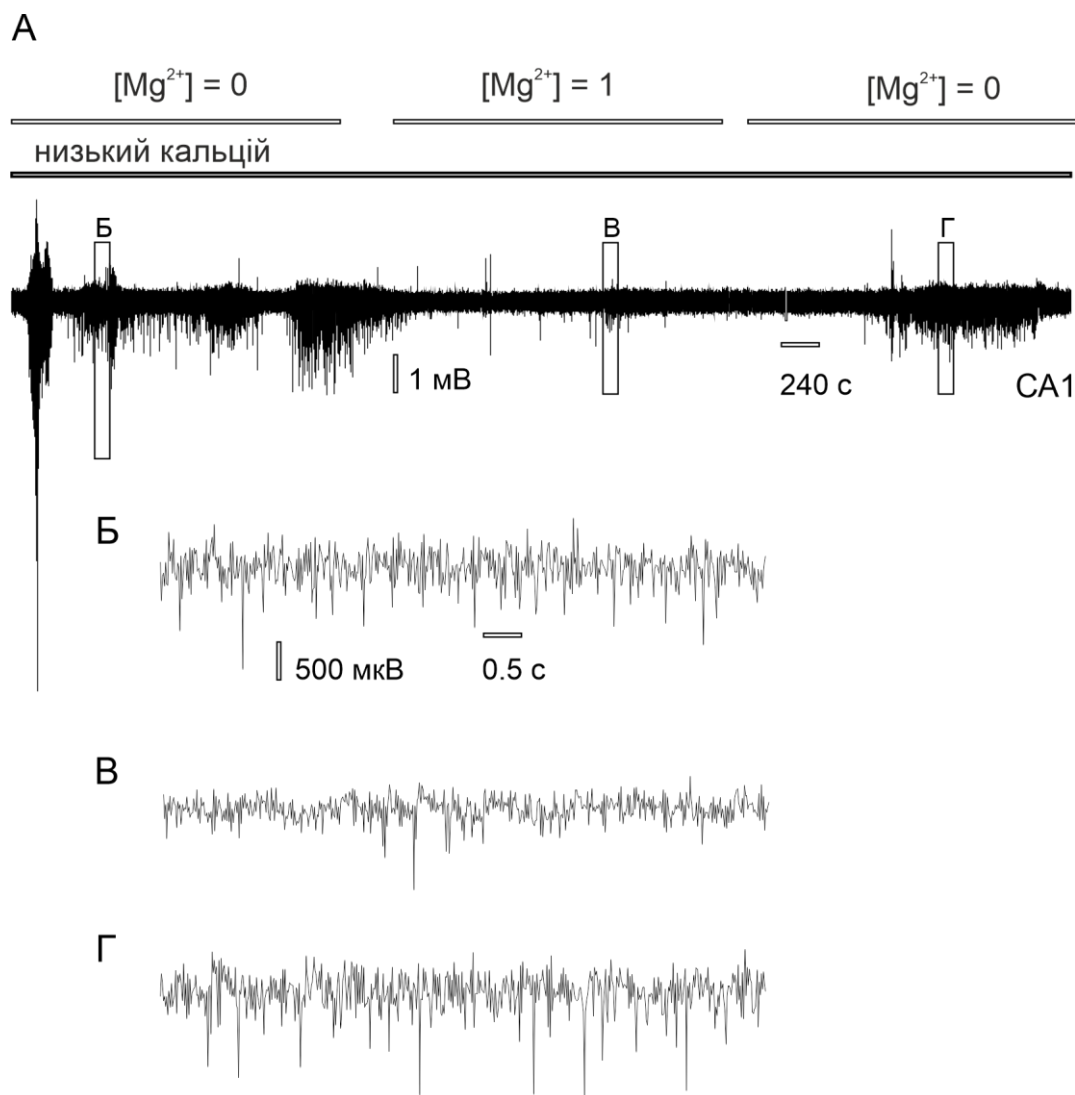
**Рис. 3.12.** Усереднені значення латентного періоду розвитку несинаптичної ЕФА в зоні CA1 гіпокампа в контрольних умовах (низькокальцієвий розчин,  $n = 8$ ) та після преінкубації зрізів мозку з 4-АП ( $n = 8$ ,  $p = 0.66$ ).

Отже, наведені результати вказують на те, що 4-АП-індукована ЕФА призводить до зменшення латентного періоду розвитку несинаптичної ЕФА в зоні CA3, але в зоні CA1 такого ефекту не спостерігається.

### **3.3 Вплив зміни позаклітинної концентрації магнію на несинаптичну епілептиформну активність у низькокальцієвому розчині**

Відомо, що зміни у позаклітинній концентрації двовалентних катіонів здатні істотно впливати на збудливість нейронних мембран. Основним механізмом цього впливу є екранування негативного поверхневого заряду на поверхні мембрани.

В наступних експериментах було досліджено вплив підвищення позаклітинної концентрації іонів магнію на інтенсивність ЕФА, яка виникала в низькокальцієвому розчині (рис. 3.13).

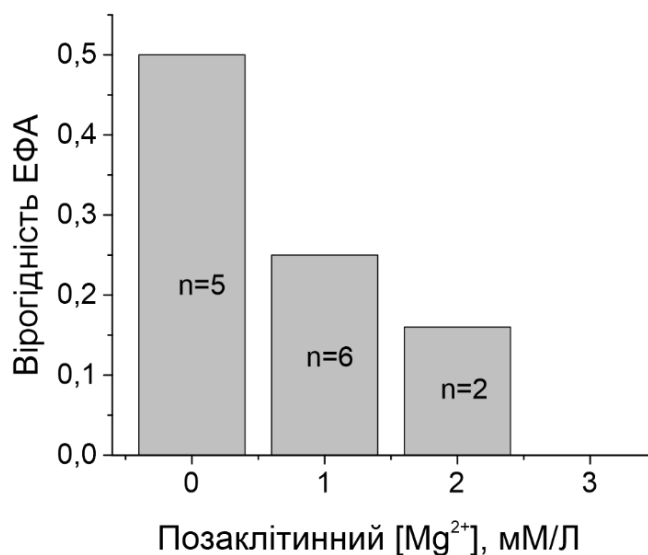


**Рис. 3.13.** Вплив зміни позаклітинної концентрації магнію на інтенсивність несинаптичної ЕФА. А) ЕФА в зоні CA1 гіпокампа викликана шляхом усунення кальцію із позаклітинного розчину; горизонтальні риси позначають позаклітинну концентрацію магнію в шСМР у відповідні періоди реєстрації. Б) Популяційні спайки підчас суперфузії шСМР з низьким вмістом кальцію та магнію; В) пригнічення популяційних спайків під час збільшення концентрації магнію до 1мМ в позаклітинному розчині; Г)

**відновлення несинаптичної ЕФА в розчині з низьким вмістом кальцію та магнію.**

В даних експериментах несинаптичної ЕФА спочатку було індуковано в розчині з низьким вмістом кальцію та магнію, далі концентрацію магнію збільшували до 1мМ (рис. 3.13 А). В наших експериментах цього було достатньо, щоб припинити генерацію несинаптичної ЕФА (рис. 3.13 В). Відновлення суперфузії зрізів розчином з низьким вмістом кальцію та магнію призводило до відновлення несинаптичної ЕФА (рис. 3.13 Г).

В наступних експериментах було досліджено вплив позаклітинної концентрації магнію на вірогідність індукції несинаптичної ЕФА в низькокальцієвому розчині шСМР. Так, під час суперфузії зрізів гіпокампа шСМР із низьким вмістом кальцію та магнію несинаптичну ЕФА було індуковано у 50% зрізів (5/10, рис.3.14).



**Рис. 3.14. Сукупні дані індукції несинаптичної ЕФА в низькокальцієвому розчині в залежності від концентрації позаклітинного магнію.**

Наступну групу зрізів суперфузували низькокальцієвим розчином з вмістом магнію 1мМ. В таких умовах несинаптичну ЕФА було індуковано у 25% зрізів

(6/24, рис. 3.14). В наступних експериментах для індукції несинаптичної ЕФА зрізи гіпокампа суперфузували низькокальцієвим розчином шСМР з концентрацією іонів магнію 2 мМ. В таких умовах несинаптичну ЕФА було індуковано в 16% зрізів (2/12), популяційні спайки було зареєстровано лише в ділянці СА1 гіпокампа. В умовах суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим розчином з концентрацією магнію 3 мМ в жодному зрізі ( $n = 11$ ) не вдалося викликати несинаптичну ЕФА.

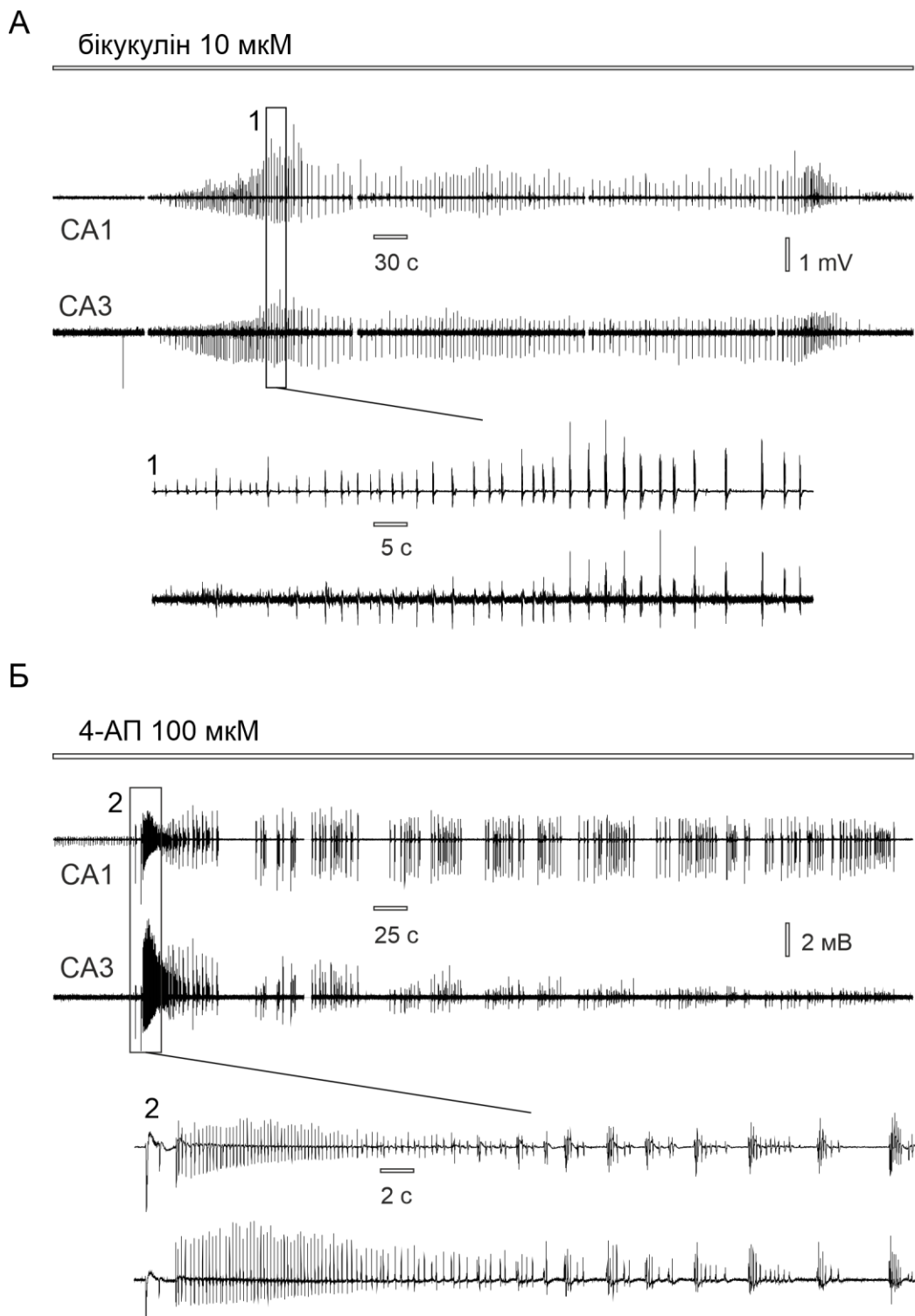
Наведені вище результати свідчать про те, що зміни в позаклітинній концентрації магнію є ефективним інструментом впливу на розвиток ЕФА в несинаптичних умовах.

### **3.4 Синхронізація епілептиформної активності в зонах СА3 та СА1 гіпокампа в синаптичних та несинаптичних умовах**

Синаптичний зв'язок є основним засобом синхронізації активності нейронних мереж гіпокампа. В *in vitro*-моделях епілепсії пригнічення гальмівної синаптичної передачі та / або підсилення глутаматергічної (збуджувальної) передачі призводить до появи довготривалої ЕФА, синхронізованої між зонами СА3 та СА1 (рис. 3.15).

В наступних експериментах рівень синхронізації польових потенціалів в ділянках СА3 та СА1 оцінювали методом крос-кореляційного аналізу. Максимум крос-кореляційної функції характеризував рівень СА3–СА1-синхронізації польових потенціалів. Було порівняно синхронізацію польових потенціалів в зонах СА3 та СА1 під час індукції ЕФА в «синаптичних умовах» (бікукулін- та 4-АП-вмісна шСМР, рис. 3.15) та несинаптичних умовах (низькокальцієвий та кадмійвмісний розчини, рис. 3.16, 3.17).

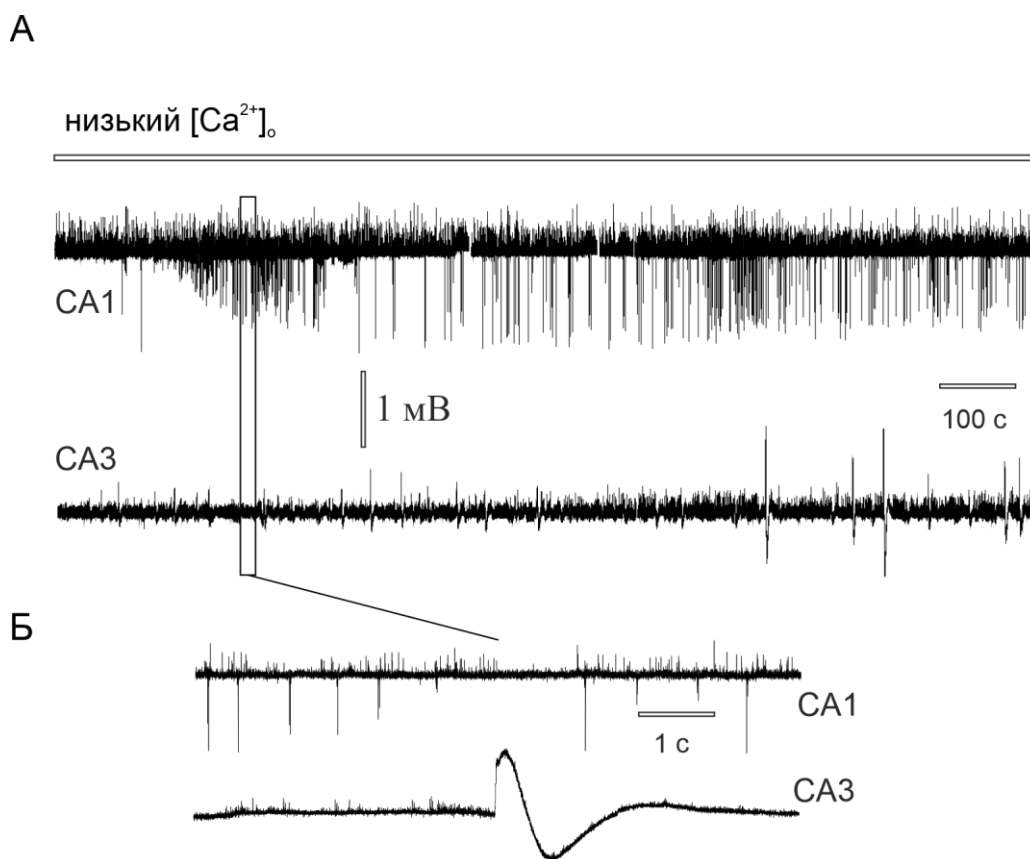




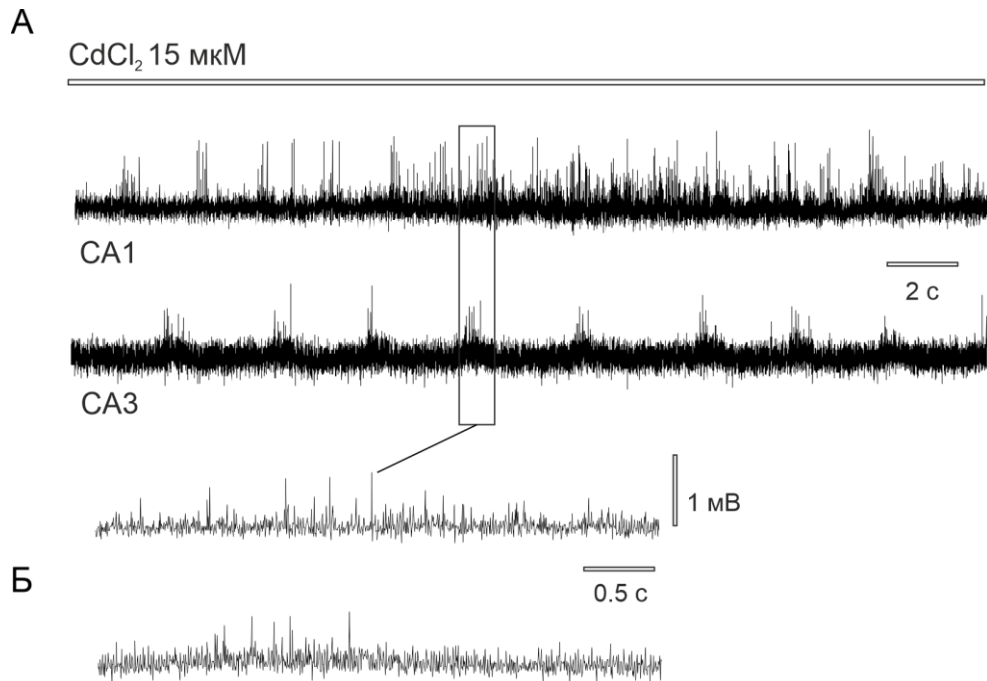
**Рис. 3.15. Синхронізація ЕФА гіпокампа між зонами СА3–СА1. А) Одночасна реєстрації польових потенціалів в зонах СА3 та СА1 під час суперфузії бікукуліном: 1) епілептиформні події виникають одночасно в двох зонах гіпокампа. Б) Одночасна реєстрації польових потенціалів в зонах СА3 та СА1 під час суперфузії 4-АП, 2) сплеск високочастотної ЕФА синхронізованої між зонами СА3–СА1.**

Під час суперфузії зрізів розчином з антагоністом ГАМК<sub>A</sub> рецепторів бікукуліном (рис. 3.15 А) середнє значення коефіцієнта крос-кореляції ЕФА становило  $0.8 \pm 0.18$  ( $n = 10$ ). Під час суперфузії зрізів 4-АП-вмісним розчином (рис. 3.15 Б) аналогічний показник становив  $0.67 \pm 0.09$  ( $n = 10$ ).

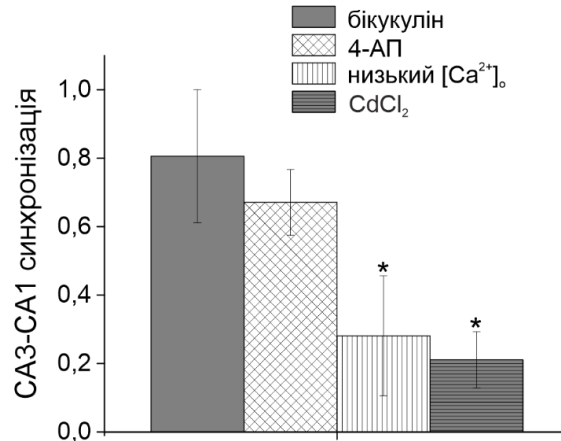
Порівняно з бікулін- та 4-АП-індукованою ЕФА, рівень СА3–СА1-синхронізації польових потенціалів в несинаптичних умовах був значно нижчим. Так, під час суперфузії зрізів низькокальцієвим розчином (рис. 3.16) рівень крос-кореляції дорівнював  $0.28 \pm 0.17$  ( $n = 10$ ), а під час суперфузії кадмійвмісним розчином –  $0.21 \pm 0.08$  ( $n = 10, p < 0.001$ ; рис. 3.17, 3.18).



**Рис. 3.16. ЕФА гіпокампа в несинаптичних умовах. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в СА3 та СА1 в низькокальцієвому розчині, Б) популяційні спайки в СА1 та повільний зсув позаклітинного потенціалу в СА3 – в несинаптичних умовах ЕФА в гіпокампі не синхронізована між ділянками СА3–СА1.**



**Рис. 3.17. ЕФА гіпокампа в несинаптичних умовах. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в СА3 та СА1 в кадмійвмісному розчині, Б) популяційні спайки в СА1 та СА3.**



**Рис. 3.18. Усреднені значення коефіцієнтів крос-кореляції проявів ЕФА в синаптичних (бікукулін та 4-АП) та несинаптичних (низький [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>, CdCl<sub>2</sub>) умовах індукції; зірочками позначено  $p < 0.05$ .**

Отже, наведені вище результати вказують на те, що рівень СА3–СА1-синхронізації ЕФА залежить від способу індукції цієї активності. Так, в

класичних *in vitro*-моделях епілепсії (4-АП, бікукулін) ЕФА являє собою високо синхронізовані польові події, в той час як індукція ЕФА в несинаптичних умовах (низькокальцієвий та кадмійвмісний розчин шСМР) призводить до появи популяційних спайків – швидких, локальних змін у позаклітинному потенціалі, що мають низький рівень СА3–СА1-синхронізації.

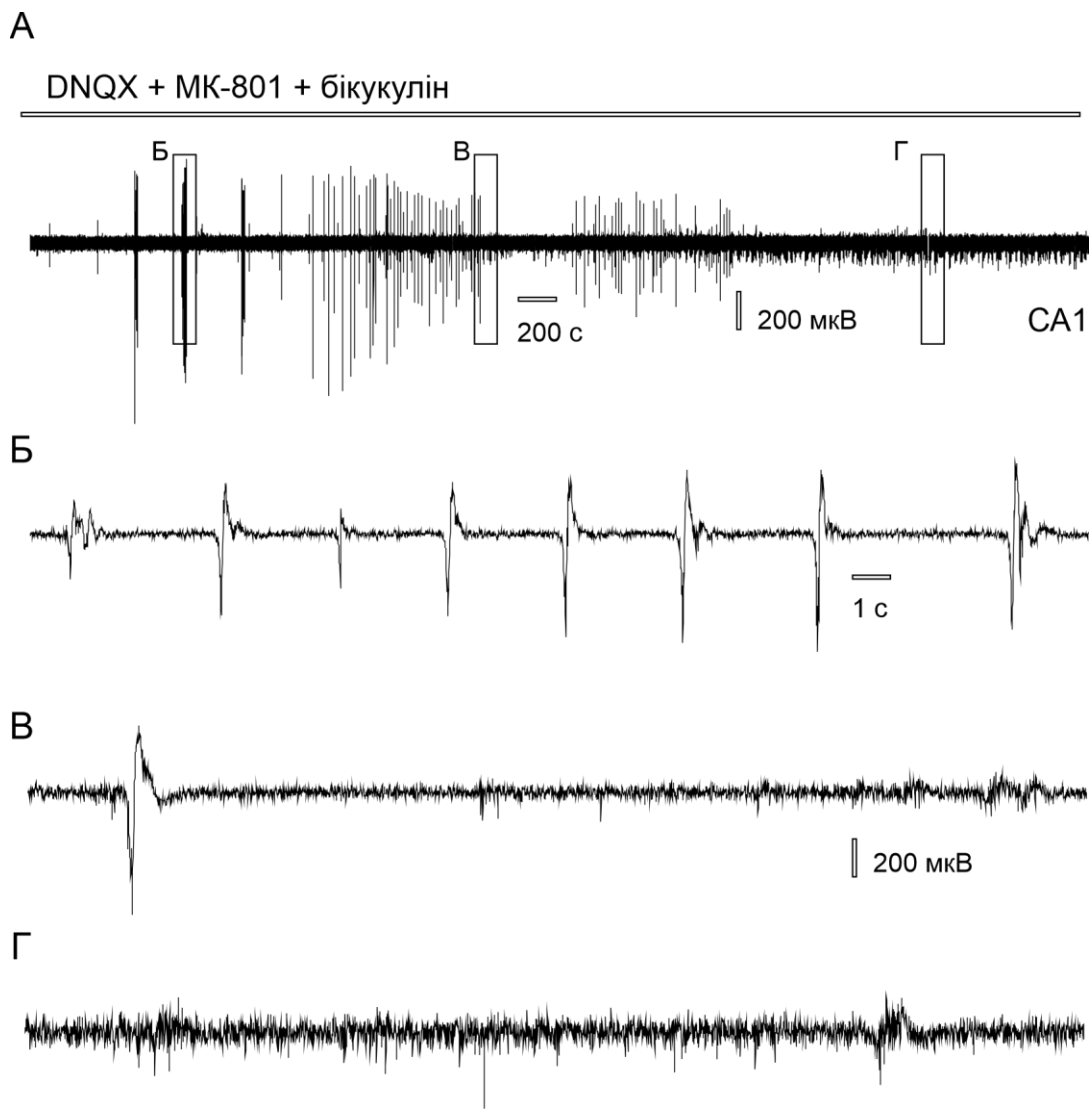
### **3.5 Епілептиформна активність гіпокампа індукована в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів**

Під час суперфузії зрізів гіпокампа розчином шСМР, котра містила АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністи (DNQX 10 мкМ, МК-801 2 мкМ, бікукулін 10 мкМ) було зареєстровано ЕФА в зонах гіпокампа СА3 та СА1 ( $n = 26$ , рис. 3.19).

Подібна ЕФА вміщувала електрографічні прояви двох типів, чітко відмінних один від одного. Перший тип ЕФА – популяційні спайки (рис. 3.19 Г), електрографічно був досить подібний до аналогічних феноменів, зареєстрованих у низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах (рис. 3.16, 3.17).

Проте, на відміну від того, що спостерігалось в «несинаптичних» умовах, де популяційні спайки були переважним типом ЕФА, в розчині з АМПА-, НМДА та ГАМК-антагоністами основним проявом такої активності були триваліші зміни потенціалу – польові розряди (рис. 3.19 Б).

Польові розряди являли собою зсуви позаклітинного потенціалу, середня тривалість яких становила  $1.07 \pm 0.34$  с ( $n = 100$ , зареєстровані в 20 зрізах). Середня частота польових розрядів становила  $0.04 \pm 0.02$  с<sup>-1</sup> ( $n = 20$ ).

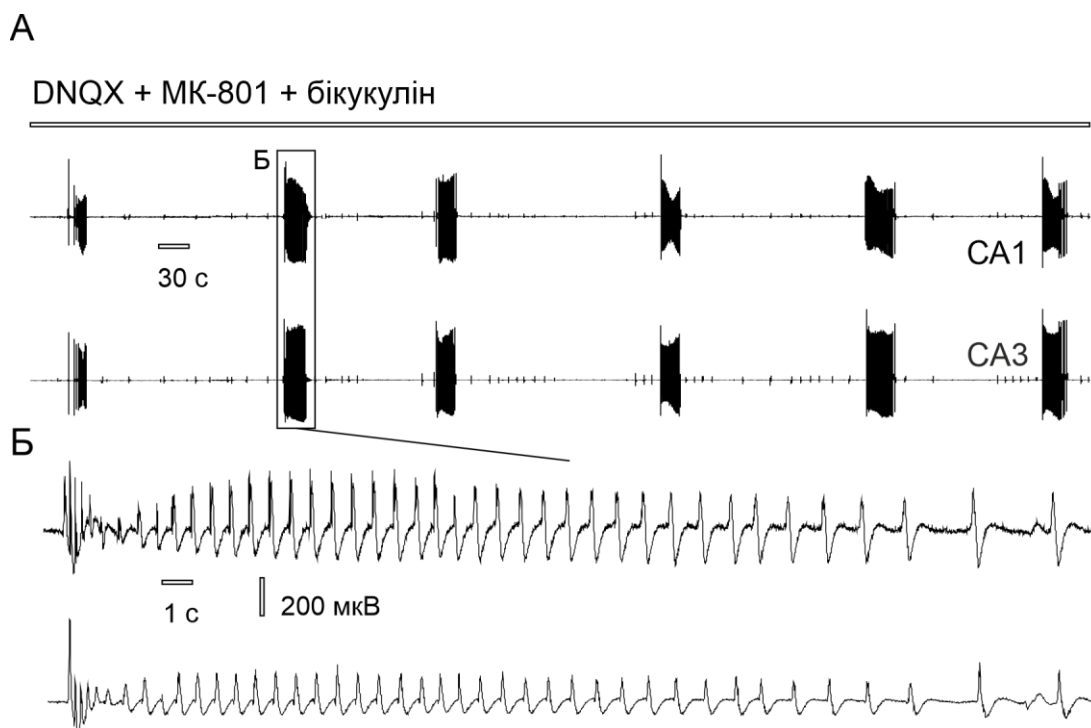


**Рис. 3.19.** Електрографічні прояви ЕФА під час часткової блокади синаптичної передачі. А) ЕФА в зоні СА1 під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами; Б) сплеск польових розрядів; В) польовий розряд та популяційні спайки; Г) популяційні спайки на тлі пригнічення польових розрядів.

Латентний період розвитку ЕФА в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністів складав в зоні СА3  $16.51 \pm 1.6$  хв, а в зоні СА1 –  $16.25 \pm 1.6$  хв. Тобто, в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів ЕФА розвивалась практично одночасно в двох ділянках гіпокампа.

У 58 % реєстрацій (15/26) польові розряди були згуртовані у ритмічні сплески ЕФА (рис. 3.20). Середня тривалість сплеска дорівнювала  $36.37 \pm 11.84$  с;

середній проміжок часу між сплесками склав  $267.09 \pm 146.80$  с. Переважно, на початку сплеску передував високоамплітудний польовий розряд (рис. 3.20 Б). Середня частота польових розрядів в середині сплеску становила  $0.48 \pm 0.26$  с<sup>-1</sup> ( $n = 12$ ).

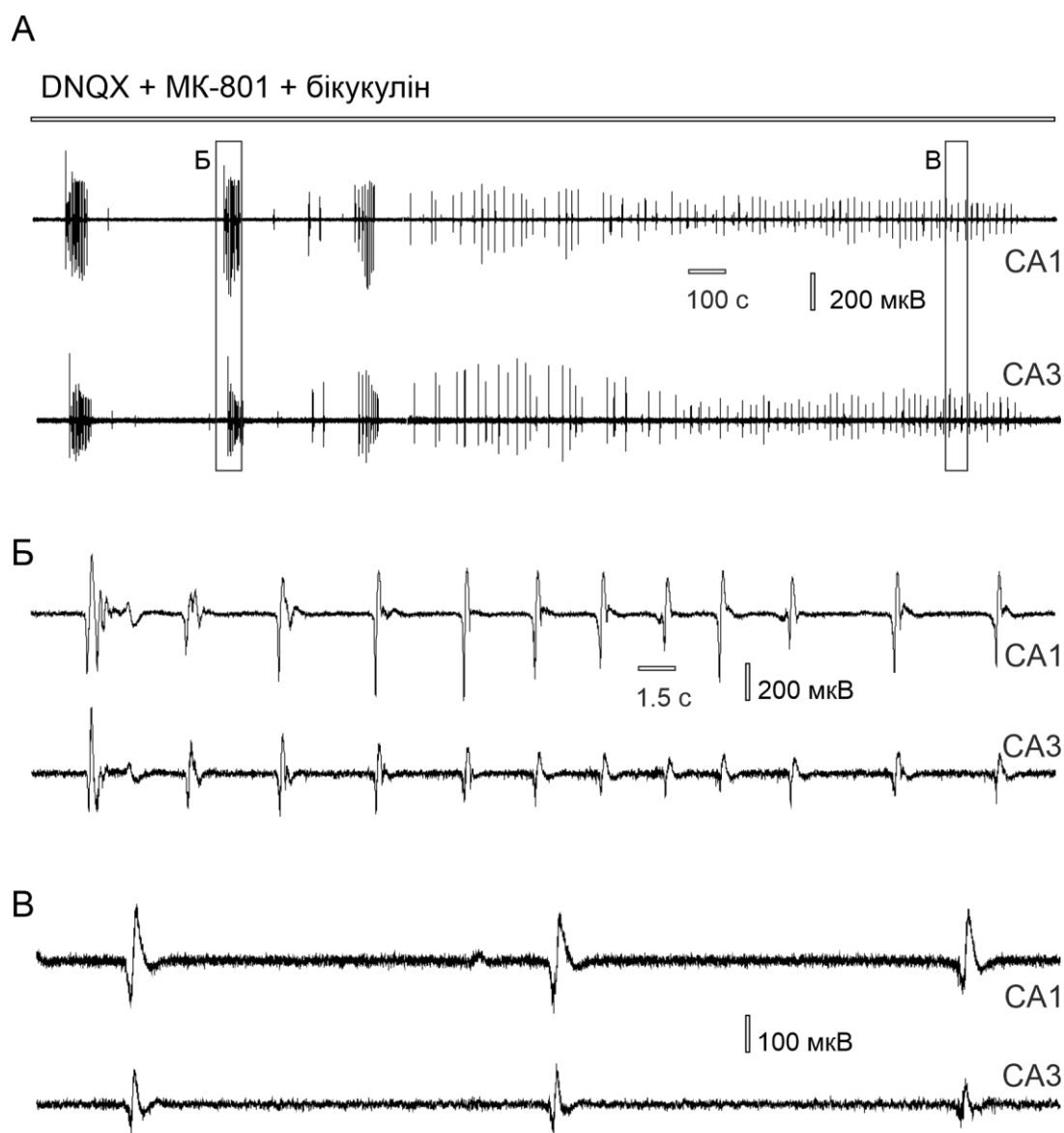


**Рис. 3.20.** Сплески польових розрядів. А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах СА1 та СА3 під час суперфузії зрізу гіпокампа шСМР з АМПА- НМДА- та ГАМК- антагоністами, Б) польові розряди всередині сплеску.

Таким чином, отримані результати вказують на те, що патерн ЕФА індукованої в присутності синаптичних антагоністів істотно відрізняється від ЕФА, викликаної в низькокальцієвому або кадмійвмісному розчинах. Це, в свою чергу, вказує на можливу наявність додаткового, окрім несинаптичних, механізму генерації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.

### ***3.5.1 СА3–СА1-синхронізація епілептиформної активності в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК- антагоністами***

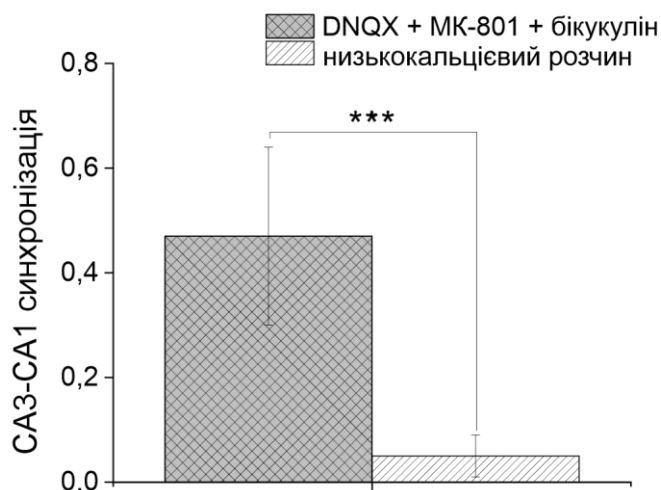
Основною відмінністю ЕФА, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами була ступінь її синхронізації між ділянками СА3 та СА1 гіпокампа (рис 3.21).



**Рис. 3.21. ЕФА гіпокампа в умовах часткової блокади синаптичної передачі. А) Одночасна реєстрація ЕФА в ділянках СА1 та СА3 під час суперфузії шСМР з АМПА- НМДА- та ГАМК-антагоністами; Б) сплеск польових розрядів; В) окремі польові розряди, котрі виникають одночасно в двох зонах гіпокампа.**

Було порівняно рівень СА3–СА1-синхронізації польових потенціалів під час ЕФА, викликаної шляхом суперфузії зрізів розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-

антагоністами та в низькокальцієвому розчині (рис. 3.22). Рівень крос-кореляції польових потенціалів, що виникали в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністів був майже вдесятеро вищим ( $0.47 \pm 0.17$ ,  $n = 25$ ) порівняно з таким у низькокальцієвому розчині ( $0.05 \pm 0.04$ ,  $n = 12$ ,  $p \leq 0.001$ ; рис. 3.22).



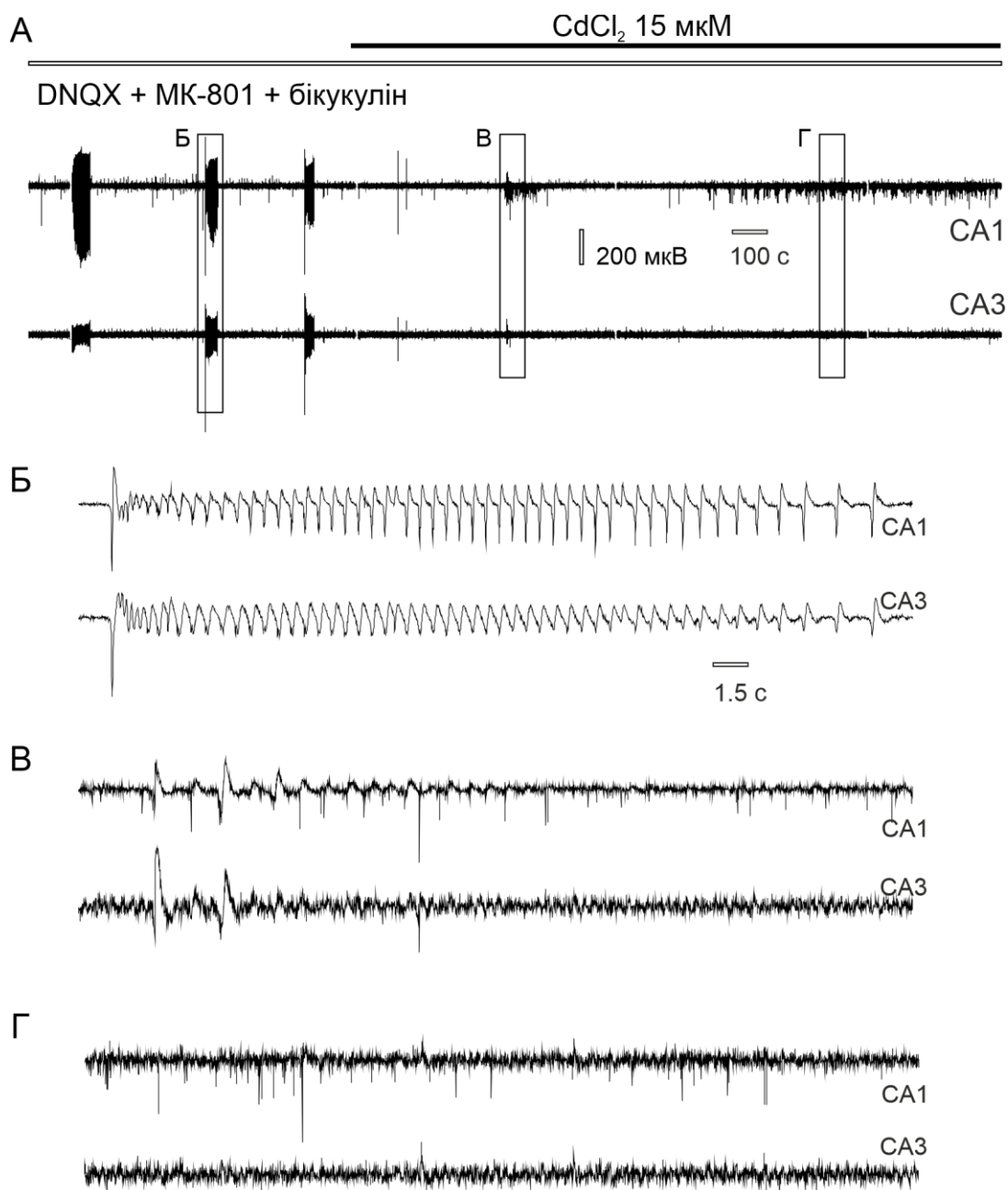
**Рис. 3.22.** Усереднені значення коефіцієнтів крос-кореляції проявів ЕФА в зонах СА3 та СА1 в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів та у низькокальцієвому розчині; \*\*\* –  $p < 0.001$ .

Отже, основною відміною характеристикою ЕФА, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами був значний рівень синхронізації польових потенціалів в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа; подібний рівень СА3–СА1-синхронізації не було зареєстровано в несинаптичних умовах під час суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим або кадмійвмісним розчинами. Отримані результати вказують на можливу наявність додаткового механізму синхронізації ЕФА в умовах часткової блокади синаптичної передачі антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

### ***3.5.2 Вплив кадмію хлориду на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами***



В наступних експериментах було досліджено вплив аплікації хлориду кадмію на генерацію епілептиформних польових розрядів в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами (рис. 3.23).

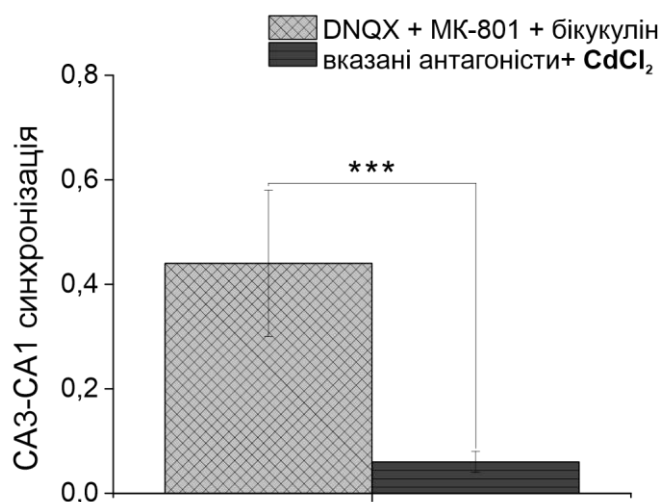


**Рис. 3.23. Вплив аплікації кадмію хлориду на ЕФА в гіпокампі в умовах часткової блокади синаптичної передачі. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів під час суперфузії шСМР з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами; Б) сплеск польових розрядів в СА3 та СА1; В) пригнічення**

польових розрядів у СА3–СА1 під час аплікації 15 мкМ CdCl<sub>2</sub>; Г) несинаптична ЕФА (популяційні спайки).

Після розвитку в ділянках СА3 та СА1 польових розрядів, що мали сталу амплітуду та частоту впродовж 10–15 хв реєстрації, до шСМР було додано 15 мкМ кадмію хлориду (CdCl<sub>2</sub>, рис. 3.23 А). Аплікація кадмію хлориду призвела до пригнічення польових розрядів в зонах СА3 та СА1 (рис. 3.23 В). Середнє значення тривалості суперфузії кадмійвмісним розчином до моменту пригнічення польових розрядів складало  $4.09 \pm 2.60$  хв ( $n = 12$ ). Після тривалої суперфузії кадмійвмісним розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами переважним корелятом ЕФА ставали популяційні спайки (рис. 3.23 Г), подібно до тих, що спостерігались в умовах повної блокади синаптичної передачі.

Аплікація кадмію хлориду призводила до зменшення СА3–СА1-синхронізації ЕФА. Так під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.44 \pm 0.14$ , а після додавання хлориду кадмію –  $0.06 \pm 0.02$  ( $n = 22, p < 0.001$ ; рис. 3.24).

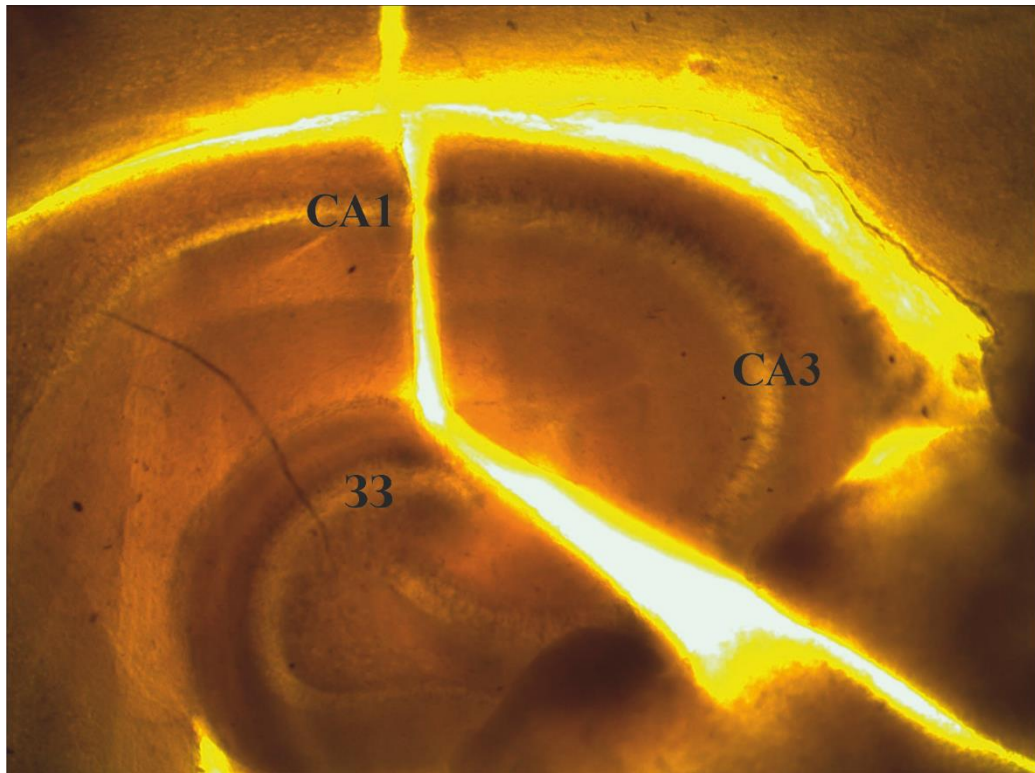


**Рис. 3.24.** Вплив аплікації кадмію хлориду на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами ( $n = 22, p < 0.001$ ).

Той факт, що хлорид кадмію пригнічує генерацію польових розрядів та СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в присутності антагоністів АМПА-, НМДА-, та ГАМК-рецепторів свідчить, що даний прояв ЕФА не є несинаптичним, а залежить від активності кальцієвих каналів та синаптичної передачі.

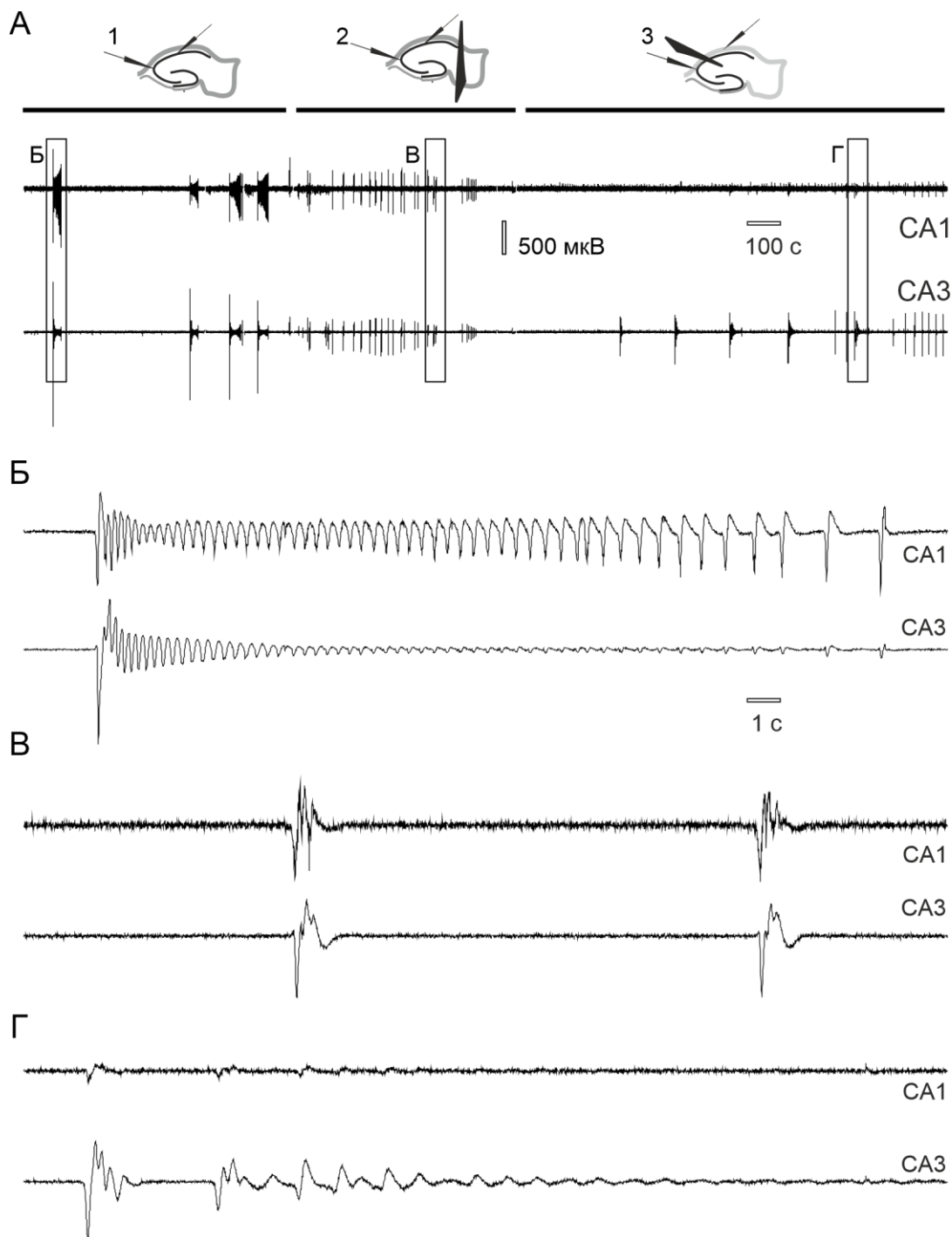
### **3.5.3 Вплив механічного відокремлення ділянок зрізу гіпокампа на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами**

Для того, щоб перевірити здатність окремих ділянок гіпокампальної формації до генерації польових розрядів в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів, в наступних експериментах реєстрація ЕФА проводилась спочатку на інтактному зрізі гіпокампа, а потім скальпелем відокремлювали окремі ділянки гіпокампальної формації: СА3 від СА1, підставку гіпокампа від СА1, зубчасту звивину від СА3, як показано на рис. 3.25 та 3.26 А.



**Рис. 3.25. Зріз гіпокампа з відокремленими ділянками: СА1, СА3 та зубчаста звивина (33).**

Відокремлення підставки гіпокампа від зони CA1 немало істотного впливу на генерацію польових розрядів в CA3 та CA1 ( $n = 3$ , рис. 3.26 В).

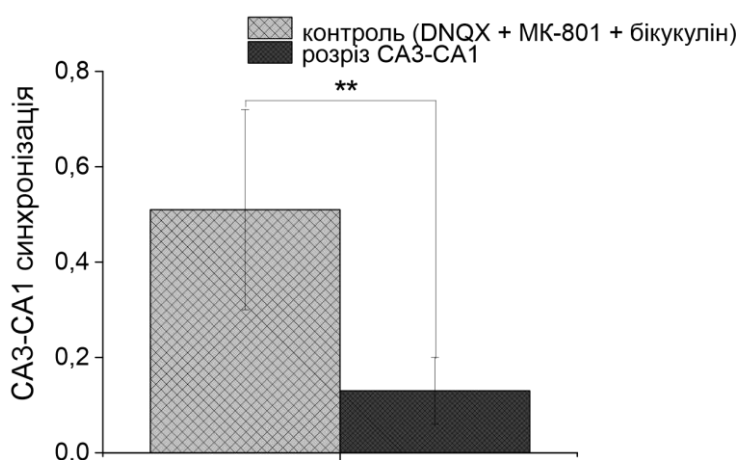


**Рис. 3.26.** Вплив механічного відокремлення ділянок зрізу гіпокампа на ЕФА, індуковану в шСМР з АМПА- НМДА- та ГАМК- антагоністами. А) Схематичне зображення розташування електродів в інтактному зрізі гіпокампа (1), після відокремлення підставки гіпокампа (2) та після розрізу

між СА3 та СА1 (З) під час одночасної реєстрації польових потенціалів в СА3–СА1 в умовах суперфузії шСМР з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Б) сплеск польових розрядів в контрольних умовах. В) Польові розряди виникають в СА3 та СА1 після відокремлення підставки гіпокампа; Г) пригнічення польових розрядів в СА1, але не в СА3, після розрізу між вказаними зонами гіпокампа.

Проте, відокремлення ділянки СА3 від СА1 призводило до припинення генерації польових розрядів в ділянці СА1, але не в СА3 ( $n = 10$ , рис. 3.26 Г).

Відокремлення ділянки СА3 від СА1 також призводило до зменшення СА3–СА1-синхронізації ЕФА. Так, під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.51 \pm 0.21$ , а після відокремлення СА3 від СА1 –  $0.13 \pm 0.07$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.01$ , рис. 3.27).



**Рис. 3.27.** Усереднені значення коефіцієнтів крос-кореляції проявів ЕФА в зонах СА3 та СА1 в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів та після розрізу між зонами СА3 та СА1; \*\* -  $p < 0.01$ .

Отже, отримані дані вказують на те, що в умовах часткової блокади синаптичної передачі антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів

ділянка CA3 здатна до генерації польових розрядів незалежно від CA1, в той же час, зона гіпокампа CA1 після відокремлення від CA3 втрачає здатність генерувати польові розряди в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

### 3.6 Вплив холінергічних антагоністів на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами

#### 3.6.1 Вплив атропіну на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами

Атропін є блокатором м-холінергетичних рецепторів. В наступних експериментах було досліджено вплив аплікації атропіну (10 мкМ) на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА в розчині з синаптичними антагоністами ( $n = 6$ , рис. 3.28, 3.29).

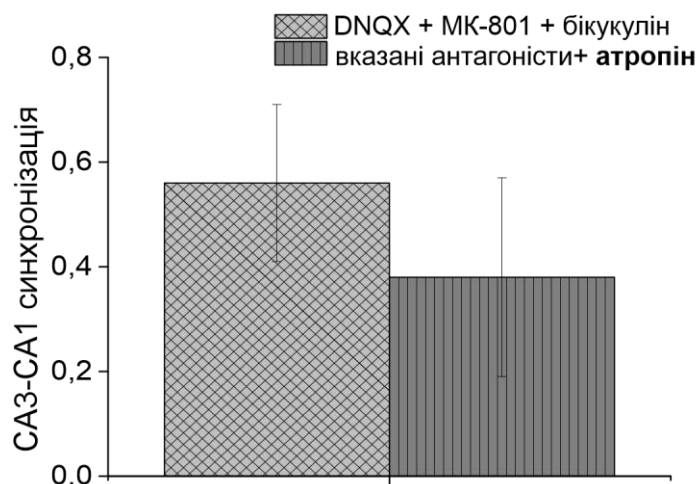
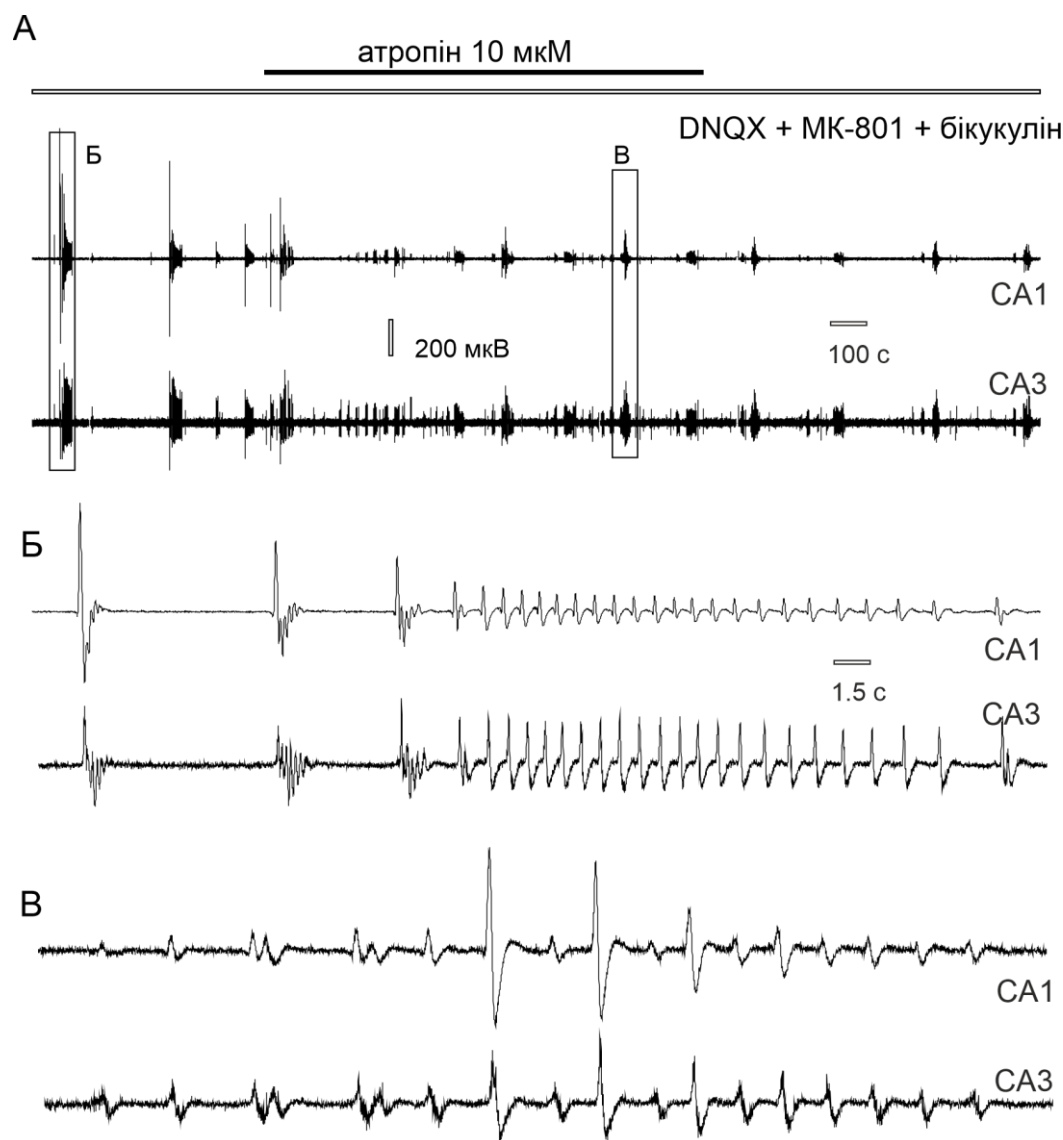


Рис. 3.28. Вплив аплікації атропіну на інтенсивність CA3–CA1-синхронізації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.

Аплікація атропіну не мала значущого ефекту на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА. Так, під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-

антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.56 \pm 0.15$ , а після додавання атропіну  $-0.38 \pm 0.19$  ( $n = 6, p = 0.013$ ; рис. 3.29).



**Рис. 3.29. Вплив аплікації атропіну на ЕФА в гіпокампі в присутності АМПА, НМДА- та ГАМК-антагоністів. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах CA1–CA3; Б) сплеск польових розрядів; В) сплеск польових розрядів під час аплікації атропіну.**

Отже, отримані дані вказують на те, що активація м-холінорецепторів не є необхідною умовою для CA3–CA1-синхронізації ЕФА в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

### 3.6.2 Вплив тубокурарину на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами

Алкалоїд тубокурарин справляє антагоністичну дію на нікотинові холінорецептори. В наступних експериментах було досліджено вплив блокади н-холінорецепторів на генерацію польових розрядів та СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів (рис. 3.30).

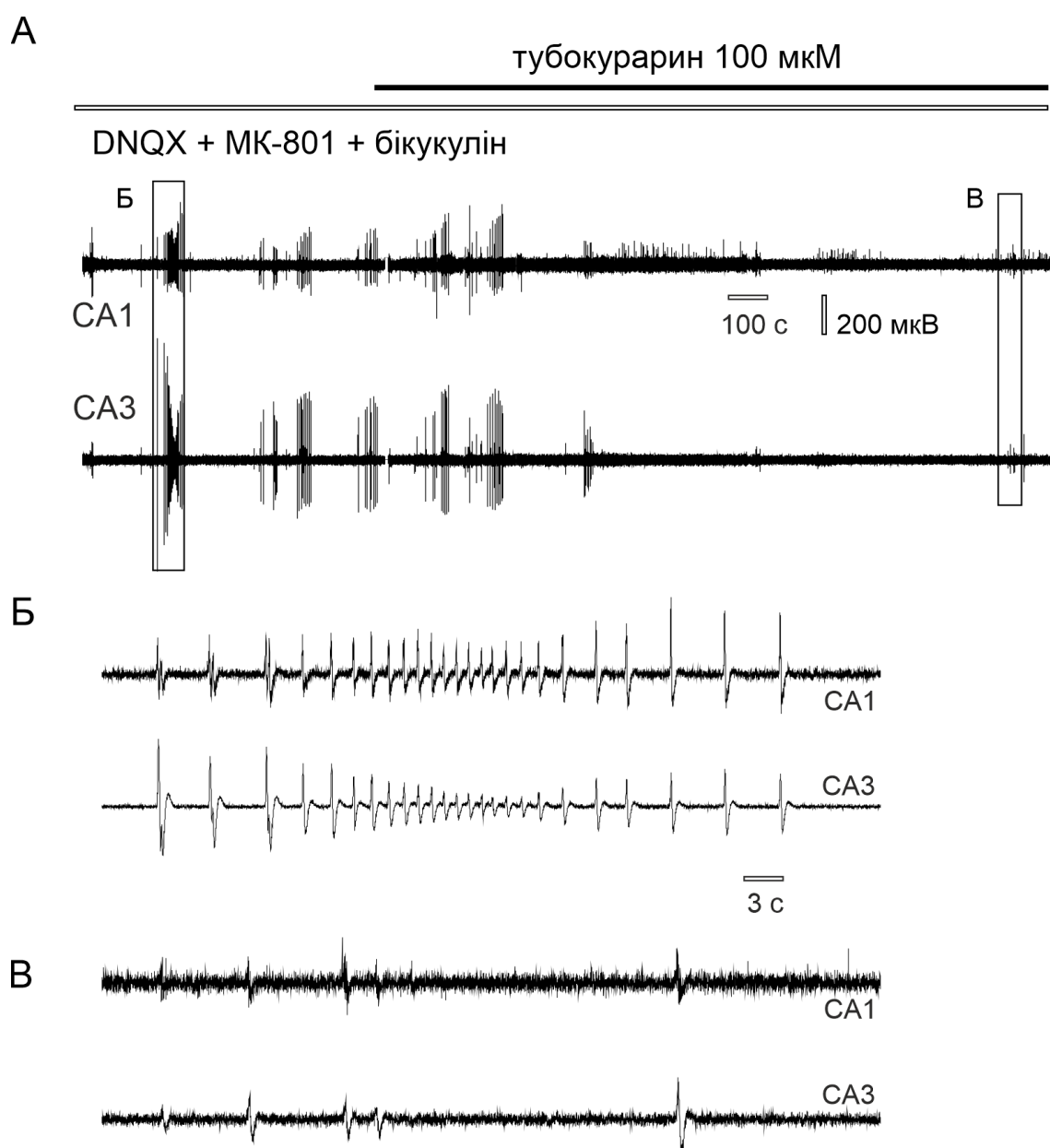
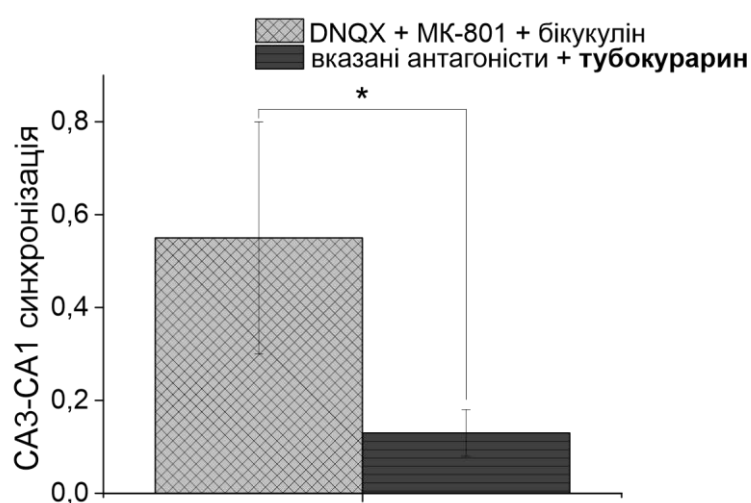


Рис. 3.30. Вплив аплікації тубокурарину на ЕФА в СА3 та СА1 під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. А)



**Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах CA1–CA3: Б) сплеск польових розрядів; В) пригнічення польових розрядів під час аплікації тубокурарину.**

Аплікація 100 мкМ тубокурарину призводила до зменшення CA3–CA1-синхронізації ЕФА (рис. 3.31) та пригнічення генерації польових розрядів (рис. 3.31 В). Так, під час суперфузії зрізів розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.55 \pm 0.25$ , а після додавання тубокурарину –  $0.13 \pm 0.05$  ( $n = 6$ ,  $p = 0.04$ ; рис. 3.31).



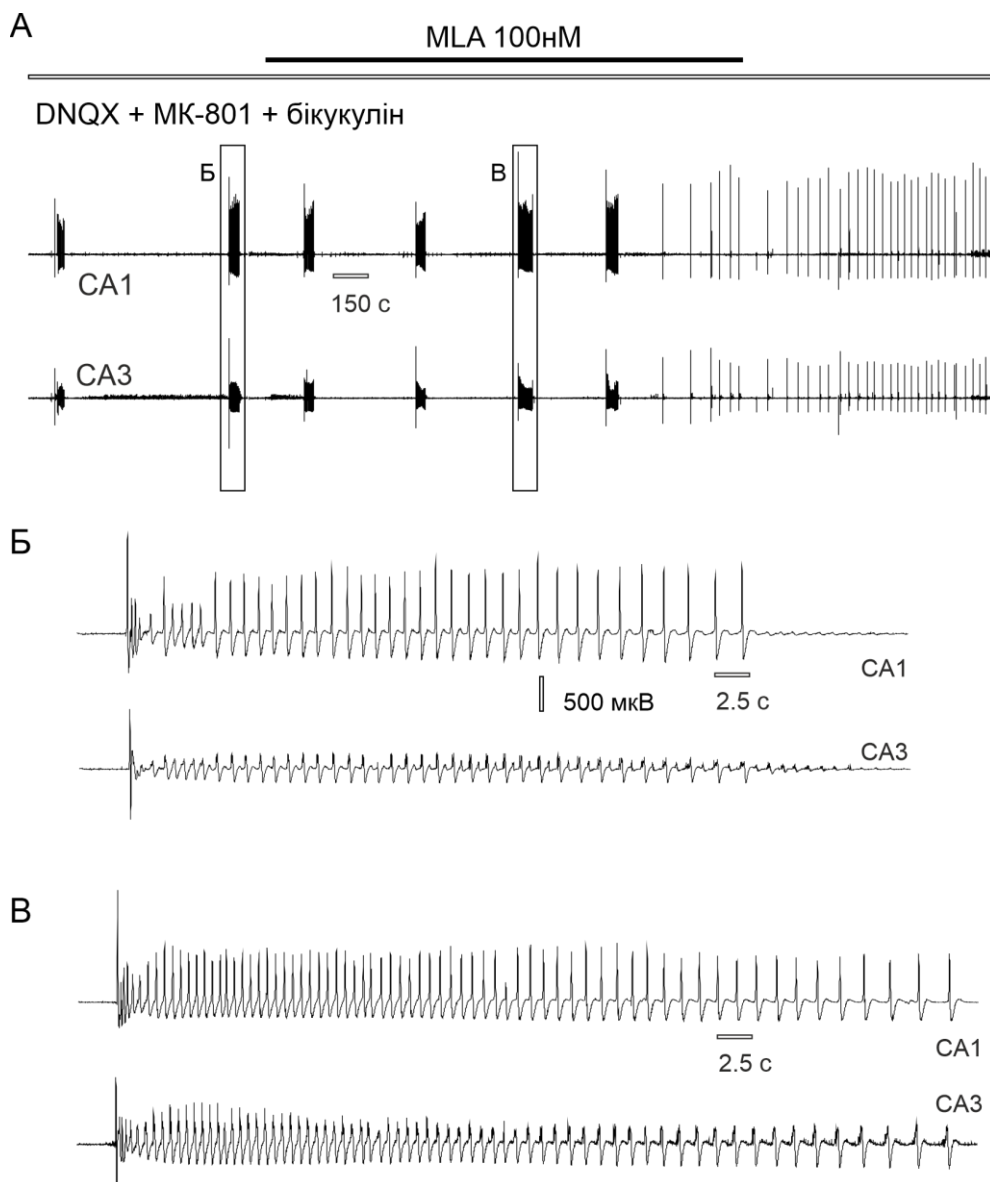
**Рис. 3.31. Вплив аплікації тубокурарину на інтенсивність CA3–CA1-синхронізації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.**

Таким чином одержані результати вказують на те, що активація н-холінорецепторів грає критичну роль в CA3–CA1-синхронізації ЕФА в умовах блокади глутамат- та ГАМКергічної синаптичної передачі.

### ***3.6.3 Вплив метиллікаконтину на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами***

Метиллікаконтин (MLA) є селективним антагоністом  $\alpha 7$ -холінорецепторів. В наступних експериментах було досліджено вплив MLA на

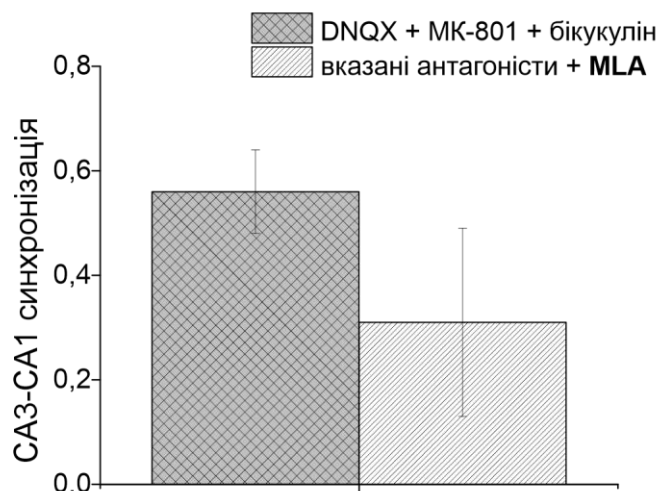
синхронізацію ЕФА в розчині с АМПА-, НМДА- та ГАМК- антагоністами ( $n = 5$ , рис. 3.32).



**Рис. 3.32. Вплив аплікації MLA на ЕФА в ділянках CA3 та CA1 під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах CA1–CA3: Б) сплеск польових розрядів, В) сплеск польових розрядів під час аплікації MLA.**

Аплікація MLA не мала значущого ефекту на рівень CA3–CA1-синхронізації ЕФА. Так, під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-

антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.56 \pm 0.08$ , а після додавання MLA –  $0.31 \pm 0.18$  ( $n = 5, p = 0.06$ ; рис. 3.33).

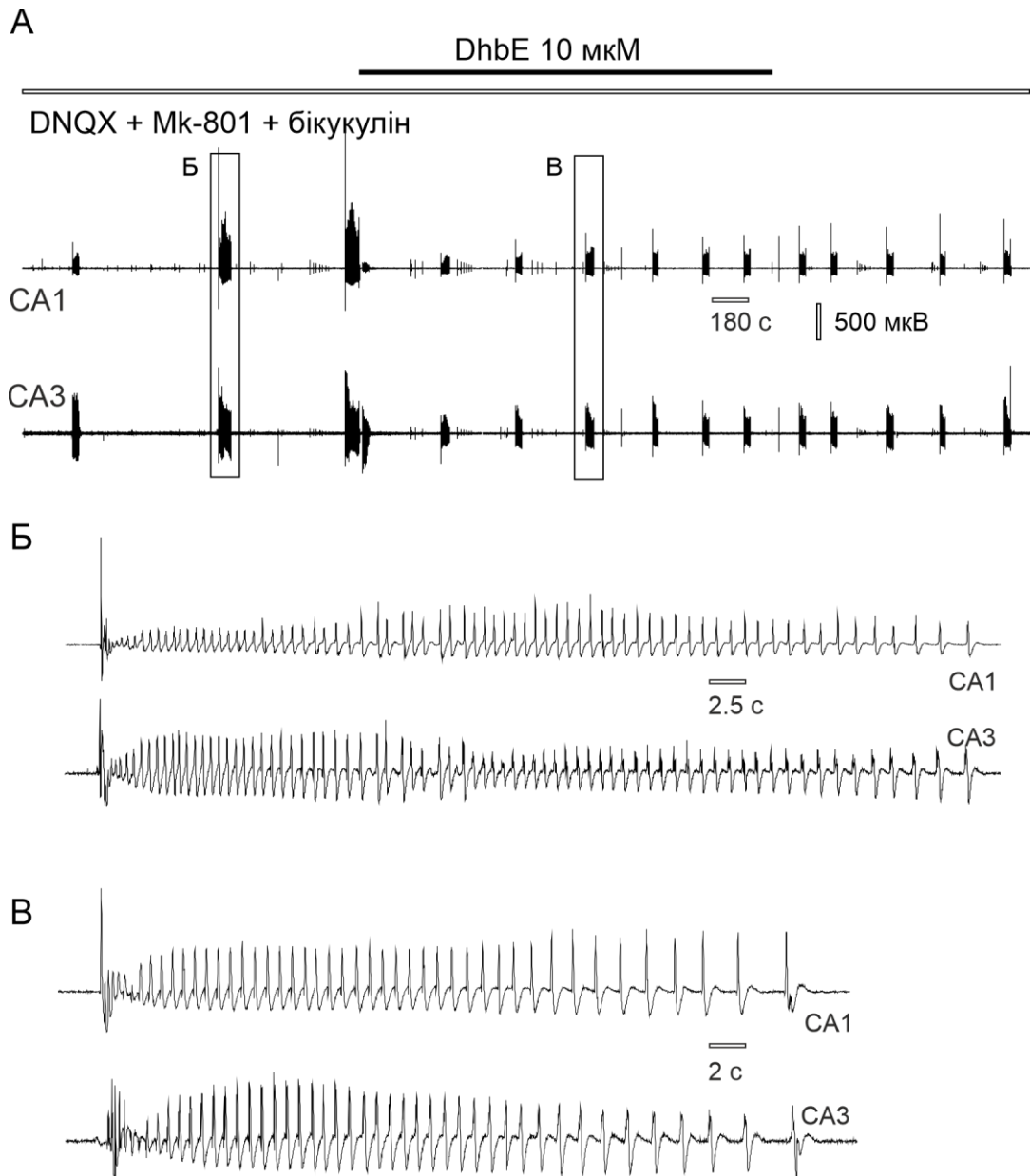


**Рис. 3.33. Вплив аплікації MLA на інтенсивність CA3–CA1-синхронізації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.**

Отже, одержані результати свідчать, що активація  $\alpha 7$ -н-холінорецептори не є необхідною умовою для генерації ЕФА та CA3–CA1-синхронізації польових потенціалів в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

#### ***3.6.4 Вплив дигідро- $\beta$ -еритроїдину на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами***

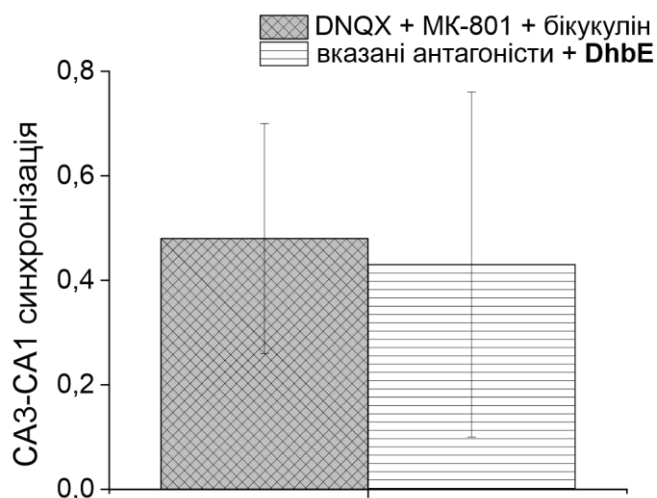
Дигідро- $\beta$ -еритроїдин (Dh $\beta$ E) є помірно селективним блокатором  $\alpha 4\beta 2$  підтипу н-холінорецепторів. В наступних експериментах було перевірено вплив блокади  $\alpha 4\beta 2$  н-холінорецепторів на синхронізацію ЕФА в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів (рис. 3.34).



**Рис. 3.34. Вплив аплікації антагоніста  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів DhbE на ЕФА в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК- антагоністів. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах гіпокампа CA1 та CA3: Б) сплеск польових розрядів під час суперфузії розчином з синаптичними антагоністами; В) сплеск польових розрядів під час аплікації 10 мкМ DhbE.**

Аплікація DhbE не мала статистично значущого ефекту на CA3–CA1-синхронізацію польових потенціалів (Рис. 3.34 В). Так під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення

коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.48 \pm 0.22$ , а після додавання Dh $\beta$ E –  $0.43 \pm 0.33$  ( $n = 4$ ,  $p = 0.85$ ; рис. 3.35).



**Рис. 3.35. Вплив аплікації Dh $\beta$ E на інтенсивність CA3–CA1-синхронізації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.**

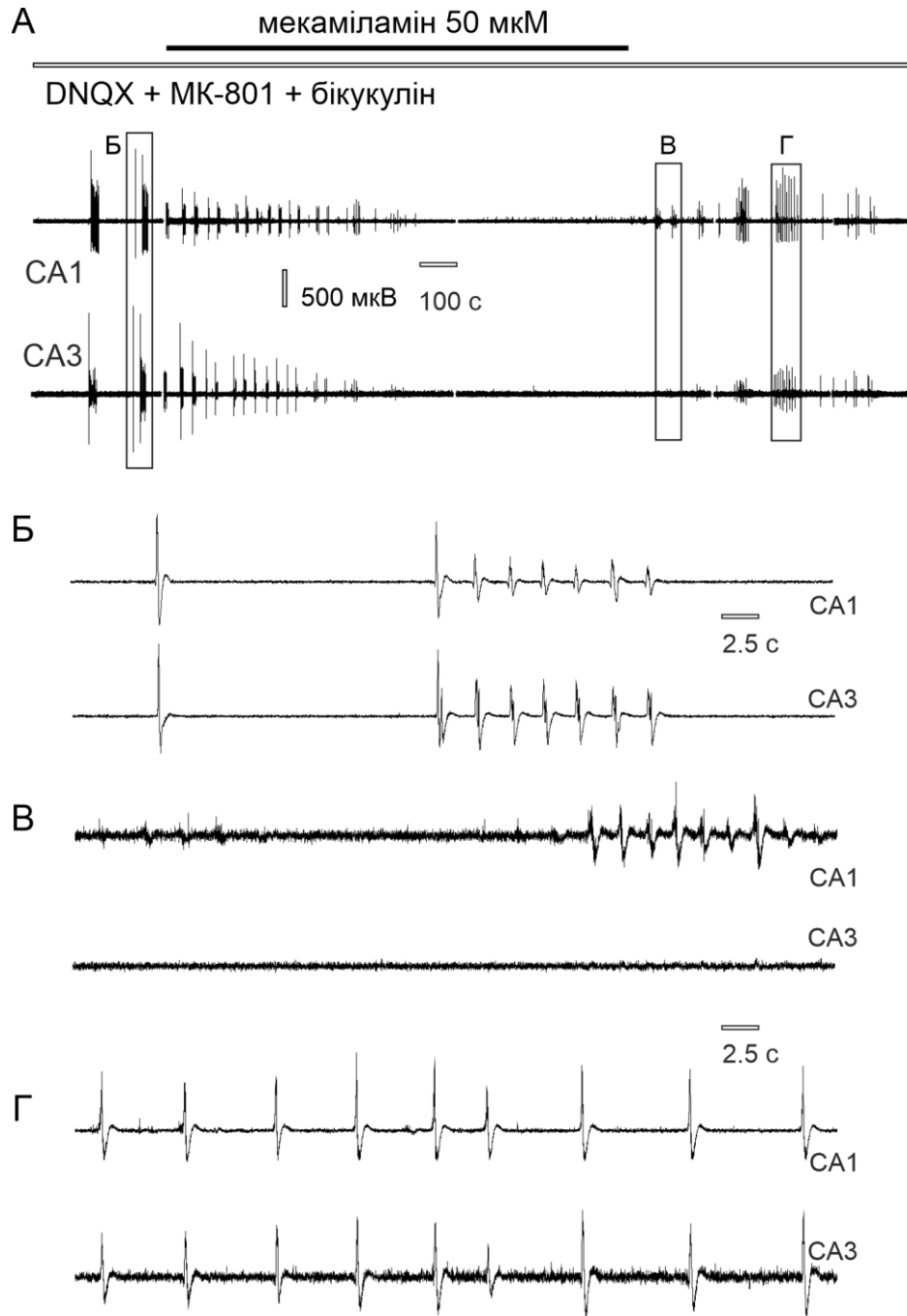
Отже, наведені результати вказують на те, що, подібно до  $\alpha 7$ -холінорецепторів, активація підтипу  $\alpha 4\beta 2$ -холінорецепторів не є критично необхідною умовою для генерації польових розрядів та CA3–CA1-синхронізації активності в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

### ***3.6.5 Вплив мекаміламіну на епілептиформну активність індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами***

Мекаміламін є неселективним антагоністом н-холінорецепторів та використовується в фармакології в якості гангліоблокатора з метою контролю гіпертензивних станів.

В наступних експериментах було досліджено вплив мекаміламіну на ЕФА індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами (рис. 3.36 А). Аплікація 50 мкМ мекаміламіну призводила до істотного пригнічення генерації

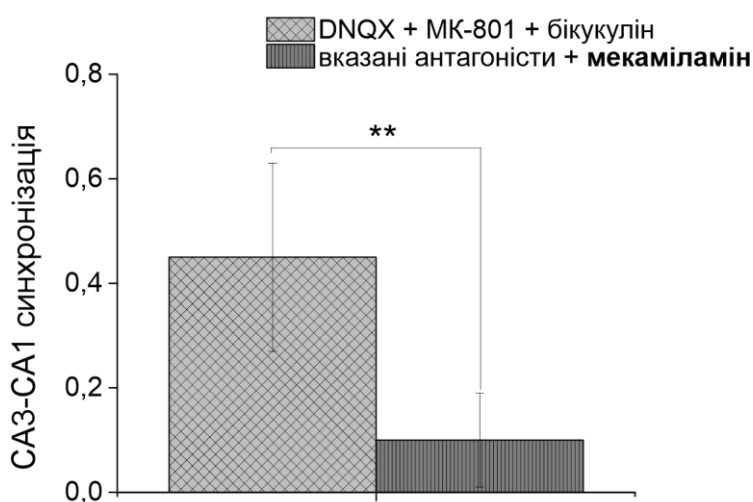
польових потенціалів та вірогідного зменшення синхронізації ЕФА між зонами гіпокампа CA3 та CA1 (рис. 3.36 В).



**Рис. 3.36. Вплив аплікації мекаміламіну на ЕФА в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністів. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах гіпокампа CA1 та CA3: Б) сплеск польових розрядів під час суперфузії розчином зі вказаними синаптичними антагоністами; В) пригнічення генерації ЕФА в областях CA3 та CA1 після аплікації**

мекаміламіну; Г) відновлення ЕФА після припинення аплікації мекаміламіну.

Аплікація мекаміламіну призводила до зменшення СА3–СА1-синхронізації польових потенціалів. Так під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.45 \pm 0.18$ , а після додавання мекаміламіну –  $0.10 \pm 0.09$  ( $n = 12, p = 0.002$ ; рис. 3.37).



**Рис. 3.37.** Вплив аплікації мекаміламіну на інтенсивність СА3–СА1-синхронізації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.

Отже, наведені вище результати свідчать, що активація н-холінорецепторів є критично необхідною умовою для синхронізації ЕФА між зонами СА3 та СА1 в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів. Той факт, що аплікація неселективних антагоністів н-холінорецепторів мекаміламіну та тубокурарину пригнічує СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, а селективні антагоністи  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не мають істотного впливу, вказує на потенційну роль холінорецепторів інших підтипів (можливо,  $\alpha 3\beta 4$ -підтипу) в синхронізації нервових мереж гіпокампа.

## **3.7 Вплив холінергічних антагоністів на бікукулініндуковану епілептиформну активність в гіпокампі**

### ***3.7.1 Вплив мекаміламіну на бікукулініндуковану епілептиформну активність в гіпокампі***

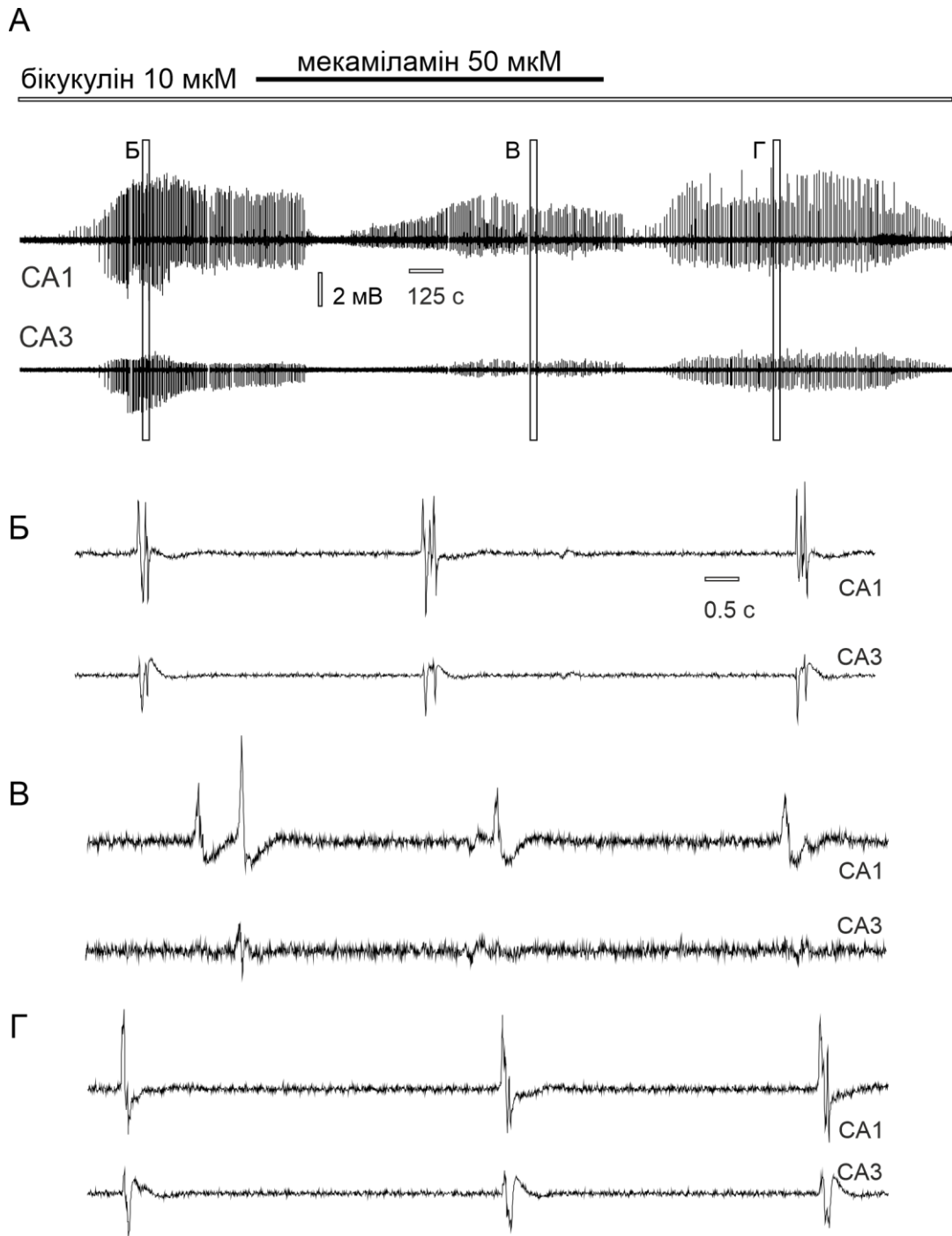
В наступних експериментах було досліджено вплив аплікації мекаміламіну на частоту, амплітуду та СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, індукованої шляхом суперфузії зрізів шСМР з антагоністом ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів бікукуліном (рис. 3.38). Суперфузія зрізів гіпокампа розчином, що містив 10 мкМ бікукуліна призводила до появи ритмічної ЕФА, характерної для цієї *in vitro*-моделі епілепсії (Рис. 3.38 А, Б).

Додавання в розчин нікотинового антагоністу мекаміламіну призводило до зменшення амплітуди епілептиформних спайків в СА3 та СА1 зонах гіпокампа (Рис. 3.39, 3.40). Так, в СА3 середнє значення амплітуди спайків становило  $2.04 \pm 1.04$  мВ, а після аплікації мекаміламіну –  $1.61 \pm 0.95$  мВ ( $n = 10$ ,  $p = 0.002$ , рис. 3.39).

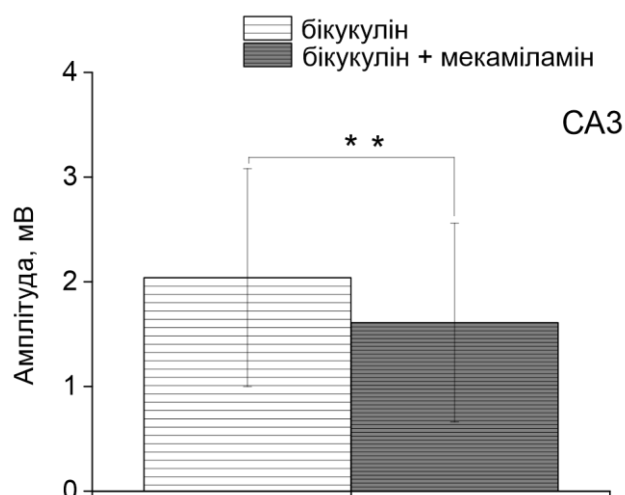
В зоні СА1 середнє значення амплітуди ЕФА в контролі становило  $3.45 \pm 1.87$  мВ, а після аплікації мекаміламіну –  $2.19 \pm 1.13$  мВ ( $n = 10$ ,  $p = 0.003$ , рис. 3.40)

Аплікація мекаміламіну не вплинула на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, яку було індуковано бікукуліном. Так, під час суперфузії бікукуліном середнє значення коефіцієнта крос-кореляції польових потенціалів в СА3 та СА1 становив  $0.50 \pm 0.20$ , а після додавання МЕК –  $0.57 \pm 0.15$  ( $n = 10$ ,  $p = 0.11$ , рис. 3.41).

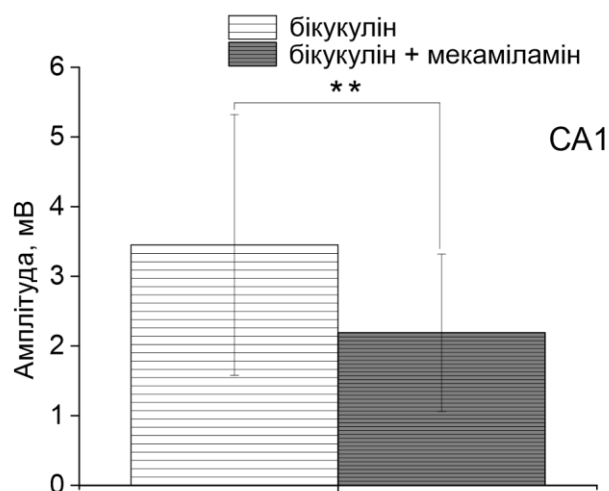




**Рис. 3.38.** Вплив мекаміламіну на ЕФА в зрізах гіпокампа в умовах аплікації бікукуліном. А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах СА3 та СА1; Б) епілептиформні явища індуковані бікукуліном; В) пригнічення бікукулініндукованої ЕФА в зоні СА3 під час аплікації мекаміламіну; Г) відновлення ЕФА після припинення аплікації мекаміламіну.



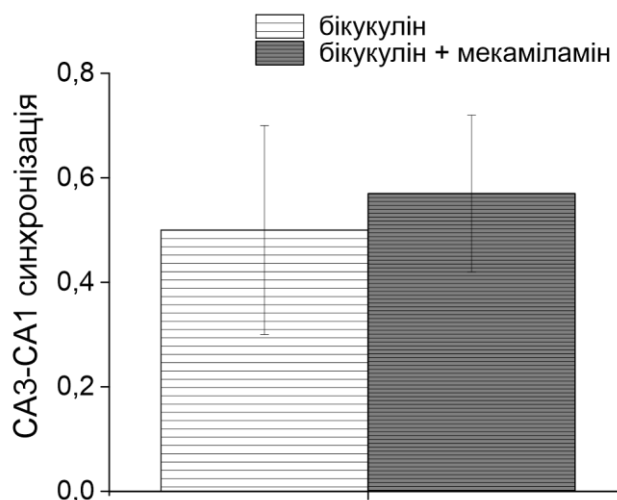
**Рис. 3.39.** Вплив аплікації мекаміламіну на амплітуду епілептиформних подій в зоні CA3 під час суперфузії зрізів бікукуліном ( $n = 10, p = 0.002$ ).



**Рис. 3.40.** Вплив аплікації мекаміламіну на амплітуду епілептиформних подій в зоні CA1 гіпокампа під час суперфузії зрізів бікукуліном ( $n = 10, p = 0.003$ ).

Також аплікація мекаміламіну не мала значущого впливу на частоту бікукулініндукованих епілептиформних подій. Так, під час суперфузії шСМР з

бікукуліном частота ЕФА становила  $0.13 \pm 0.07 \text{ c}^{-1}$ , а після аплікації мекаміламіну –  $0.15 \pm 0.08 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 10, p = 0.3$ ).



**Рис. 3.41. Вплив аплікації мекаміламіну на інтенсивність CA3–CA1-синхронізації ЕФА викликаній бікукуліном.**

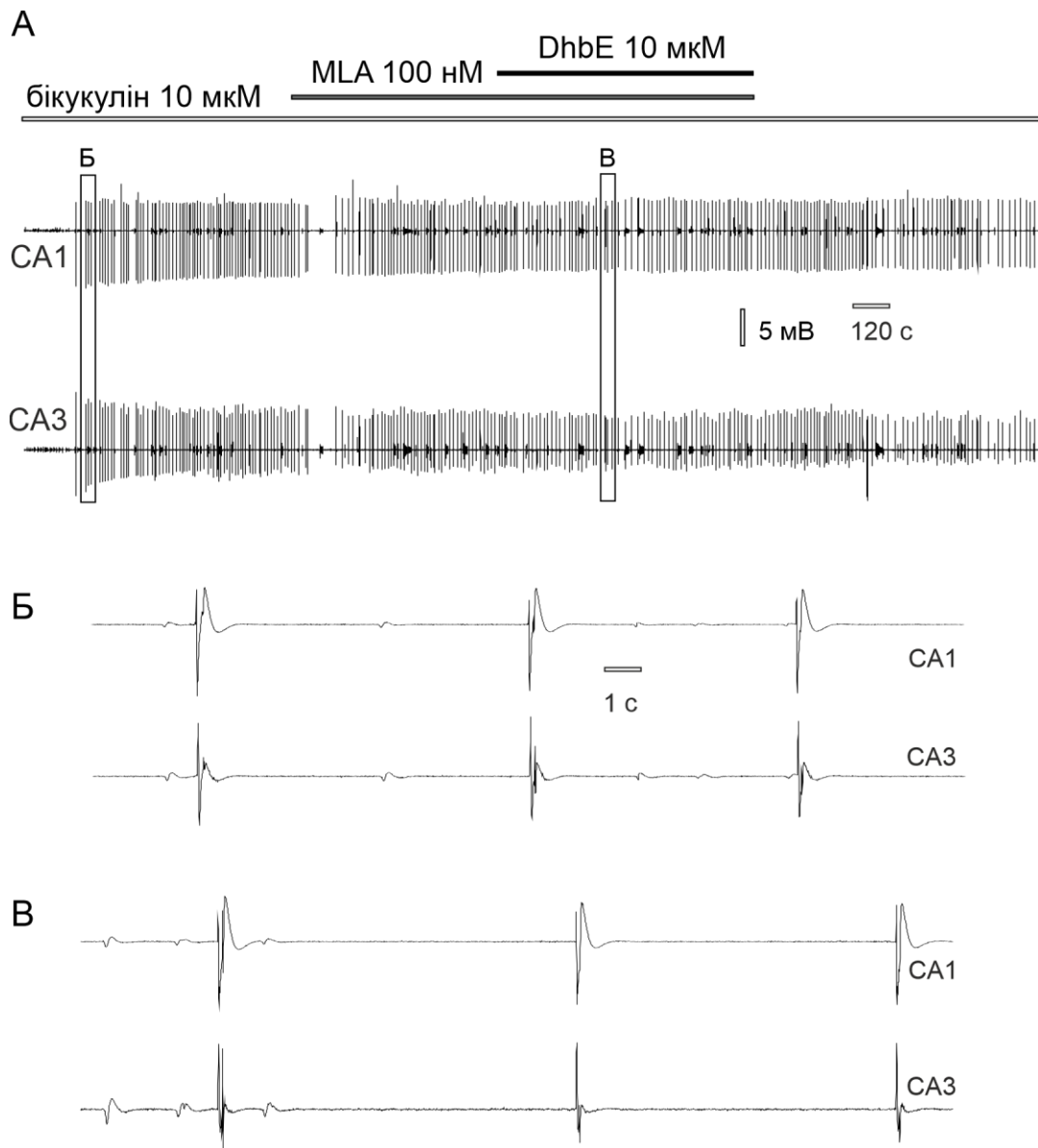
Таким чином, наведені вище результати вказують на те, що в умовах блокади гальмівної синаптичної передачі бікукуліном, блокування функції н-холінорецепторів призводить до зменшення амплітуди бікукулініндукованих епілептиформних подій, але не має істотного впливу на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА.

### ***3.7.2 Вплив антагоністів $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів на бікукулініндуковану епілептиформну активність в гіпокампі***

В наступних експериментах було досліджено вплив аплікації селективних антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів, відповідно MLA та Dh $\beta$ E, на характеристики ЕФА в гіпокампі, індукованої бікукуліном.

Подібно до того ефекту, що спостерігався в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами, під час суперфузії зрізів шСМР з бікукуліном, аплікація

селективних антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не впливала на амплітуду бікукулініндукованої ЕФА (рис. 3.42).



**Рис. 3.42. Вплив антагоністів  $\alpha 7$ -  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів (MLA та DhβE відповідно) на бікукулініндуковану ЕФА. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах гіпокампа CA1 та CA3: Б) епілептиформні розряди викликані бікукуліном; В) епілептиформні розряди в CA3 та CA1 під час аплікації MLA та DhβE.**

Так, в CA3 амплітуда в контролі становила –  $6.88 \pm 3.04$  мВ, а після додавання в розчин 100 нМ MLA та 10 мкМ DhβE –  $5.70 \pm 3.10$  мВ ( $n = 3, p = 0.18$ ).

В зоні СА1 середнє значення амплітуди епілептиформних подій в контролі становило –  $5.03 \pm 0.66$  мВ, а після додавання антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -холінорецепторів –  $4.38 \pm 0.46$  мВ ( $n = 3, p = 0.18$ ).

Також, аплікація селективних антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -холінорецепторів не мала значущого ефекту на частоту епілептиформних подій (рис. 3.42). Так, в контролі, під час суперфузії зрізів шСМР з бікукуліном частота розрядів дорівнювала  $0.06 \pm 0.01$  с<sup>-1</sup>, а після додавання в розчин MLA та Dh $\beta$ E аналогічний показник станов –  $0.06 \pm 0.03$  с<sup>-1</sup> ( $n = 3, p = 0.82$ ), тобто практично не змінився.

Аплікація антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -холінорецепторів також істотно не вплинула на рівень СА3–СА1-синхронізації польових потенціалів бікукулініндукованої ЕФА. Так, під час суперфузії зрізів шСМР з бікукуліном середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило  $0.31 \pm 0.19$ , після аплікації  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -антагоністів цей показник дорівнював –  $0.28 \pm 0.06$  ( $n = 3, p = 1$ ).

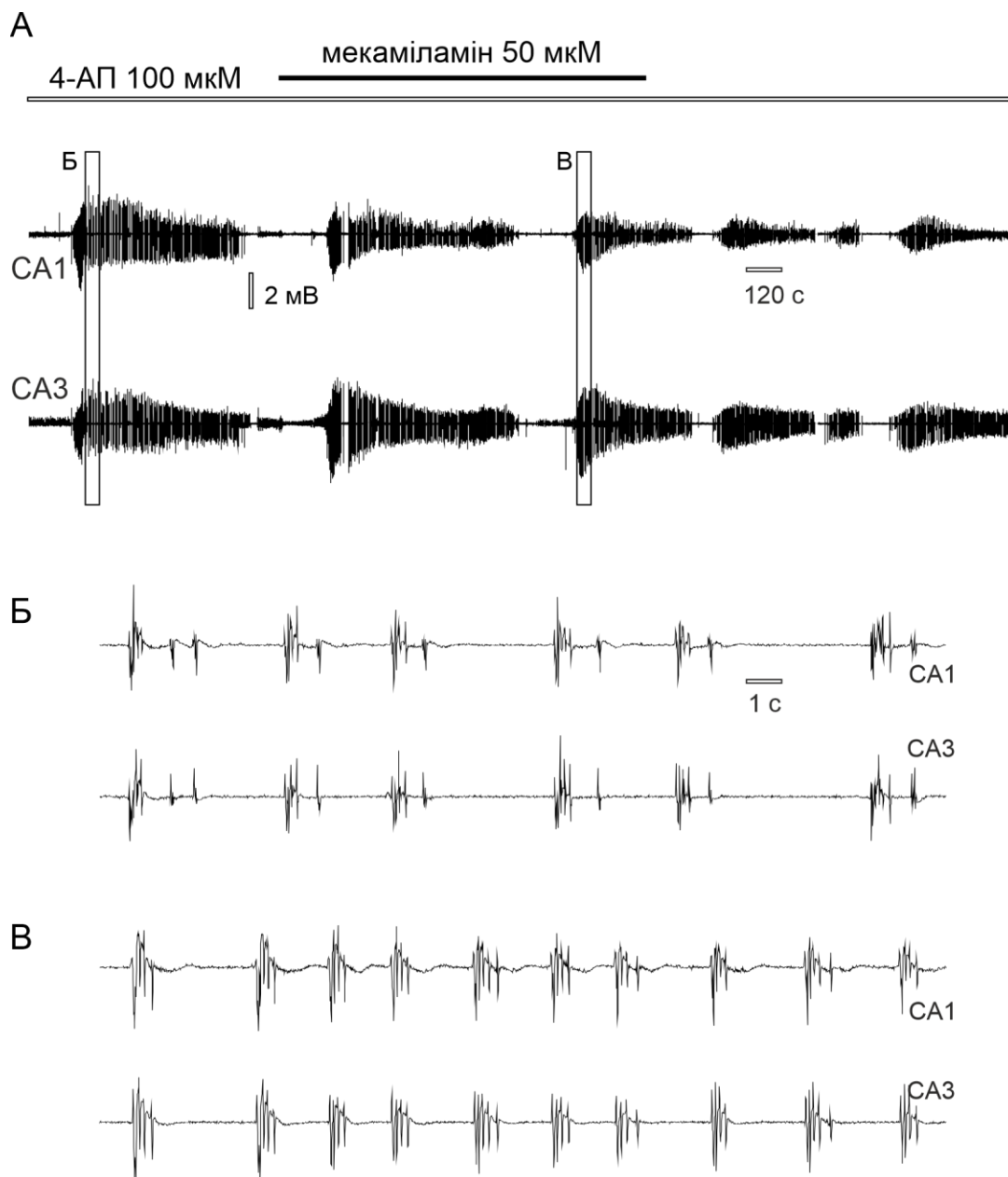
Отже, наведені вище результати свідчать про те, що підтипи  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -холінорецепторів не є такими, що відіграють критичну роль в генерації та синхронізації ЕФА індукованої в розчині з антагоністом ГАМК-рецепторів бікукуліном.

### **3.8 Вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в низькомагнієвому та 4-АП-вмісному розчинах**

В наступних експериментах було досліджено вплив мекаміламіну на інтенсивність ЕФА, яку було індуковано шляхом суперфузії зрізів шСМР з 4-АП або з низьким вмістом магнію.

Аплікація мекаміламіну не вплинула на амплітуду епілептиформних подій під час суперфузії зрізів розчином з 100 мкМ 4-АП (рис. 3.43). Так, в ділянці СА3 амплітуда в контролі становила –  $3.49 \pm 2.09$  мВ, а після додавання в розчин 10 мкМ мекаміламіну –  $2.93 \pm 1.58$  ( $n = 5, p = 0.58$ ). В зоні СА1 амплітуда в контролі

становила  $-1.47 \pm 0.45$  мВ, а після додавання мекаміламіну  $-1.34 \pm 0.61$  ( $n = 5, p = 0.78$ ).



**Рис. 3.43. Вплив аплікації мекаміламіну на 4-АП-індуковану ЕФА. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в зонах СА3 та СА1; Б) епілептиформні розряди індуковані під час суперфузії зрізів з 4-АП; В) епілептиформні розряди в СА1 та СА3 під час аплікації мекаміламіну.**

Аплікація мекаміламіну також не мала значущого ефекту на частоту 4-АП-індукованих спайків. Так, частота епілептиформних подій в контролі становила  $0.36 \pm 0.06 \text{ c}^{-1}$ , після додавання мекаміламіну  $0.33 \pm 0.07 \text{ c}^{-1}$  ( $n = 5, p = 0.58$ ).

Також, аплікація мекаміламіну не мала значущого впливу на рівень СА3–СА1-синхронізації польових потенціалів. Так, під час суперфузії зрізів шСМР з 100 мкМ 4-АП середнє значення коефіцієнта крос-кореляції ЕФА становило  $0.44 \pm 0.17$ , після аплікації мекаміламіну  $0.43 \pm 0.2$  ( $n = 3, p = 1$ ).

Таким чином наведені вище результати свідчать про те, що на відміну від ефекту, що спостерігався в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами, під час суперфузії зрізів шСМР з 4-АП аплікація мекаміламіну не призводить до пригнічення ЕФА та зменшення синхронізації польових потенціалів в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа.

Вплив мекаміламіну на ЕФА індуковану шляхом суперфузії зрізів *низькомагнієвою* шСМР мав модуляційний характер. Так, під час суперфузії зрізів *низькомагнієвим* розчином аплікація мекаміламіну не вплинула на тривалість сплесків ЕФА ( $60.61 \pm 31.98 \text{ c}$  проти  $70.24 \pm 46.65 \text{ c}$ ;  $n = 10, p = 0.28$ ), та призводила до збільшення частоти спайків всередині сплесків ЕФА ( $3.39 \pm 1.40 \text{ c}^{-1}$  проти  $3.97 \pm 0.99 \text{ c}^{-1}$ ;  $n = 10, p = 0.02$ ). Також, аплікація мекаміламіну зумовлювала збільшення частоти епілептиформних розрядів в *низькомагнієвому* розчині, а саме – до зменшення середнього інтервалу між такими розрядами: цей показник становив у контролі  $6.73 \pm 1.74 \text{ c}$  проти  $4.31 \pm 0.54 \text{ c}$  при дії мекаміламіну, ( $n = 10, p = 0.001$ ). Протилежним був ефект мекаміламіну щодо частоти спайків всередині епілептиформних розрядів, індукованих в *низькомагнієвому* розчині ( $8.20 \pm 1.34 \text{ c}^{-1}$  проти  $3.18 \pm 1.26 \text{ c}^{-1}$ ;  $n = 10, p < 0.001$ ). Рівень синхронізації польових потенціалів в зонах СА3 та СА1 під час суперфузії *низькомагнієвою* шСМР та аплікації мекаміламіну також істотно не змінювався ( $0.44 \pm 0.17$  проти  $0.43 \pm 0.20$ ;  $n = 10, p = 0.88$ ).

Таким чином, наведені вище результати вказують на те, що вплив мекаміламіну на ЕФА гіпокампа залежить від способу індукції цієї активності. Так, аплікація мекаміламіну призводила до зменшення амплітуди бікукулініндукованих епілептиформних подій, але не вплинула на інтенсивність 4-АП-індукованої ЕФА. Вплив мекаміламіну на епілептиформні явища в низькомагнієвому розчині мав моделюючий характер. Відсутність істотного впливу мекаміламіну на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, індуковану в 4-АП-вмісному та низькомагнієвому розчинах, вказує на значно меншу роль н-холінорецепторів в СА3–СА1-синхронізації ЕФА в умовах інтактної глутамат- та ГАМКергічної синаптичних передач.



## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### 4.1 Епілептиформна активність в зрізах гіпокампа в умовах повної блокади синаптичної передачі

В дисертаційній роботі було досліджено характеристики ЕФА в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа щурів в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі. Повна блокада синаптичної передачі досягалась шляхом суперфузії зрізів гіпокампа розчином шСМР із низьким вмістом кальцію або кадмійвмісним розчином. Відомо, що вивільнення нейротрансмітера з пресинаптичної терміналі є кальційзалежним процесом, тому зниження концентрації позаклітинного кальцію ( $\leq 0.4$  мМ) або блокада кальцієвих каналів кадмієм є достатніми умовами для пригнічення активної синаптичної передачі [98, 132, 133]. В даній роботі кадмійвмісний розчин було обрано з метою дослідити характеристики ЕФА в гіпокампі за відсутності синаптичної передачі, але в умовах присутності іонів кальцію у позаклітинному середовищі.

В попередніх роботах було показано, що суперфузія зрізів гіпокампа низькокальцієвим розчином викликає тривалу ЕФА в ділянці СА1 гіпокампа [94-97]. В даній роботі було порівняно характеристики ЕФА в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах шСМР [169]. Порівняння електрографічних корелятивів ЕФА в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчині не виявило суттєвих відмінностей між цими двома моделями. Основним проявом гіперсинхронної активності нейронів в обох моделях були популяційні спайки – короткотривалі зсуви позаклітинного потенціала. [169, 170-172].

Латентний час розвитку несинапатичної ЕФА визначався як проміжок часу від початку суперфузії зрізів низькокальцієвим або кадмійвмісним розчином і до

появи перших корелят ЕФА. В даній роботі не було виявлено різниці між латентним часом розвитку епілептиформної синхронізації активності в гіпокампі в залежності від способу блокади синаптичної передачі [169]. Це спостереження свідчить, що відсутність іонів кальцію у позаклітинному середовищі не є критично необхідною умовою для індукції несинаптичної ЕФА [109, 110, 132, 133].

Проте, порівняння частоти популяційних спайків показало, що цей параметр є вищим в низькокальцієвому середовищі, ніж у кадмійвмісному розчині, причому як у СА3, так і в СА1. Відомо, що, окрім блокування синаптичної передачі, зниження концентрації позаклітинного кальцію істотно впливає на збудливість нейронних мембран [95-98, 122, 169]. Така зміна (зменшення концентрації кальцію) веде до зменшення екранування поверхневого заряду, а також зменшує кальційактивовану калієву провідність. Ці два механізми, вірогідно, і пояснюють більші значення частоти популяційних спайків в низькокальцієвому розчині (порівняно з тим, що спостерігається в кадмійвмісному середовищі). Додатково, в попередніх роботах було показано збільшення фарбування пірамідних нейронів жовтим Люцифером (метод кількісної оцінки щілинних контактів між нейронами) в низькокальцієвому розчині [98, 110]. Таким чином, збільшення щілинних контактів між нейронами в низькокальцієвому середовищі – це ще один вірогідний механізм, що сприяє локальній синхронізації нейронів за відсутності синаптичної передачі.

За сучасними уявленнями ЕФА в гіпокампі, що виникає в умовах відсутності синаптичної передачі є наслідком зокрема унікальної цитоархітекtonіки гіпокампа [98, 109, 172]. Ламінарна спрямованість аксонів та щільність розташування пірамідних нейронів сприяють генерації значних позаклітинних електричних потенціалів, достатніх, щоб вплинути на мембрани сусідніх клітин [98, 113, 117].

Зміни в концентрації позаклітинних іонів є ще одним механізмом індукції та розповсюдження несинаптичної ЕФА [98, 120, 126, 130, 131, 133]. В даній роботі було досліджено вплив зміни концентрації позаклітинного магнію на інтенсивність несинаптичної активності в низькокальцієвому середовищі [173-176]. Так, збільшення позаклітинного магнію на 1мМ було достатньо, щоб зменшити інтенсивність ЕФА, індукованої в низькокальцієвій шСМР. Також вірогідність індукції несинаптичної епілептиформної активності зворотно-пропорційно залежала від концентрації позаклітинного магнію. Так, збільшення концентрації позаклітинного магнію до 3 мМ було достатнім, щоб припинити виникнення несинаптичної ЕФА в низькокальцієвому розчині. Вплив концентрації магнію на розвиток несинаптичної ЕФА пов'язують з механізмом екрануванням поверхневого заряду [122, 173-175]. Відомо, що наявність двовалентних катіонів в позаклітинному середовищі компенсує негативний заряд на поверхні мембрани та таким чином впливає на активацію потенціалкерованих каналів. Збільшення позаклітинної концентрації двовалентних катіонів, зокрема магнію, має негативний вплив на генерацію ЕФА. Цей механізм є перспективним інструментом для фармакологічної інтервенції з метою контролю епілептичних станів [120, 176].

Як відомо, епілептичним розладам притаманні неспровоковані судомні напади. Епілептичний статус (судоми протягом 30–60 хв) часто є тригером епілептогенезу – структурних змін нервової тканини, які зумовлюють її подальшу здатність до спонтанної генерації судомної активності. Саме ця властивість ЦНС відрізняє епілепсію як хронічний розлад від симптоматичних, спровокованих судомних нападів. В даній роботі ми моделювали судомну активність проконвульсантом 4-АП та досліджували його вплив на латентний період розвитку несинаптичної ЕФА в низькокальцієвому середовищі [177]. В контрольних умовах, латентний період розвитку несинаптичної ЕФА був більше в СА3 ніж в СА1. Однак, суперфузія зрізів гіпокампа 4-АП протягом 20 хвилин перед початком індукції несинаптичної ЕФА призводила до зменшення

латентного періоду в СА3, але не в СА1. Таким чином, епізоди судомоподібної активності гіпокампа впливають на схильність нейронної мережі до несинаптичної синхронізації.

З'ясування механізмів та умов генерації несинаптичної ЕФА в гіпокампі має як фундаментальне, так і практичне значення. В експериментах *in vivo* було показано, що під час тривалої судомної активності рівень позаклітинного кальцію локально може знизитися до 0.2 мМ, що є достатнім для блокування синаптичної передачі [98, 171]. Таким чином, не виключено, що генерація ЕФА за відсутності синаптичної передачі може відбуватися не лише в експериментальних умовах, але здатна реалізуватися і в умовах клініки, під час розвитку патологічних станів [98, 110, 114-116, 127-129, 175].

## **4.2 Епілептиформна активність в зрізах гіпокампа в умовах часткової блокади синаптичної передачі**

В даній роботі часткове блокування синаптичної передачі забезпечували шляхом суперфузії зрізів гіпокампа шСМР, котра містила суміш антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів. В попередніх дослідження дія позаклітинного середовища з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами розглядалася як альтернативний спосіб індукції ЕФА в несинаптичних умовах, оскільки переважна більшість синаптичних зв'язків у гіпокампі є глутаматергічними та ГАМКергічними [132, 133]. З іншої точки зору, відомо що позаклітинний розчин з вказаними антагоністами не впливає на вивільнення нейротрансмітерів (на відміну від низькокальцієвої та кадмійвмісної шСМР). ЕФА, індукована в таких умовах, не обов'язково буде наслідком дії несинаптичних механізмів. В нашій роботі позаклітинне середовище з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів було обрано, щоб дослідити додаткові механізми синхронізації активності в гіпокампальній нейронній мережі, які, очевидно, були менш помітними в «класичних» моделях індукції ЕФА.

Нам вдалося вперше показати, що ЕФА індукована в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів, має істотно відмінний патерн порівняно з активністю в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах [178]. *Польові розряди* – повільні ритмічні зсуви позаклітинного потенціалу – було зареєстровано виключно під час суперфузії зрізів розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами; натомість популяційні спайки спостерігалися як при повній, так і при частковій блокаді синаптичної передачі.

Наступною значною відмінністю ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами була інтенсивна синхронізація генерації польових розрядів, що виникали в ділянках СА3 та СА1. Аплікація кадмію припиняла СА3–СА1-синхронізацію польових розрядів, що вказує на істотну роль кальцієвих каналів та синаптичну природу генеза польових розрядів. Синхронізація ЕФА в зонах СА3 та СА1 в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів є в певній мірі неочікуваним фактом, якщо взяти до уваги ту обставину, що переважна більшість синаптичних зв'язків між СА3 та СА1 є глутамат- або ГАМКергічними.

В даній роботі також з'ясувалося, як виникають польові розряди в зонах СА3 та СА1 – незалежно (окремо) або ні. Механічне відокремлення ділянки СА3 від СА1 призводило до припинення польових розрядів в СА1, але не в СА3. Ділянка СА3 вважається основним генератором ЕФА в більшості моделей епілепсії *in vitro*. Наші результати вперше демонструють, що ділянка СА3 здатна до генерації та передачі синхронної активності в СА1 незалежно від наявності або відсутності глутамат- та ГАМКергічної передачі.

Сума згаданих фактів (значний рівень синхронізації польових розрядів у зонах СА3 та СА1, пригнічення цієї активності кадмієм та припинення польових розрядів в СА1 після відокремлення від СА3) вказує на наявність додаткового синаптичного механізму, який синхронізує активність вказаних двох ділянок

гіпокампа та не пов'язаний з активацією АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів [178].

### **4.3 Вплив холінергічних антагоністів на епілептиформну активність в гіпокампі**

Ацетилхолін грає важливу роль в модуляції активності гіпокампальної мережі [76, 77, 79]. Вже в середині 20-го сторіччя було відомо про спонтанне вивільнення ацетилхоліну в гіпокампі. Так, було визначено, що в гіпокампі кроликів та котів швидкість спонтанного вивільнення ацетилхоліну складає 0.16 - 0.5 нгр/см<sup>2</sup>/хв [73]. Септо-гіпокампальний шлях є основним джерелом ацетилхоліну в гіпокампі – аксони холінергічних нейронів медіального ядра перегородки формують синаптичні контакти з пірамідними клітинами та інтернейронами гіпокампа [179, 180]. Додатково, значна частина септо-гіпокампальних терміналей не формує чітких синаптичних контактів та бере участь у так званому несинаптичному вивільненні медіатора [76, 181, 182]. Також є окремі експериментальні свідчення щодо наявності в гіпокампі власних холінергічних інтернейронів, однак, як це джерело ацетилхоліну не здатне компенсувати втрату функції при ушкодженні септогіпокампальних волокон, роблячи таким чином аксони септальних нейронів основним джерелом ацетилхоліну в гіпокампі [183-186].

На клітинному рівні дія ацетилхоліну опосередкована двома типами рецепторів – мускаринові та нікотиніві, названі так відповідно до власних агоністів – мускарину і нікотину [76, 79, 80]. Мускаринові рецептори є G-білокспряжені трансмембранні рецептори. На сьогодні відомо п'ять ізоформ мускаринового рецептору – M1-M5. Порівняно з н-холінорецепторами, активація мускаринових рецепторів має більш повільний вплив на нейронну мережу, а ефект на збудливість мембрани залежить від типу спряженого з рецептором G-білка: рецептори M1, M3, M5 спряжені з G<sub>q/11</sub> білком та є збуджувальними;

рецептори M2 та M4 спряжені з  $G_{i/o}$  білком та їх активація має гальмівний ефект [80]. Мускаринові рецептори розташовані пре- та постсинаптично на гіпокампальних нейронах, що також забезпечує різноспрямований вплив на нейронну діяльність. M1 та M3 рецептори, переважно, розташовані на пірамідних клітинах, а M2 та M4 – на інтернейронах [79]. Сумарний ефект аплікації ацетилхоліну на пірамідні нейрони полягає в значній деполяризації мембранного потенціалу а також збільшенні мембранного опору [187]. Ефект активації мускаринових рецепторів на інтернейронах має складний характер та пов'язаний з надзвичайною гетерогенністю популяції гальмівних клітин гіпокампа [63, 188, 189]. Однак подібно до пірамідних клітин більшість інтернейронів відповідають на фармакологічну активацію м-холінорецепторів деполяризацією мембранного потенціалу [80]. Одержані в даній роботі результати показали, що аплікація мускаринового антагоністу атропіну не має значущого впливу на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА, що виникає в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами, проте аплікація неселективних *нікотинових* антагоністів мекаміламіну та тубокурарину призводила до пригнічення польових розрядів та зменшення CA3–CA1-синхронізації ЕФА. В гіпокампі основними підтипами н-холінорецепторів є  $\alpha 7$ ,  $\alpha 4\beta 2$  та  $\alpha 3\beta 4$  [76, 190-197]. В переважній більшості гіпокампальних нейронів експресується  $\alpha 7$ -підтип н-холінорецепторів, пресинаптично та постсинаптично на глутамергічних та ГАМКергічних нейронах [84, 85]. Також,  $\alpha 7$ -підтип експресується постсинаптично в холінергічних синапсах гіпокампа [76, 190-194]. Підтип  $\alpha 4\beta 2$  є другим по розповсюдженості в гіпокампі; цей підтип н-холінорецепторів зустрічається на сомі глутаматергічних нейронів та пресинаптично на ГАМКергічних терміналях [192, 195]. Підтип  $\alpha 3\beta 4$ -н-холінорецепторів також зустрічається на пресинаптичних терміналях глутаматергічних та ГАМКергічних нейронів [191-193, 196].

Аплікація холінергічних агоністів викликає три типи нікотинових струмів на гіпокампальних нейронах. Ці струми поділяють за кінетикою їх десенситизації.

Перших тип струму (IA) має швидку кінетику десенситизації, зустрічається у 83% гіпокампальних клітин та блокується аплікацією  $\alpha$ -бунгаротоксину та метиллікаконітину (MLA). Вважається, що активація  $\alpha 7$ -н-холінорецепторів забезпечує цей струм [192, 194]. Другий тип струму (II) має більш повільну кінетику десенситизації, зустрічається на 10% гіпокампальних нейронів, та залежить від активації  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів, і блокується антагоністом дигідро- $\beta$ -еритроїдином (Dh $\beta$ E) [192, 195]. Третій тип нікотинного струму (III) на гіпокампальних нейронах також має повільну кінетику десенситизації, але блокується мекаміламином, цей струм зустрічається у 2% клітин, та, як вважається, залежить від активації  $\alpha 3\beta 4$ -підтипу холінорецепторів [192, 196, 197].

В даній роботі було порівняно рівень синхронізації ЕФА в синаптичних та несинаптичних умовах, а також було досліджено вплив холінергічних антагоністів на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами [178, 198]. Оскільки в гіпокампі нікотинні рецептори представлені щонайменше трьома підтипами, нами було перевірено, як впливають селективні нікотинні антагоністи на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА. Так, аплікація антагоністів  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не мала істотного впливу на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Це спостереження разом з тим, що аплікація мекаміламіну пригнітила СА3–СА1-синхронізацію польових потенціалів, вказує на можливу роль  $\alpha 3\beta 4$ -підтипу н-холінорецепторів в синхронізації активності нейронів гіпокампа [178].

Ми також дослідили вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в розчинах з бікукуліном, 4-АП та з низьким вмістом магнію. Аплікація мекаміламіну приводила до зменшення амплітуди ЕФА в розчині з бікукуліном, але не в розчині з 4-АП. Вплив мекаміламіну на ЕФА в низькомагнієвому розчині мав різноспрямований характер: частота спайків всередині епілептиформних розрядів зменшилась, а частота епілептиформних явищ всередині сплесків ЕФА збільшилась під дією мекаміламіну. Цей факт вказує на те, що в залежності від



способу індукції ЕФА, н-холінорецептори задіяні різним чином у синхронізацію активності гіпокампа. Факт того, що мекаміламін здатен пригнічувати СА3–СА1-синхронізацію, має істотне практичне значення, адже мекаміламін вже є зареєстрованим фармакологічним засобом, який спочатку було розроблено як антигіпертензивний препарат [199]. В період з 1954 по 1984 компанія Merck випускала мекаміламін в таблетках по 2.5 мг та 10 мг. Антигіпертензивна дія мекаміаміну пов'язана з гангліонарною блокадою синаптичної передачі в симпатичних гангліях, що викликає розширення судин, збільшення периферичного кровообігу та зниження тиску. Однак, в той же час антигіпертензивні дози мекаміаміну (30–90 мг/день) пов'язані з блокадою парасимпатичної активності та викликають небажані побічні ефекти (запор, затримка сечі, сухість у роті, порушення зорової акомодатції) [200]. Через це в 1984 році випуск таблетки мекаміаміну 10-мг було призупинено. В останні роки інтерес дослідників до мекаміаміну відновився [199-206], що було пов'язано з здатністю мекаміаміну в дозах 2.5–10 мг проникати ГЕБ та впливати на нікотинові рецептори в ЦНС, не маючи при цьому побічних ефектів з боку периферичної нервової системи. Сьогодні мекаміламін вивчається як потенційний терапевтичний агент в лікуванні різних форм залежності та зловживання речовинами (алкоголь, кокаїн) [203, 206], вивчається роль мекаміаміну як допоміжного засобу при відмові від куріння [202]. Крім цього досліджується роль мекаміаміну в лікуванні нейропатологічних та психіатричних станів, серед яких депресія, тривожність, біполярні розлади та епілепсія [199, 204, 205]. В даній роботі ми показали, що аплікація мекаміаміну пригнічує СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в умовах блокування глутамат- та ГАМКергічної передачі, а також, зменшує амплітуду бікукулініндукованої ЕФА. Ці дані можуть частково пояснити механізми терапевтичної дії мекаміаміну в ЦНС. Наведені в дисертаційній роботі результати, очевидно, мають певний як фундаментальний, так і практичний інтерес, оскільки вони дозволяють поглибити сучасне розуміння механізмів розвитку ЕФА в гіпокампі та відкривають деякі перспективи у розробці сучасних методів лікування та контролю судомних станів.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати власного дослідження епілептиформної активності (ЕФА), що генерується в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа свіжоізольованих зрізів мозку щурів в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі.

1. В умовах блокування істотної частини синаптичних процесів в результаті аплікації антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів у зонах СА3 та СА1 гіпокампа спостерігається синхронізована ЕФА – польові розряди.
2. Блокування кальцієвої провідності іонами кадмію припиняє синхронізацію ЕФА в зонах СА3–СА1 гіпокампа; цей факт свідчить, що така синхронізація зумовлена синаптичними механізмами, збереженими в умовах дії антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.
3. Неселективні антагоністи нікотинових рецепторів тубокурарин та мекаміламін припиняють СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, що свідчить про участь нікотинових холінорецепторів в синхронізації активності у вказаних зонах гіпокампа. Антагоністи  $\alpha 7$ - та  $\alpha 4\beta 2$ -типів н-холінорецепторів не впливають на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністів, що свідчить про участь холінорецепторів інших підтипів в генерації цієї активності.
4. Мекаміламін пригнічує ЕФА у бікукулініндукованій моделі епілепсії, що свідчить про істотну роль н-холінорецепторів у патологічній синхронізації активності під час епілептичних нападів, викликаних порушеннями ГАМКергічної синаптичної передачі.
5. Нікотинові ацетилхолінові рецептори грають ключову роль у синхронізації ЕФА в різних зонах гіпокампа. В умовах відсутності глутаматергічної та ГАМКергічної синаптичної передачі активація нікотинових рецепторів забезпечує синхронізацію активності нейронних мереж СА3 та СА1. Блокування н-холінорецепторів пригнічує генерацію ЕФА в гіпокампі в моделях епілепсії *in vitro*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Shorvon, Simon D. "The causes of epilepsy: changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years." *Epilepsia* 52.6 (2011): 1033-1044.
2. Fisher, Robert S., et al. "Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* 46.4 (2005): 470-472.
3. Stafstrom, Carl E., and Lionel Carmant. "Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5.6 (2015): a022426.
4. Kanner, Andres M. "When did neurologists and psychiatrists stop talking to each other?" *Epilepsy & Behavior* 4.6 (2003): 597-601.
5. Scheffer, Ingrid E., et al. "ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology." *Zeitschrift Fur Epileptologie* (2018).
6. Fisher, Robert S., et al. "Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology." *Epilepsia* 58.4 (2017): 522-530.
7. Berg, Anne T., et al. "Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009." *Epilepsia* 51.4 (2010): 676-685.
8. Engel Jr, Jerome. "ILAE classification of epilepsy syndromes." *Epilepsy research* 70 (2006): 5-10.
9. Gloor, P., and R. G. Fariello. "Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy." *Trends in neurosciences* 11.2 (1988): 63-68.
10. Foldvary, Nancy, et al. "The localizing value of ictal EEG in focal epilepsy." *Neurology* 57.11 (2001): 2022-2028.
11. Pittau, Francesca, François Dubeau, and Jean Gotman. "Contribution of EEG/fMRI to the definition of the epileptic focus." *Neurology* 78.19 (2012): 1479-1487.

12. Gastaut, Henri, and B. Zifkin. "Classification of the epilepsies." *Drugs for Control of Epilepsy: Actions on Neuronal Networks Involved in Seizure Disorders* (1992): 349-360.
13. Lüders, Hans, et al. "Proposal: different types of alteration and loss of consciousness in epilepsy." *Epilepsia* 55.8 (2014): 1140-1144.
14. Bartolomei, Fabrice, Aileen McGonigal, and Lionel Naccache. "Alteration of consciousness in focal epilepsy: the global workspace alteration theory." *Epilepsy & Behavior* 30 (2014): 17-23.
15. Cavanna, Andrea Eugenio, and Francesco Monaco. "Brain mechanisms of altered conscious states during epileptic seizures." *Nature Reviews Neurology* 5.5 (2009): 267-276.
16. Snead III, O. Carter. "Basic mechanisms of generalized absence seizures." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 37.2 (1995): 146-157.
17. Panayiotopoulos, C. P. "Epileptic syndromes and their treatment." *Neonatal seizures*. Second edition. London (2007): 185-206.
18. Camfield, Peter, and Carol Camfield. "Epileptic syndromes in childhood: clinical features, outcomes, and treatment." *Epilepsia* 43 (2002): 27-32.
19. Kandratavicius, Ludmyla, et al. "Animal models of epilepsy: use and limitations." *Neuropsychiatric disease and treatment* (2014).
20. Shorvon, Simon D. "The etiologic classification of epilepsy." *Epilepsia* 52.6 (2011): 1052-1057. Ottman, Ruth, et al. "Relations of genetic and environmental factors in the etiology of epilepsy." *Annals of neurology* 39.4 (1996): 442-449.
21. Escayg, Andrew, and Alan L. Goldin. "Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms." *Epilepsia* 51.9 (2010): 1650-1658.
22. Dravet, Charlotte. "The core Dravet syndrome phenotype." *Epilepsia* 52 (2011): 3-9.
23. Kellinghaus, C., et al. "Frequency of seizures and epilepsy in neurological HIV-infected patients." *Seizure* 17.1 (2008): 27-33.

24. Pillai, Sekhar C., et al. "Postencephalitic epilepsy and drug-resistant epilepsy after infectious and antibody-associated encephalitis in childhood: clinical and etiologic risk factors." *Epilepsia* 57.1 (2016): e7-e11.
25. Falco-Walter, Jessica J., Ingrid E. Scheffer, and Robert S. Fisher. "The new definition and classification of seizures and epilepsy." *Epilepsy research* 139 (2018): 73-79.
26. Vigeveno, Federico, and Andrea Bartuli. "Infantile epileptic syndromes and metabolic etiologies." *Journal of child neurology* 17 (2002): 3S9-13.
27. Vezzani, Annamaria, et al. "The role of inflammation in epilepsy." *Nature reviews neurology* 7.1 (2011): 31.
28. Vezzani, Annamaria, Bethan Lang, and Eleonora Aronica. "Immunity and inflammation in epilepsy." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 6.2 (2016): a022699.
29. Goldberg, Ethan M., and Douglas A. Coulter. "Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction." *Nature Reviews Neuroscience* 14.5 (2013): 337-349.
30. McNamara, James O., Yang Zhong Huang, and A. Soren Leonard. "Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis." *Science's STKE* 2006.356 (2006): re12-re12.
31. Reddy, Doodipala Samba, and Ramkumar Kuruba. "Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions." *International journal of molecular sciences* 14.9 (2013): 18284-18318.
32. Sutula, Thomas. "Seizure-induced axonal sprouting: assessing connections between injury, local circuits, and epileptogenesis." *Epilepsy currents* 2.3 (2002): 86-91.
33. Romcy-Pereira, R. N., and Norberto Garcia-Cairasco. "Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting or Fluoro-Jade staining." *Neuroscience* 119.2 (2003): 533-546.

34. Maguire, Jamie. "Epileptogenesis: More than just the latent period." *Epilepsy currents* 16.1 (2016): 31-33.
35. Krumholz, Allan. "Nonepileptic seizures: diagnosis and management." *Neurology* 53.5 Suppl 2 (1999): S76-83.
36. Reuber, Markus, and Christian E. Elger. "Psychogenic nonepileptic seizures: review and update." *Epilepsy & Behavior* 4.3 (2003): 205-216.
37. Staley, Kevin. "Molecular mechanisms of epilepsy." *Nature neuroscience* 18.3 (2015): 367-372.
38. Schuele, Stephan U., and Hans O. Lüders. "Intractable epilepsy: management and therapeutic alternatives." *The Lancet Neurology* 7.6 (2008): 514-524.
39. Engel Jr, Jerome. "Introduction to temporal lobe epilepsy." *Epilepsy research* 26.1 (1996): 141-150.
40. Falconer, murray a., eustace a. Serafetinides, and ja nicholas corsellis. "Etiology and pathogenesis of temporal lobe epilepsy." *Archives of neurology* 10.3 (1964): 233-248.
41. Engel Jr, Jerome. "Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?." *The neuroscientist* 7.4 (2001): 340-352.
42. French, J. A., et al. "Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 34.6 (1993): 774-780.
43. Téllez-Zenteno, Jose F., and Lizbeth Hernández-Ronquillo. "A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy." *Epilepsy research and treatment* 2012 (2012).
44. Berkovic, Samuel F., et al. "Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* 29.2 (1991): 175-182.
45. Engelhardt, Elias. "Hippocampus discovery First steps." *Dementia & Neuropsychologia* 10.1 (2016): 58-62.

46. Pearce, J. M. S. "Ammon's horn and the hippocampus." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 71.3 (2001): 351-351.
47. Dossani, Rimal Hanif, Symeon Missios, and Anil Nanda. "The legacy of Henry Molaison (1926–2008) and the impact of his bilateral mesial temporal lobe surgery on the study of human memory." *World neurosurgery* 84.4 (2015): 1127-1135.
48. Corkin, Suzanne. "What's new with the amnesic patient HM?." *Nature reviews neuroscience* 3.2 (2002): 153-160. Annese, Jacopo, et al. "Postmortem examination of patient HM's brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction." *Nature communications* 5.1 (2014): 1-9.
49. Squire, Larry R. "The legacy of patient HM for neuroscience." *Neuron* 61.1 (2009): 6-9.
50. Shah, Bigya, Raman Deep Pattanayak, and Rajesh Sagar. "The study of patient Henry Molaison and what it taught us over past 50 years: Contributions to neuroscience." *Journal of Mental Health and Human Behaviour* 19.2 (2014): 91.
51. Carey, Benedict. "HM, an unforgettable amnesiac, dies at 82." *The New York Times* 4 (2008).
52. Malenka, Robert C. "Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD." *Cell* 78.4 (1994): 535-538.
53. O'Keefe, John, et al. "Place cells, navigational accuracy, and the human hippocampus." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 353.1373 (1998): 1333-1340.
54. Burgess, Neil. "The 2014 Nobel Prize in Physiology or Medicine: a spatial model for cognitive neuroscience." *Neuron* 84.6 (2014): 1120-1125.
55. Broadbent, Nicola J., Larry R. Squire, and Robert E. Clark. "Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests." *Learning & memory* 13.2 (2006): 187-191.
56. Maguire, Eleanor A., Katherine Woollett, and Hugo J. Spiers. "London taxi drivers and bus drivers: a structural MRI and neuropsychological analysis." *Hippocampus* 16.12 (2006): 1091-1101.

57. Tulving, Endel, and Hans J. Markowitsch. "Episodic and declarative memory: role of the hippocampus." *Hippocampus* 8.3 (1998): 198-204.
58. Burgess, Neil, Eleanor A. Maguire, and John O'Keefe. "The human hippocampus and spatial and episodic memory." *Neuron* 35.4 (2002): 625-641.
59. McCormick, Cornelia, et al. "Mind-wandering in people with hippocampal damage." *Journal of Neuroscience* 38.11 (2018): 2745-2754.
60. Buzsáki, György, and David Tingley. "Space and time: The hippocampus as a sequence generator." *Trends in cognitive sciences* 22.10 (2018): 853-869.
61. Staresina, Bernhard P., and Lila Davachi. "Mind the gap: binding experiences across space and time in the human hippocampus." *Neuron* 63.2 (2009): 267-276.
62. Amaral, David G., Norio Ishizuka, and Brenda Claiborne. "Chapter Neurons, numbers and the hippocampal network." *Progress in brain research* 83 (1990): 1-11.
63. Freund, Tamas F., and Gyorgi Buzsaki. "Interneurons of the hippocampus." *Hippocampus* 6.4 (1996): 347-470.
64. Buckmaster, Paul S., et al. "Mossy cell axonal projections to the dentate gyrus molecular layer in the rat hippocampal slice." *Hippocampus* 2.4 (1992): 349-362.
65. Ylinen, Arne, et al. "Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells." *Hippocampus* 5.1 (1995): 78-90.
66. Frotscher, M., E. Soriano, and U. Misgeld. "Divergence of hippocampal mossy fibers." *Synapse* 16.2 (1994): 148-160.
67. Cherubini, Enrico, and Richard Miles Miles. "The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it?." *Frontiers in cellular neuroscience* 9 (2015): 19.
68. Kesner, Raymond P. "Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus." *Learning & memory* 14.11 (2007): 771-781.
69. Barbarosie, Michaela, and Massimo Avoli. "CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures." *Journal of Neuroscience* 17.23 (1997): 9308-9314.



70. Amaral, David G. "Emerging principles of intrinsic hippocampal organization." *Current opinion in neurobiology* 3.2 (1993): 225-229.
71. Yeckel, Mark F., and Theodore W. Berger. "Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.15 (1990): 5832-5836.
72. Vizi, E. Sylvester, and Janos P. Kiss. "Neurochemistry and pharmacology of the major hippocampal transmitter systems: synaptic and nonsynaptic interactions." *Hippocampus* 8.6 (1998): 566-607.
73. Dudar, J. D. "The effect of septal nuclei stimulation on the release of acetylcholine from the rabbit hippocampus." *Brain Research* 83.1 (1975): 123-133.
74. Wagatsuma, Akiko, et al. "Locus coeruleus input to hippocampal CA3 drives single-trial learning of a novel context." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.2 (2018): E310-E316.
75. Donald W. "Neurotransmitters and the hippocampus." *The hippocampus*. Springer, Boston, MA, 1975. 239-268.
76. Teles-Griolo Ruivo, Leonor, and Jack Mellor. "Cholinergic modulation of hippocampal network function." *Frontiers in synaptic neuroscience* 5 (2013): 2.
77. Hasselmo, Michael E. "The role of acetylcholine in learning and memory." *Current opinion in neurobiology* 16.6 (2006): 710-715.
78. Ge, Shaoyu, and John A. Dani. "Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation." *Journal of Neuroscience* 25.26 (2005): 6084-6091.
79. Cobb, Stuart R., and Ceri H. Davies. "Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits." *The Journal of physiology* 562.1 (2005): 81-88.
80. Caulfield, Malcolm P. "Muscarinic receptors—characterization, coupling and function." *Pharmacology & therapeutics* 58.3 (1993): 319-379.
81. Dannenberg, Holger, Kimberly Young, and Michael Hasselmo. "Modulation of hippocampal circuits by muscarinic and nicotinic receptors." *Frontiers in neural circuits* 11 (2017): 102.

82. Griguoli, Marilena, and Enrico Cherubini. "Regulation of hippocampal inhibitory circuits by nicotinic acetylcholine receptors." *The Journal of physiology* 590.4 (2012): 655-666.
83. Yakel, Jerrel L. "Nicotinic ACh receptors in the hippocampal circuit; functional expression and role in synaptic plasticity." *The Journal of physiology* 592.19 (2014): 4147-4153.
84. Albuquerque, Edson X., et al. "Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280.3 (1997): 1117-1136.
85. Picciotto, Marina R., et al. "Nicotinic receptors in the brain: links between molecular biology and behavior." *Neuropsychopharmacology* 22.5 (2000): 451-465.
86. Dulla, Chris G., et al. "How do we use in vitro models to understand epileptiform and ictal activity? A report of the TASK 1-WG 4 group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force." *Epilepsia Open* 3.4 (2018): 460-473.
87. Raimondo, Joseph V., et al. "Methodological standards for in vitro models of epilepsy and epileptic seizures. A TASK 1-WG 4 report of the AES/ILAE Translational Task Force of the ILAE." *Epilepsia* 58 (2017): 40-52.
88. Schwartzkroin, Philip A. "Hippocampal slices in experimental and human epilepsy." *Advances in neurology* 44 (1986): 991-1010.
89. Durand, Dominique. "Ictal patterns in experimental models of epilepsy." *Journal of clinical neurophysiology: official publication of the American Electroencephalographic Society* 10.3 (1993): 281-297.
90. Schwartzkroin, Philip A., ed. *Epilepsy: models, mechanisms and concepts*. Cambridge University Press, 2007.
91. Steinlein, Ortrud K., Sunao Kaneko, and Shinichi Hirose. "Nicotinic acetylcholine receptor mutations." *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. National Center for Biotechnology Information (US), 2012.

92. Mohamed, Nadim, D. Rubin, and Tshilidzi Marwala. "Detection of epileptiform activity in human EEG signals using Bayesian neural networks." *Neural Information Processing-Letters and Reviews* 10.1 (2006): 1-10.
93. Luhmann, H. J., V. I. Dzhala, and Yehezkel Ben-Ari. "Generation and propagation of 4-AP-induced epileptiform activity in neonatal intact limbic structures in vitro." *European Journal of Neuroscience* 12.8 (2000): 2757-2768.
94. Pearce, J. M. S. "Sir Charles Scott Sherrington (1857–1952) and the synapse." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 75.4 (2004): 544-544.
95. Jefferys, J. G. R., and H. L. Haas. "Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission." *Nature* 300.5891 (1982): 448-450.
96. Konnerth, A., U. Heinemann, and Y. Yaari. "Slow transmission of neural activity in hippocampal area CA1 in absence of active chemical synapses." *Nature* 307.5946 (1984): 69-71.
97. Taylor, Charles P., and F. Edward Dudek. "Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses." *Science* 218.4574 (1982): 810-812.
98. Jefferys, J. G. "Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions." *Physiological reviews* 75.4 (1995): 689-723.
99. Bennett, Michael VL. "Gap junctions as electrical synapses." *Journal of neurocytology* 26.6 (1997): 349-366.
100. Andrew, R. David, et al. "Dye transfer through gap junctions between neuroendocrine cells of rat hypothalamus." *Science* 211.4487 (1981): 1187-1189.
101. Llinas, R., R. Baker, and C. Sotelo. "Electrotonic coupling between neurons in cat inferior olive." *Journal of neurophysiology* 37.3 (1974): 560-571.
102. Korn, Henri, Constantino Sotelo, and Francis Crepel. "Electrotonic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus." *Experimental Brain Research* 16.3 (1973): 255-275.
103. Guthrie, Sarah C., and Norton B. Gilula. "Gap junctional communication and development." *Trends in neurosciences* 12.1 (1989): 12-16.

104. Connors, B. W., L. S. Benardo, and D. A. Prince. "Coupling between neurons of the developing rat neocortex." *Journal of Neuroscience* 3.4 (1983): 773-782.
105. Traub, R. D., et al. "Simulation of hippocampal afterdischarges synchronized by electrical interactions." *Neuroscience* 14.4 (1985): 1033-1038.
106. Perez-Velazquez, J. L., Taufik A. Valiante, and Peter L. Carlen. "Modulation of gap junctional mechanisms during calcium-free induced field burst activity: a possible role for electrotonic coupling in epileptogenesis." *Journal of Neuroscience* 14.7 (1994): 4308-4317.
107. Cepeda, Carlos, et al. "Dye-coupling in human neocortical tissue resected from children with intractable epilepsy." *Cerebral Cortex* 3.2 (1993): 95-107.
108. Naus, Christian CG, John F. Bechberger, and David L. Paul. "Gap junction gene expression in human seizure disorder." *Experimental neurology* 111.2 (1991): 198-203.
109. Zhang, Mingming, et al. "Propagation of epileptiform activity can be independent of synaptic transmission, gap junctions, or diffusion and is consistent with electrical field transmission." *Journal of Neuroscience* 34.4 (2014): 1409-1419.
110. Dudek, F. Edward, Thomas Yasumura, and John E. Rash. "Non-synaptic mechanisms in seizures and epileptogenesis." *Cell biology international* 22.11-12 (1998): 793-805.
111. Arvanitaki, A. "Effects evoked in an axon by the activity of a contiguous one." *Journal of neurophysiology* 5.2 (1942): 89-108.
112. Ramon, F., and JOHN W. Moore. "Ephaptic transmission in squid giant axons." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 234.5 (1978): C162-C169.
113. Fox, John E., Marom Bikson, and John GR Jefferys. "Tissue resistance changes and the profile of synchronized neuronal activity during ictal events in the low-calcium model of epilepsy." *Journal of neurophysiology* 92.1 (2004): 181-188.
114. Ostermann, P. O., and C. E. Westerberg. "Paroxysmal attacks in multiple sclerosis." *Brain: a journal of neurology* 98.2 (1975): 189-202.
115. Poser, Charles M., and Vesna V. Brinar. "Epilepsy and multiple sclerosis." *Epilepsy & Behavior* 4.1 (2003): 6-12.

116. Ghezzi, A., et al. "Epilepsy in multiple sclerosis." *European neurology* 30.4 (1990): 218-223.
117. Buzsáki, György, Costas A. Anastassiou, and Christof Koch. "The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes." *Nature reviews neuroscience* 13.6 (2012): 407-420.
118. Tranchina, D., and C. Nicholson. "A model for the polarization of neurons by extrinsically applied electric fields." *Biophysical journal* 50.6 (1986): 1139-1156.
119. Fröhlich, Flavio. "Endogenous and exogenous electric fields as modifiers of brain activity: rational design of noninvasive brain stimulation with transcranial alternating current stimulation." *Dialogues in clinical neuroscience* 16.1 (2014): 93.
120. Talnov, Arkadij N., et al. "Electrolyte therapy reduces spike-and-wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy." *Epilepsy & Behavior* 24.4 (2012): 399-402.
121. Andrew, R. David. "Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects." *Journal of the neurological sciences* 101.1 (1991): 7-18.
122. Isaev, Dmytro, et al. "Surface charge impact in low-magnesium model of seizure in rat hippocampus." *Journal of Neurophysiology* 107.1 (2012): 417-423.
123. Raimondo, Joseph V., et al. "Ion dynamics during seizures." *Frontiers in cellular neuroscience* 9 (2015): 419.
124. Blanke ML, VanDongen AMJ. Activation Mechanisms of the NMDA Receptor. In: Van Dongen AM, editor. *Biology of the NMDA Receptor*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5274/>
125. Collingridge, G. L., and T. V. P. Bliss. "Memories of NMDA receptors and LTP." *Trends in neurosciences* 18.2 (1995): 54-56.
126. Mody, I., J. D. C. Lambert, and U. Heinemann. "Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices." *Journal of neurophysiology* 57.3 (1987): 869-888.

127. Arieff, Allen I., and Barbara A. Kronlund. "Fatal child abuse by forced water intoxication." *Pediatrics* 103.6 (1999): 1292-1295.
128. Farrell, D. J., and L. Bower. "Fatal water intoxication." *Journal of clinical pathology* 56.10 (2003): 803-804.
129. Helwig, Ferdinand C., Carl Bryant Schutz, and Dwight E. Curry. "Water intoxication: report of a fatal human case, with clinical, pathologic and experimental studies." *Journal of the American Medical Association* 104.18 (1935): 1569-1575.
130. Tancredi, V., and M. Avoli. "Control of spontaneous epileptiform discharges by extracellular potassium: an "in vitro" study in the CA1 subfield of the hippocampal slice." *Experimental brain research* 67.2 (1987): 363-372.
131. Durand, Dominique M., Eun-Hyoung Park, and Alicia L. Jensen. "Potassium diffusive coupling in neural networks." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365.1551 (2010): 2347-2362.
132. Bikson, Marom, Scott C. Baraban, and Dominique M. Durand. "Conditions sufficient for nonsynaptic epileptogenesis in the CA1 region of hippocampal slices." *Journal of neurophysiology* 87.1 (2002): 62-71.
133. Xiong, Zhi-Qi, and Janet L. Stringer. "Prolonged bursts occur in normal calcium in hippocampal slices after raising excitability and blocking synaptic transmission." *Journal of neurophysiology* 86.5 (2001): 2625-2628.
134. Shiobara, Ryuzo, et al. "Development of artificial cerebrospinal fluid: basic experiments, and phase II and III clinical trials." *Journal of Neurology & Neurophysiology* 4.5 (2013): 1-9.
135. Bjorefeldt, Andreas, et al. "Human cerebrospinal fluid increases the excitability of pyramidal neurons in the in vitro brain slice." *The Journal of physiology* 593.1 (2015): 231-243.
136. Wang, Ting, and Ira S. Kass. "Preparation of brain slices." *Neurotransmitter methods*. Springer, Totowa, NJ, 1997. 1-14.
137. Madison, Daniel V., and Eleanore B. Edson. "Preparation of hippocampal brain slices." *Current protocols in neuroscience* 1 (1997): 6-4.

138. Aitken, P. G., et al. "Preparative methods for brain slices: a discussion." *Journal of neuroscience methods* 59.1 (1995): 139-149.
139. Newman, George C., et al. "Preservation of hippocampal brain slices with in vivo or in vitro hypothermia." *Brain research* 575.1 (1992): 159-163.
140. Dong, Wei-Qiang, et al. "The rat hippocampal slice preparation as an in vitro model of ischemia." *Stroke* 19.4 (1988): 498-502.
141. Schwartzkroin, Philip A. "Hippocampal slices in experimental and human epilepsy." *Advances in neurology* 44 (1986): 991-1010.
142. Kubová, Hana, and Solomon L. Moshé. "Experimental models of epilepsy in young animals." *Journal of Child Neurology* 9.1\_suppl (1994): S3-S11.
143. Brioni, Jorge D., et al. "A clinical review of inhalation anesthesia with sevoflurane: from early research to emerging topics." *Journal of anesthesia* 31.5 (2017): 764-778.
144. Traub, Roger D., Robert KS Wong, and Richard Miles. "In vitro models of epilepsy." *Neurotransmitters and Epilepsy*. Humana Press, Totowa, NJ, 1987. 161-190.
145. Heuzeroth, Hanno, et al. "The 4-aminopyridine model of acute seizures in vitro elucidates efficacy of new antiepileptic drugs." *Frontiers in neuroscience* 13 (2019): 677.
146. Gonzalez-Sulser, Alfredo, et al. "The 4-aminopyridine in vitro epilepsy model analyzed with a perforated multi-electrode array." *Neuropharmacology* 60.7-8 (2011): 1142-1153.
147. Wahab, Abdul, et al. "In search of models of pharmacoresistant epilepsy." *Epilepsia* 51 (2010): 154-159.
148. Armstrong, Clay M., and Andrey Loboda. "A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action." *Biophysical journal* 81.2 (2001): 895-904.
149. D'Adamo, Maria Cristina, et al. "K<sup>+</sup> channelepsy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy." *Frontiers in cellular neuroscience* 7 (2013): 134.

150. Yamaguchi, Shun-ichi, and Michael A. Rogawski. "Effects of anticonvulsant drugs on 4-aminopyridine-induced seizures in mice." *Epilepsy research* 11.1 (1992): 9-16.
151. Nuytten, D., et al. "Magnesium deficiency as a cause of acute intractable seizures." *Journal of neurology* 238.5 (1991): 262-264.
152. Canelas, Horacio M., Luís Marques De Assis, and Francisco B. De Jorge. "Disorders of magnesium metabolism in epilepsy." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 28.4 (1965): 378.
153. Igelström, Kajsa M., Cristina H. Shirley, and Philip M. Heyward. "Low-magnesium medium induces epileptiform activity in mouse olfactory bulb slices." *Journal of neurophysiology* 106.5 (2011): 2593-2605.
154. Straub, H., et al. "Low-magnesium-induced epileptiform activity in the human neocortex maintained in vitro: suppression by the organic calcium antagonist verapamil." *Journal of Epilepsy* 5.3 (1992): 166-170.
155. Gean, Po-Wu, and Patricia Shinnick-Gallagher. "Characterization of the epileptiform activity induced by magnesium-free solution in rat amygdala slices: an intracellular study." *Experimental neurology* 101.2 (1988): 248-255.
156. Tancredi, Virginia, et al. "Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features." *Brain research* 511.2 (1990): 280-290.
157. Deeb, Tarek Z., Jamie Maguire, and Stephen J. Moss. "Possible alterations in GABAA receptor signaling that underlie benzodiazepine-resistant seizures." *Epilepsia* 53 (2012): 79-88.
158. Deshpande, Laxmikant S., et al. "Development of pharmacoresistance to benzodiazepines but not cannabinoids in the hippocampal neuronal culture model of status epilepticus." *Experimental neurology* 204.2 (2007): 705-713.
159. Reddy, Doodipala Samba, and Ramkumar Kuruba. "Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions." *International journal of molecular sciences* 14.9 (2013): 18284-18318.



160. Baram, Tallie Z., and O. Carter Snead III. "Bicuculline induced seizures in infant rats: ontogeny of behavioral and electrocortical phenomena." *Developmental brain research* 57.2 (1990): 291-295.
161. Avoli, Massimo, and John GR Jefferys. "Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro." *Journal of neuroscience methods* 260 (2016): 26-32.
162. Samoilova, Marina, et al. "Epileptiform activity in hippocampal slice cultures exposed chronically to bicuculline: increased gap junctional function and expression." *Journal of neurochemistry* 86.3 (2003): 687-699.
163. Hájos, Norbert, and Istvan Mody. "Establishing a physiological environment for visualized in vitro brain slice recordings by increasing oxygen supply and modifying aCSF content." *Journal of neuroscience methods* 183.2 (2009): 107-113.
164. Stringer, Janet L., and Eric W. Lothman. "Epileptiform discharges induced by altering extracellular potassium and calcium in the rat hippocampal slice." *Experimental neurology* 101.1 (1988): 147-157.
165. Schwindel, C. Daniela, et al. "Long-term recordings improve the detection of weak excitatory–excitatory connections in rat prefrontal cortex." *Journal of Neuroscience* 34.16 (2014): 5454-5467.
166. Toyama, K., M. Kimura, and K. Tanaka. "Cross-correlation analysis of interneuronal connectivity in cat visual cortex." *Journal of Neurophysiology* 46.2 (1981): 191-201.
167. Lian, Jun, et al. "Propagation of non-synaptic epileptiform activity across a lesion in rat hippocampal slices." *The Journal of physiology* 537.Pt 1 (2001): 191.
168. Stephanie Glen. "Lowess Smoothing in Statistics: What is it?" From *StatisticsHowTo.com: Elementary Statistics for the rest of us!*  
<https://www.statisticshowto.com/lowess-smoothing>
169. Zapukhliak, O.S. & Netsyk, O.V. & Isaev, D.S.. (2020). Nonsynaptic epileptiform activity in CA3-CA1 regions of the hippocampus in low-Ca<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>-containing milieu. *Fiziologichnyĭ zhurnal*. 66. 21-26. 10.15407/fz66.2-3.021.

170. Haas, H. L., and J. G. Jefferys. "Low-calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices." *The Journal of physiology* 354.1 (1984): 185-201.
171. Feng, Zhouyan, and Dominique M. Durand. "Low-calcium epileptiform activity in the hippocampus in vivo." *Journal of neurophysiology* 90.4 (2003): 2253-2260.
172. Cain, Stuart M., and Terrance P. Snutch. "T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828.7 (2013): 1572-1578.
173. Isaeva, Elena, et al. "Effect of neuraminidase treatment on persistent epileptiform activity in the rat hippocampus." *Pharmacological Reports* 63.3 (2011): 840-844.
174. Isaev, Dmytro, et al. "Neuroaminidase reduces interictal spikes in a rat temporal lobe epilepsy model." *Epilepsia* 52.3 (2011): e12-e15.
175. Misra, Usha Kant, and Jayantee Kalita. "Management of provoked seizure." *Annals of Indian Academy of Neurology* 14.1 (2011): 2.
176. Zapukhliak, O. S., et al. "Surface charge impact in nonsynaptic model of epilepsy in rat hippocampus." *Fiziolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine: 1994)* 62.2 (2016): 35-40.
177. Zapukhliak, O. S., et al. "Modulation of the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform synchronization in low-calcium model of epilepsy." *Fiziolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine: 1994)* 62.6 (2016): 19-24.
178. Zapukhliak O, Netsyk O, Romanov A, Maximyuk O, Oz M, Holmes GL, et al. Mecamylamine inhibits seizure-like activity in CA1-CA3 hippocampus through antagonism to nicotinic receptors. *PLoS ONE*. 2021; 16(3): e0240074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240074>
179. Nicoll, Roger A. "The septo-hippocampal projection: a model cholinergic pathway." *Trends in Neurosciences* 8 (1985): 533-536.
180. Smith, Christine Mary. "Acetylcholine release from the cholinergic septo-hippocampal pathway." *Life sciences* 14.11 (1974): 2159-2166.

181. Lendvai, Balázs, and E. Sylvester Vizi. "Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors." *Physiological reviews* 88.2 (2008): 333-349.
182. Vizi, E. Sylvester, Janos P. Kiss, and Balazs Lendvai. "Nonsynaptic communication in the central nervous system." *Neurochemistry international* 45.4 (2004): 443-451.
183. Frotscher, Michael, Michael Schlander, and Csaba Léránth. "Cholinergic neurons in the hippocampus." *Cell and tissue research* 246.2 (1986): 293-301.
184. Frotscher, M. "Cholinergic neurons in the rat hippocampus do not compensate for the loss of septohippocampal cholinergic fibers." *Neuroscience letters* 87.1-2 (1988): 18-22.
185. Blusztajn, Jan Krzysztof, and Jasmine Rinnofner. "Intrinsic cholinergic neurons in the hippocampus: fact or artifact?." *Frontiers in synaptic neuroscience* 8 (2016): 6.
186. Blaker, S. N., D. M. Armstrong, and F. H. Gage. "Cholinergic neurons within the rat hippocampus: Response to fimbria-fornix transection." *Journal of Comparative Neurology* 272.1 (1988): 127-138.
187. Cole, ALISON E., and R. A. Nicoll. "Characterization of a slow cholinergic post-synaptic potential recorded in vitro from rat hippocampal pyramidal cells." *The Journal of physiology* 352.1 (1984): 173-188.
188. McMahon, Lori L., John H. Williams, and Julie A. Kauer. "Functionally distinct groups of interneurons identified during rhythmic carbachol oscillations in hippocampus in vitro." *Journal of Neuroscience* 18.15 (1998): 5640-5651.
189. Frotscher, M., I. Vida, and R. Bender. "Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus." *Neuroscience* 96.1 (2000): 27-31.
190. Albuquerque, Edson X., et al. "Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280.3 (1997): 1117-1136.
191. Zoli, Michele, et al. "Identification of four classes of brain nicotinic receptors using  $\beta$ 2 mutant mice." *Journal of Neuroscience* 18.12 (1998): 4461-4472.

192. Alkondon, Manickavasagam, et al. "Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices." *Journal of Neuroscience* 19.7 (1999): 2693-2705.
193. Sudweeks, Sterling N., and Jerrel L. Yakel. "Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons." *The Journal of physiology* 527.3 (2000): 515-528.
194. Fabian-Fine, Ruth, et al. "Ultrastructural distribution of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus." *Journal of Neuroscience* 21.20 (2001): 7993-8003.
195. Alkondon, M. "Albuquerque EX." Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 86 (2001): 3043-3055.
196. Alkondon, Manickavasagam, and Edson X. Albuquerque. "A non- $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor modulates excitatory input to hippocampal CA1 interneurons." *Journal of neurophysiology* 87.3 (2002): 1651-1654.
197. Ji, Daoyun, and John A. Dani. "Inhibition and disinhibition of pyramidal neurons by activation of nicotinic receptors on hippocampal interneurons." *Journal of neurophysiology* 83.5 (2000): 2682-2690.
198. Zapukhliak, O. S., O. V. Netsyk, and D. S. Isaev. "Synchronization of epileptiform activity between CA1 and CA3 hippocampal fields under synaptic and non-synaptic conditions in rat brain slices." *Medical Science of Ukraine (MSU)* 16.1 (2020): 3-7.
199. Shytle, R. D., et al. "Mecamylamine (Inversine®): an old antihypertensive with new research directions." *Journal of human hypertension* 16.7 (2002): 453-457.
200. Schneckloth, Roland E., et al. "Mecamylamine in Treatment of Hypertensive Disease: Observations on an Unusual Neuromuscular Complication." *Journal of the American Medical Association* 162.9 (1956): 868-875.

201. Bacher, Ingrid, et al. "Mecamylamine—a nicotinic acetylcholine receptor antagonist with potential for the treatment of neuropsychiatric disorders." *Expert opinion on pharmacotherapy* 10.16 (2009): 2709-2721.
202. Nickell, Justin R., et al. "Potential therapeutic uses of mecamylamine and its stereoisomers." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 108 (2013): 28-43.
203. Petrakis, Ismene L., et al. "Mecamylamine treatment for alcohol dependence: a randomized controlled trial." *Addiction* 113.1 (2018): 6-14.
204. Aboul-Fotouh, Sawsan. "Behavioral effects of nicotinic antagonist mecamylamine in a rat model of depression: prefrontal cortex level of BDNF protein and monoaminergic neurotransmitters." *Psychopharmacology* 232.6 (2015): 1095-1105.
205. Newman, Mary B., et al. "Anxiolytic effects of mecamylamine in two animal models of anxiety." *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 10.1 (2002): 18.
206. Reid, Malcolm S., et al. "A nicotine antagonist, mecamylamine, reduces cue-induced cocaine craving in cocaine-dependent subjects." *Neuropsychopharmacology* 20.3 (1999): 297-307.
207. Newman, Mary B., et al. "Nicotine induced seizures blocked by mecamylamine and its stereoisomers." *Life sciences* 69.22 (2001): 2583-2591.