

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СЕМЕНІХІНА Маргарита Олексіївна

УДК 612.82:576.54:577.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ ПРОТЕАЗААКТИВОВАНИХ РЕЦЕПТОРІВ ПЕРШОГО
ТИПУ У ПАТОГЕНЕЗІ ПОВЕДІНКОВИХ РОЗЛАДІВ,
СПРИЧИНЕНИХ ЕПІЛЕПТИЧНИМ СТАТУСОМ**

Спеціальність 091 – Біологія

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 _____ Семеніхіна М.О.

Науковий керівник: **Ісаєва Олена Валентинівна**, доктор біологічних наук, провідний науковий співробітник

Максимюк Олександр Петрович, кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Семеніхіна М.О. Роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових розладів, спричинених епілептичним статусом – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 091 – біологія. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена визначенню ролі протеазаактивованих рецепторів першого типу (ПАР1) у патогенезі поведінкових розладів, розвиток яких спричинений епілептичним статусом (ЕС). З використанням методів дослідження поведінкових реакцій та електрофізіологічних методів було досліджено вплив фармакологічної блокади ПАР1 під час латентної стадії формування скроневої епілепсії у молодих тварин.

В роботі було досліджено ефект епілептичного статусу та фармакологічної блокади ПАР1 такі поведінкові реакції як соціальна поведінка (досліджували такі параметри, як соціальність загалом та реакція на соціальну новизну безпосередньо), формування просторової пам'яті (з використанням водного лабіринту Морріса з використанням чотири-денного протоколу) та умовної реакції страху (використовували триденний протокол тестування), рівень тривожності та емоційної збудливості (у тестах «відкрите поле», «припіднятий хрестоподібний лабіринт» та серії тестів поведінкової збудливості), та такі електрофізіологічні показники як синаптична ефективність, довготривала та короткотривала пластичність синаптичних мереж радіального шару зони СА1 гіпокампа.

В роботі вперше було показано, що фармакологічне блокування ПАР1 в період епілептогенезу нормалізує рівень тривожності та загальної емоційної збудливості молодих щурів, порушений як наслідок епілептичного статусу. Було продемонстровано, що пригнічення функції ПАР1 не впливає на порушення соціальної поведінки та здатності до

формування орієнтувальної навички, які є типовими супутніми розладами при епілепсії. Таким чином, було зроблено висновок щодо можливого вкладу PAR1 у механізми роботи вентральної та центральної частин гіпокампа, та подальша робота була зосереджена на електрофізіологічних дослідженнях синаптичної пластичності даної структури. Вперше було продемонстровано, що фармакологічна блокада PAR1 в період епілептогенезу у молодих тварин значно підвищує ймовірність виникнення потенціації у зоні CA1 гіпокампа, зниженої унаслідок розвитку епілепсії, та відновлює рівень короткотривалої синаптичної потенціації в умовах парної стимуляції та довготривалої синаптичної потенціації до контрольного рівня.

Ключові слова: епілептичний статус; літій-пілокарпінова модель; гіпокамп; зрізи гіпокампа, протеазаактивований рецептор 1; синаптична передача, синаптична пластичність; тривожність; соціальні реакції; просторова пам'ять.

ABSTRACT

Semenikhina M.O. The role of protease-activated receptor 1 in behavioral impairments following status epilepticus. – Manuscript. A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty – 091– Biology – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2020.

The aim of the present work was to determine the role of protease-activated receptor 1 (PAR1) in status epilepticus (SE)-induced behavioral comorbidities. Using different approaches to study animal behavior and electrophysiological techniques we studied the effect of PAR1 inhibition on different behavioral measures such as the level of anxiety and emotion excitability (open field, elevated plus maze and behavioral excitability tests), contextual and cued fear learning (with 3-days testing protocol), spatial learning and sociability (Morris water maze test); and electrophysiological

parameters: synaptic efficacy, short- and long-term plasticity of hippocampal CA3-CA1 synapses.

Here we showed that inhibition of PAR1 during epileptogenesis abolished the alteration of the anxiety level and behavioral excitability in rats experiencing SE. We also demonstrated that PAR1 inhibition does not affect social behavior impairment and spatial learning deficits in rat model of SE. Using electrophysiological approaches, we showed that the downregulation PAR1-dependent signaling prevents the alteration of plasticity of hippocampal CA3-CA1 synapses in rats with SE which might represent the cellular correlate of epilepsy-related behavioral deficits.

Keywords: status epilepticus; lithium-pilocarpine model; hippocampus; hippocampal slices; protease-activated receptor 1; synaptic plasticity; synaptic transmission; anxiety; social reactions; spatial memory.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні результати роботи:

1. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., AlKury L.T., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. (2018) Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus. *Neurosci. Lett.* DOI: 10.1016/j.neulet.2018.10.058

Автором виконано моделювання епілептичного статусу, проведення поведінкових тестів та електрофізіологічних досліджень, обробка відеоматеріалів поведінкових тестів та обробка електрофізіологічних записів, статистичне опрацювання отриманих результатів та підготовка матеріалів дослідження до друку.

2. M.O. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, O.V. Stasyshyn, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, *Fiziol. Zh.* 2018; 64(6): 17-22. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz64.06.017>

Автором виконано моделювання епілептичного статусу, проведення поведінкових тестів, підготовка матеріалів до друку та написання тексту статті.

3. M. Semenikhina, R. Bogovik, M. Fedoryuk, O. Lunko, A. Savotchenko, E. Isaeva. Pharmacological blockade of protease-activated receptors 1 normalizes behavioral hyperexcitability of rats in the latent stage of the experimental model of temporal lobe epilepsy, *Fiziol. Zh.* 2019; 65(3): 7-11. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.03.007>

Автором виконано моделювання епілептичного статусу, проведення поведінкових тестів, аналіз та статистична обробка матеріалів, отриманих в процесі експерименту, підготовка матеріалів до друку та написання тексту статті.

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. E. Isaeva, M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, Lina T. AlKury, A. Savotchenko, O. Krishtal. Protease-activated receptor 1 inhibition rescues impaired synaptic plasticity and anxiety-related behavior but does not affect spatial learning deficit in juvenile rat after status epilepticus. *SfN meeting, Chicago, USA, 2019.*

2. M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 restores hippocampal synaptic plasticity and converts behaviour deficits in a model of temporal lobe epilepsy, *35th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine Rare diseases: From mechanisms to therapy and beyond, Cologne, Germany, 2019.*

3. M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of PAR1 restores hippocampal synaptic plasticity and affects emotionally-modulated behavior in rat at lithium-pilocarpine model of status epilepticus, *20-й з'їзд Українського фізіологічного товариства, Київ, Україна, 2019.*

4. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Isaeva E. Inhibition of par1 affects on emotionally-

modulated behaviour and synaptic plasticity in rat at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, Україна, 2018.

5. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus, Oxford autumn school in neuroscience, Oxford, UK, 2018.

6. M.O. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, International scientific and practical forum "Ukraine of the future", Berdyans'k, Ukraine, 2018.

7. Semenikhina M., Bogovyk R., Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 affect on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus, Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology, Kyiv, Ukraine, 2018.

8. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, Ruslan Bogovyk, Mykhailo Fedoriuk, Elena Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 affects on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus Scientific activity for forming Professional competence of future profession, Sumy – 2017, Sumy, Ukraine, 2017.

9. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, Ruslan Bogovyk, Mykhailo Fedoriuk and Elena Isaeva Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on the synaptic plasticity following status epilepticus in young adult rat, VII International Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, Ukraine, 2017.

ЗМІСТ

ЗМІСТ	7
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	9
ВСТУП.....	12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	19
1.1. Сучасні концепції розуміння поведінкових розладів при епілепсії	19
1.1.1. Розлади емоційно-зумовленої поведінки	19
1.1.2. Розлади соціальної поведінки	20
1.1.3. Когнітивні розлади	20
1.2. Особливості розвитку набутої епілепсії в період статевого дозрівання	21
1.3. Епілептичний статус та його ускладнення.....	22
1.3.1. Патологічні порушення, що супроводжують розвиток ЕС	25
1.3.2. Механізми епілептогенезу	28
1.3.4. Зміни синаптичної пластичності при епілепсії.....	33
1.4. Гіпокамп та його роль у формуванні поведінкових реакцій.....	36
1.4.1. Морфологічні та фізіологічні особливості гіпокампа	36
1.4.2. Функції гіпокампа	39
1.4.3. Синаптична пластичність гіпокампа	40
1.5. Протеази в ЦНС та їх рецептори	50
1.5.1. Протеазаактивований рецептор 1	53
1.5.2. Локалізація PAR1 в зонах, задіяних у регуляції емоційно-мотивованої поведінки.....	56

1.5.3. Роль ПАР1 та механізми участі ПАР1 у регуляції поведінкових реакцій	57
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	61
2.1. Експериментальні тварини	61
2.2. Індукція епілептичного статусу.....	62
2.3. Поведінкові тести	64
2.3.1. Тести на збудливість	64
2.3.2. Тести на рівень тривожності.....	66
2.3.3. Водний тест (лабіринт) Моріса.....	68
2.3.4. Тест «перегородка»	70
2.3.5. Тест на дослідження обумовленого страху.....	71
2.4. Метод отримання свіжоізолюваних зрізів	72
2.5. Електрофізіологічні дослідження	73
2.6. Хімічні реактиви.....	76
2.7. Методи статистичного аналізу	78
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	80
3.1. Наслідки епілептичного статусу, індукованого у молодому віці, та ефект блокування ПАР1, щодо поведінкових реакцій щурів	80
3.1.1. Зміни поведінкової збудливості щурів після епілептичного статусу та внаслідок блокування ПАР1	80
3.1.2. Ефект блокування ПАР1 на рівень тривожності щурів, модифікований викликаним епілептичним статусом.	84
3.1.3. Вплив ЕС на здатність тварин до формування умовної реакції страху та ефект фармакологічної блокади ПАР1 на здатність до формування умовної реакції.....	88

3.1.4. Ефект блокування PAR1 на просторову пам'ять та формування орієнтувальної навички.....	90
3.1.5. Вплив ЕС та фармакологічної блокади PAR1 на параметри соціальної поведінки щурів	91
3.2. Ефект блокування PAR1 на процеси синаптичної пластичності гіпокампа	95
3.2.1. Ефект блокування PAR1 на показники синаптичної ефективності...	95
3.2.2. Зміни короткотривалої пластичності зони CA1 гіпокампа щурів внаслідок ЕС та блокування PAR1.....	98
3.2.3. Вплив ЕС та блокування PAR1 на посттетанічну потенціацію у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа	99
3.2.4. Роль ЕС та фармакологічної блокади PAR1 у модуляції параметрів довготривалої пластичності у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа	101
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	106
4.1. Вплив епілептичного статусу, індукованого у молодому віці, на афективну поведінку щурів	107
4.2. Патологічні зміни синаптичної пластичності гіпокампа, що розвиваються внаслідок епілептичного статусу у молодому віці	110
4.3. Ефект блокування PAR1 на емоційно-зумовлену поведінку після епілептичного статусу.....	113
4.4. Вплив блокування PAR1 в період епілептогенезу на зміни синаптичної пластичності гіпокампа внаслідок епілептичного статусу...	115
ВИСНОВКИ	119
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	121

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПАР1	—	протеазаактивований рецептор першого типу
ACSF	—	штучна спинно-мозкова рідина
ВПСП	—	викликаний постсинаптичний потенціал
ПТП	—	постетанічна потенціація
ПП	—	короткотривала потенціація в умовах парної стимуляції
ФСП	—	фасилітація після парної стимуляції
ПДЗ	—	пароксизмальний деполяризаційний зсув
АМРА	—	α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
ГАМК	—	γ -аміномасляна кислота
ГАМК-А	—	А субодиниця γ -аміномасляної кислоти
ГАМК-В	—	В субодиниця γ -аміномасляної кислоти
ГАМК-С	—	С субодиниця γ -аміномасляної кислоти
НМДА	—	N-метил-D-аспартат
NR2A	—	2A субодиниця НМДА-рецептора
NR2B	—	2B субодиниця НМДА-рецептора
NR1	—	N1 субодиниця НМДА-рецептора
ЦНС	—	центральна нервова система
G-білок	—	гуаніннуклеотид зв'язуючий білок.
ПД	—	потенціал дії
ЕЕГ	—	електроенцефалограмма
ЧМТ	—	черепно-мозкова травма
ЦНС	—	центральна нервова система
ВГ	—	вентральний гіпокамп
ДГ	—	дорзальний гіпокамп
РАС	—	розлада аутистичного спектру
ЕС	—	епілептичний статус

МРТ	—	магнітно-резонансна томографія
CaMKII	—	кальцій/кальмодулін(CaM)-залежна протеїнкіназа II
SCH	—	SCH79797
ВЛМ	—	водний лабіринт Морріса

ВСТУП

Епілепсія є хронічним станом, який характеризується повторюваними неспровокованими епілептичними нападами. Наразі понад 70 000 000 людей у світі хворі на епілепсію, та понад 10 % населення планети зазнавали епілептичні напади хоча б раз у житті. Епілептичний напад може розвинутися внаслідок таких станів як мозкова травма, лихоманка, низький рівень цукру в крові, відмова від алкоголю чи наркотиків, що в свою чергу може провокувати повторювані напади, які значно знижують якість життя пацієнтів та призводять до різноманітних патологічних змін у центральній нервовій системі (ЦНС).

Найбільш розповсюдженою формою парціальної епілепсії у дорослих у світі є скронева епілепсія. Внаслідок розвитку захворювання першими вражаються такі відділи лімбічної системи як гіпокамп, мигдалеподібний комплекс та скронева кора, тобто зони мозку, які є відповідальними за обробку емоційно-зумовлених реакцій та пам'яті. Епілепсія загалом та власне скронева епілепсія має різноманітну та часто невизначену етіологію, але часто ключову роль у розвитку хвороби відіграє порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ).

Хворі на епілепсію зтикаються з такими психоневрологічними розладами як депресія, тривожність (у тому числі – соціальна), деякі з пацієнтів відмічають підвищення агресивності. Відповідно до «Діагностичного та статистичного керівництва по психічним розладам (DSM-V)» серед пацієнтів зі скроневою епілепсією 70 % мають один або більше супутніх неврологічних розладів; 58 % – мають в анамнезі депресивні епізоди, 32 % – страждають на агорафобію або інші побічні тривожні розлади, а у 13 % пацієнтів діагностовано психози. Ризик психозу у хворих, що страждають на епілепсію у 6-12 разів вище, ніж серед населення в цілому.

Такі статистичні дані вказують на те, що у багатьох випадках зниження якості життя пацієнтів з епілепсією пов'язано у більшій мірі із розвитком супутніх психоневрологічних розладів, ніж із наявністю власне епілептичних нападів. Тому важливим є пошук терапевтичних мішеней, які б не лише допомагали знизити частоту та інтенсивність судом, але й були спрямовані на зменшення ймовірності розвитку психоневрологічних розладів, пов'язаних з епілепсією.

Актуальність. Дослідження вказують на те, що розвиток багатьох неврологічних захворювань, у тому числі епілепсії та супутніх їй психоневрологічних патологій, пов'язаний з порушенням гемато-енцефалічного бар'єру (ГЕБ). ГЕБ захищає мозок від шкідливих речовин, які циркулюють у кровоносному руслі, та, водночас, забезпечує його необхідними речовинами для функціонування мозкових структур. В уявленнях сучасної нейрофізіології, ГЕБ розглядається більше не як анатомічна структура, а як функціональне поняття, що характеризує певний фізіологічний механізм, який знаходиться під регулюючим впливом нервової та гуморальної систем. Відомо, що порушення ГЕБ навіть саме по собі може сприяти розвитку судом: так, наприклад, класичним проявом внутрішніх крововиливів є розвиток у хворого епілептичних нападів. В той же час, незважаючи на відомості щодо зв'язку між порушенням цілісності ГЕБ та судомами, механізми, що характеризують розвиток епілепсії в умовах дисфункції ГЕБ, залишаються невизначеними.

Серинові протеази, інгібітори серинових протеаз та протеаза-активовані рецептори (ПАР) широко відомі через їх вплив на коагуляцію, гемостаз, запалювальні процеси та заживлення ран. Ці білки ендогенно зустрічаються в ЦНС та беруть участь у нормальних фізіологічних процесах, а також відіграють важливу роль у патофізіологічних процесах, спричинених різними патологіями ЦНС.

Серинові протеази, їх попередники, ендогенні інгібітори та рецептори впливають на синаптичні функції та формування поведінки. Білок сироватки крові тромбін є одним з основних активаторів ПАР. З використанням тварин, нокаутних за геном F2R, що кодує експресію протеазаактивованих рецепторів першого типу (ПАР1), які є найбільш спорідненими до тромбіну, було показано, що ці рецептори відіграють важливу роль у процесах синаптичної пластичності та формуванні емоційно-зумовленої пам'яті та афективної поведінки.

Важлива роль тромбінових рецепторів була встановлена у патогенезі ішемії, внутрішньомозкових крововиливів, травм головного мозку, тощо. Багато експериментальних даних вказують на участь ПАР1 в регуляції процесів розвитку епілептичних нападів та епілепсії. Дослідження останніх років також вказують на те, що тромбін може впливати на загальну збудливість нейронних мереж. Відомо, що підвищення рівня тромбіну у внутрішньомозковому середовищі може спричиняти судомні напади. Але в той же час механізми такого впливу залишаються значною мірою не вивченими.

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

Дисертаційна робота виконана в рамках наукової програми відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343); в рамках проекту науково-дослідних робіт для молодих вчених «Механізми розвитку епілептиформної активності та властивості синаптичної пластичності гіпокампа в умовах порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру» (№ державної реєстрації 0119U102351); в рамках проекту НАН України «Вплив протеазаактивованих рецепторів на патогенез поведінкових розладів при епілепсії» (№ державної реєстрації 0117U004960)

Мета дослідження. Мета роботи полягала у визначенні ролі PAR1 у формуванні поведінкових розладів дослідних щурів спричинених епілептичним статусом.

Завдання дослідження:

1. Охарактеризувати наслідки епілептичного статусу, індукованого у молодому віці, щодо різних форм емоційно-зумовленої поведінки щурів.

2. Оцінити вплив модуляції активності протеазаактивованих рецепторів першого типу на розвиток афективної поведінки, спричиненої епілептичним статусом.

3. Визначити вплив блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу на формування просторової пам'яті та різні форми соціальної поведінки у молодих щурів в нормі та після епілептичного статусу.

4. З'ясувати вплив епілептичного статусу, індукованого у молодому віці, на характеристики синаптичної передачі в нейронах гіпокампа щурів.

5. Ідентифікувати вплив пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу на різні форми синаптичної пластичності в нейронах гіпокампа щурів в нормі та при епілептичному статусі.

Методи дослідження: експериментальне моделювання скроневої епілепсії з використанням літій-пілокарпінової моделі епілептичного статусу, електрофізіологічна реєстрація популяційних електричних потенціалів у зрізах гіпокампа, оцінка параметрів поведінкових феноменів у тварин (локомоторна активність, тривожність, емоційна збудливість, соціальність, просторова пам'ять, умовні реакції), оцінка впливів фармакологічних агентів, статистична обробка результатів.

Об'єкт дослідження: поведінкові феномени та характеристики синаптичної передачі.

Предмет дослідження: зміни у поведінкових реакціях дослідних тварин та зміни у характеристиках синаптичної передачі нейронів гіпокампа.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше продемонстровано, що блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу в період епілептогенезу нормалізує рівень тривожності та емоційної-збудливості дослідних тварин у латентній стадії формування епілепсії, не впливаючи на контроль. Пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу у латентній стадії формування епілепсії не впливає на формування умовної реакції страху як в контролі так і після епілептичного статусу. Вперше показано, що блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу не впливає на параметри соціальної поведінки в контролі та при епілептичному статусі. Продemonстровано, що фармакологічна блокада протеазаактивованих рецепторів першого типу не змінює здатність молодих тварин до формування просторової пам'яті після епілептичного статусу та у контролі. Встановлено, що блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу в період епілептогенезу нормалізує рівень довготривалої синаптичної потенціації в радіальному шарі гіпокампа та рівень короткотривалої синаптичної пластичності в умовах парної стимуляції, знижені унаслідок епілептичного статусу, не впливаючи на контроль.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Результати, отримані в роботі, мають, насамперед, фундаментальне значення, оскільки розширюють існуючі уявлення про залучення PAR1 у механізми розвитку супутніх епілепсії неврологічних розладів. Отримані дані щодо впливу пригнічення функції PAR1 після епілептичного статусу на дефіцити пластичності синаптичних зв'язків в гіпокампі можуть служити підґрунтям для розуміння механізмів дефектності поведінкових феноменів, що спостерігаються при епілепсії.

Різноманітні позитивні ефекти пригнічення PAR1 після ЕС на різні форми поведінки тварин поряд із відсутністю впливу блокування PAR1 на поведінкові реакції щурів контрольної групи вказують на те, що PAR1 може розглядатися як перспективна молекулярна мішень при розробці іноваційних фармакологічних підходів у лікуванні епілепсії та супутніх поведінкових розладів.

Особистий внесок здобувача. Опрацювання літературних джерел, постановка експериментів та інтерпретація отриманих результатів проводилась здобувачем особисто за участі керівника наукової роботи. Поведінкові тести, електрофізіологічні дослідження, кількісна обробка даних, підготовка наукової роботи до друку та написання всіх розділів дисертації проводились здобувачем особисто.

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження були представлені на з'їзді Європейської федерації нейронаук (Чикаго, 2019), 35-му симпозіумі Ернста Кленка з молекулярної медицини (Кельн, 2019), регіональному з'їзді Європейської федерації нейронаук (Белград, 2019), 20-му з'їзді Українського фізіологічного товариства (Київ, 2019), VII з'їзді Українського біофізичного товариства, (Київ, 2018), Оксфордській школі нейронаук (Оксфорд, 2018), міжнародному форумі «Україна майбутнього (Бердянськ, 2018), міжнародному симпозіумі «Фізіологія гладеньких м'язів, біофізика та фармакологія» (Київ, 2018), міжнародній конференції «наукова активність як шлях формування майбутнього фахівця» (Суми, 2018), VII міжнародному конгресі українського товариства нейронаук (Київ, 2017)

Публікації. За результатами роботи було опубліковано три статті у фахових наукових журналах, затверджених МОН України, у тому числі одна стаття у науковому виданні, віднесеному до третього квартилю відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, та дев'ять тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів досліджень, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел з 164 найменувань. Робота містить 9 таблиць, 37 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 141 сторінку.

РОЗДІЛ 1.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні концепції розуміння поведінкових розладів при епілепсії

1.1.1. Розлади емоційно-зумовленої поведінки

Депресія є найпоширенішим супутнім психіатричним розладом у пацієнтів з епілепсією, але в той же час вона залишається недостатньо розпізнаною та часто не лікується. Популяційні дослідження демонструють, що суїцид є найбільш частою причиною смертності серед людей, що страждають на епілепсію (Gilliam & Kanner, 2002; Kanner, 2003, 2008). Встановлено, що 43 % пацієнтів з епілепсією мають довготривалі депресивні розлади та 68 % пацієнтів з епілепсією страждають на короткотривалі депресивні епізоди (Hermann et al., 2002). Спостереження серед дітей та підлітків, хворих на депресію, демонструють, що симптоми депресії було виявлено у 26 % дітей з епілепсією (Ettinger et al., 1998).

Клінічні спостереження демонструють двосторонній взаємозв'язок між епілепсією та розвитком депресивних розладів: наприклад, люди, що мали депресію в анамнезі, в 4-6 разів більше схильні до розвитку набутої епілепсії унаслідок черпно-мозкової травми чи інших розладів, які провокують епілептогенез (Forsgren & Nyström, 1990).

Наступним за поширеністю емоційним розладом при епілепсії є тривожність та, зокрема, соціальна тривожність. Тривожнісні розлади суттєво знижують якість життя пацієнтів та впливають практично на усі сфери їх діяльності. Вважається, що розвиток тривожнісних розладів пов'язаний з патологічними порушеннями у таких структурах мозку як гіпокамп та мигдалеподібний комплекс. Саме ці структури відповідають за обробку та модуляцію емоційної поведінки та в той же час вони є

найбільш чутливими до патологічних процесів, що супроводжують напади: наприклад, дослідження на тваринах демонструють, що саме у цих структурах в першу чергу спостерігається клітинна смерть на ранніх етапах після епілептичного статусу (ЕС) (Freund et al., 1992).

Пацієнти, що страждають на епілепсію, часто відчують нетипові для себе страх, паніку, чи дратівливість, що може пояснюватися розвитком самого захворювання або прийомом антиепілептичних препаратів. Тривожність часто супроводжує депресивні розлади, але може розвиватися й сама по собі.

1.1.2. Розлади соціальної поведінки

Різноманітні порушення соціальної поведінки, такі як, наприклад, соціальна тривожність, часто зустрічаються серед пацієнтів, що страждають на епілепсію. Окрім того, було продемонстровано взаємозворотній зв'язок між розвитком епілепсії у дітей та розвитком розладів аутистичного спектру (РАС). Відомо, що 30 % дітей, що страждають РАС, також страждають і на епілепсію.

Дослідження з використанням тваринних моделей постстатусної епілепсії (наприклад, літій-пілокарпінова та пілокарпінова модель) продемонстрували суттєве зниження потягу до соціальної взаємодії. В той же час, недостатнім є дослідження того, яким чином такі порушення соціальної поведінки у молодому віці впливають на подальший розвиток ЦНС.

Пацієнти, що страждають на епілепсію, відмічають, що соціальні порушення є одними з тих, які значним чином впливають на якість життя, значно її знижуючи.

1.1.3. Когнітивні розлади

Когнітивні порушення є комплексним феноменом, в якому беруть участь багато відділів головного мозку, так чи інакше пов'язаних із

психічними функціями. Особливо важливу роль у розвитку когнітивних порушень відіграють патологічні процеси у гіпокампі, який є однією з перших структур, що вражаються при епілепсії.

Клінічні спостереження демонструють, що пацієнти похилого віку, які страждають на хронічну епілепсію у порівнянні з нормальним станом демонструють гірші результати у тестах з контролю когнітивних здібностей (Dementia Rating Scale) (R. C. Martin et al., 2005). В той же час молодші пацієнти, хворі на скроневу епілепсію, демонструють негативну динаміку щодо розвитку когнітивних порушень (результати у тестах з контролю когнітивних здібностей хворих були на 20-25 % нижчими у порівнянні з контрольними результатами) (Hermann et al., 2008). Окрім того, дослідження демонструють, що не лише напади самі по собі, але й терапія антиепілептичними препаратами можуть негативно вплинути на когнітивні здібності пацієнта (R. C. Martin et al., 2005).

Опитування серед пацієнтів продемонстрували, що епілепсія часто супроводжується розладами пам'яті, навіть коли пацієнти вчасно отримують терапію. За даними опитувань, проведених Epilepsy Foundation, пацієнти часто забувають про зустрічі чи час прийому ліків, можуть пам'ятати давні події, забуваючи події минулого тижня, що свідчить про ураження гіпокампа, який відповідає за трансформацію короткотривалої пам'яті у довготривалу. Часто пацієнти відмічають складнощі у зосередженні уваги, здатності до запам'ятовування та сповільнення мислення.

1.2. Особливості розвитку набутої епілепсії в період статевого дозрівання

Епілепсія є найпоширенішим неврологічним захворюванням у дитинстві та підлітковому віці, вона асоціюється з психоневрологічними розладами, які включають в себе когнітивні та емоційні дисфункції та

дефіцит схильності до соціальної комунікації (Caplan, 2019; Jones et al., 2016). Підлітковий вік є піковим періодом виникнення епілептичних нападів, внаслідок яких часто розвиваються інтелектуальні та когнітивні порушення, які є наслідком структурного ураження мозку (Nishimura et al., 2011). Розповсюдженим є розвиток епілепсії у дітей, схильних до розвитку РАС (Besag, 2018; Tuchman & Rapin, 2002). Вірогідними причинами, які зумовлюють РАС є розбалансування між збуджуючою та гальмівною синаптичною передачею кори головного мозку та ослаблення функціонального зв'язку між лобною часткою кори та іншими ділянками мозку, що є типовим патологічним процесом при епілепсії (Chao et al., 2011).

Дослідження останніх років вказують на те, що напади у підлітковому віці впливають на нормальний ріст та розвиток ЦНС, що в свою чергу сприяє розвитку супутніх епілепсії неврологічних та когнітивних вад (Hermann et al., 2008). МРТ-дослідження дорослих та підлітків демонструють суттєве зменшення обсягу нервової тканини унаслідок розвитку даного захворювання (Pardoe et al., 2008; Pulsipher et al., 2009). В той же час, дослідження демонструють більший обсяг ураження сірої речовини мозку внаслідок розвитку епілепсії у дітей та підлітків порівняно з дорослими (Hermann et al., 2002; Weber et al., 2007).

З огляду на те, що клінічні дослідження не можуть продемонструвати ефект безпосередньо нападів на розвиток ЦНС у підлітковому віці унаслідок сукупності різноманітних факторів та терапевтичного втручання у перебіг захворювання, доречними є дослідження набутої епілепсії у молодому віці з використанням тваринних моделей епілепсії та епілептичного статусу.

1.3. Епілептичний статус та його ускладнення

Зазвичай ЕС визначається як невідкладний патологічний стан, що характеризується довготривалими епілептичними нападами (понад 30

хв), або серією повторюваних один за одним з незначним проміжним періодом коротких епілептичних нападів. Такі стани характеризуються тривалими патологічними змінами у ЦНС та потребують невідкладного фармакологічного втручання. В той же час дослідження з використанням тваринних моделей демонструють, що зазвичай епілептичні напади є короткотривалими (3-4 хв), тому сучасні клінічні уявлення визначають ЕС, що потребує терапевтичного втручання, як такий, при якому напад продовжується більше 5 хв, при цьому невідомо, припиняться напади самостійно, чи будуть розвиватися далі (Abend et al., 2010; Lowenstein et al., 1999). Існують різні типи ЕС, їх класифікацію подано в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Класифікація типів епілептичного статусу (Матвієнко, 2005)

<u>ЕС раннього дитинства</u>
Неонатальний ЕС
ЕС при специфічних неонатальних судомних синдромах
Інфантильні спазми
<u>ЕС пізнього дитинства</u>
Фебрильний епілептичний статус
ЕС при дитячих парціальних судомних синдромах
ЕС при міоклонічно-астатичній епілепсії
ЕС з повільними хвилями під час сну
Синдром Ландау-Клеффнера

Продовження табл. 1.1

<u>ЕС дитячого і дорослого віку</u>
Тоніко-клонічний ЕС

Абсанс-ЕС
Простий парціальний ЕС
ЕС при комі
Специфічні форми ЕС при затримці психічного розвитку
Синдроми міоклонічного ЕС
Складний парціальний ЕС
<u>ЕС дорослого віку</u>
Абсанс-ЕС з пізнім початком

Часто ЕС розвивається у пост-операційний період після нейрохірургічного втручання або у пацієнтів з ризиком підвищення внутрішньочерепного тиску (тобто при черепно-мозковій травмі, пухлинах мозку та інфекціях ЦНС) (Abend et al., 2010). ЕС може класифікуватися за типом нападів, їх етіологією та часом. Існують короткий ЕС (5-30 хв), закріплений (більше 30 хв) та рефрактерний (напади не зупиняються після введення стандартної дози антиепілептичних препаратів).

Найбільш небезпечним станом є тоніко-клонічний ЕС, при цьому для більшості пост-статусних тваринних моделей моделюють саме його. Середньорічна частота тоніко-клонічного ЕС у пацієнтів оцінюється у 18–28 випадків на 100 000 осіб. Найбільш часто тоніко-клонічний ЕС реєструють у дітей, пацієнтів із затримкою психічного розвитку чи у пацієнтів з патологічними ураженнями мозку, спричиненими гострими неврологічними розладами, такими як нейроінфекція, черепно-мозкова травма, інсульт, внутрішньочерепна пухлина, гострі токсико-метаболічні порушення; при цьому тоніко-клонічний ЕС може розвинути у пацієнтів без епілепсії в анамнезі (Матвієнко, 2005).

Розвиток тоніко-клонічного ЕС супроводжується низкою фізіологічних змін в ЦНС, які спеціалісти поділяють на дві фази: першу – коли компенсаторні механізми запобігають ураженню головного мозку, та другу – коли ці механізми виснажуються та підвищується ризик розвитку незворотніх змін у ЦНС. Останні викликаються системними і метаболічними розладами (гіпоксією, гіпоглікемією, підвищеним внутрішньочерепним тиском), а також безпосереднім ексайтотоксичним впливом власне епілептичних нападів (наслідком чого є посилений потік іонів кальцію до нейронів і каскад процесів, що призводять до некрозу та апоптозу).

1.3.1. Патологічні порушення, що супроводжують розвиток ЕС

Близько 1 % населення страждає від епілепсії протягом життя, причому найбільш вразливими до розвитку даної хвороби залишаються діти та підлітки, а також люди літнього віку. Судоми викликають тимчасове порушення мозкових функцій, що може спричинити убомовлену гіперактивацією клітин ексайтотоксичність, і, як наслідок, руйнацію деяких нервових ланцюгів, патологічні зміни синаптичної пластичності та розвиток перманентних неврологічних порушень. Епілепсія є складним феноменом, який спостерігається в різних формах в залежності від анамнезу та етіології її виникнення (I.V.Lushnikova, 2009). Епілептичні напади класифікують за місцем їх осередку та характером поширення у мозку як фокальні (часткові епілептичні напади) та генералізовані (охоплюють усі відділи мозку).

Клінічна картина, яка супроводжує фокальні напади, залежить від області («фокусу») їх виникнення у мозку та початку. Генералізовані напади розпочинаються з синхронної активації клітин в обох півкулях одночасно (Isaev, Isaeva, Khazipov, & Holmes, 2005). Фокальні напади можуть характеризуватися незначними посмикуваннями, тоді як генералізовані призводять як до короткотривалих порушень свідомості

(наприклад, абсансна епілепсія у дітей, коли людина може навіть не помічати, що була несвідомою кількі секунд) до ритмічних судом усього тіла зі втратою свідомості та контролю за власним положенням у просторі. Небезпекою фокальних нападів також є те, що вони можуть розвинутись до вторинно-генералізованих судом, коли аномальна електрична активність поширюється від «фокусу» на суміжні структури мозку.

На сьогодні неможливо визначити безпосередні механізми розвитку судом у кожному з випадків, але вважається, що розповсюдження такої аномальної активності провокується порушеннями у балансі між збуджуючими та гальмівними механізмами синаптичної передачі (McCormick & Contreras, 2001).

Обидві фази розвитку епілептичної активності в головному мозку спричиняють короткотривалі і довготривалі патологічні порушення. Під час компенсаторної фази ЕС спостерігається підвищення мозкового метаболізму та рівня лактату і глюкози, що призводить до закислення міжклітинного середовища. Протягом декомпенсаторної фази ЕС спостерігаються розлади авторегуляції, що в свою чергу може спричинити дихальні та серцеві розлади. Перехід від компенсаторної фази до декомпенсаторної може займати від півгодини до години у залежності від конкретного випадку, тому важливим є щонайшвидше припинення ЕС у пацієнта. Можливі патологічні ускладнення, що супроводжують декомпенсаторну фазу ЕС, показано у таблиці 1.2.

**Медичні ускладнення, які можуть супроводжувати розвиток ЕС
у хворих (Матвієнко, 2005)**

<u>Неврологічні</u>
Гіпоксично-метаболічне ураження головного мозку
Ураження головного мозку, викликане безпосередньо судомами
Набряк головного мозку і підвищений внутрішньочерепний тиск
Внутрішньочерепний венозний тромбоз
Мозковий крововилив та інфаркт
<u>Дихально-серцеві і вегетативні</u>
Гіпотензія
Гіпертензія
Серцева недостатність, тахі- і брадіаритмія, зупинка серця, кардіогенний шок
Дихальна недостатність
Порушення частоти і ритму дихання, апное
Набряк легень, легенева гіпертензія, тромбоемболія легеневої артерії, пневмонія, аспірація
Гіперпірексія
Пітливість, гіперсекреція, непрохідність трахеобронхіального дерева
Ішемія периферичних тканин
<u>Метаболічні і системні</u>
Дегідратація
Електролітні розлади (зокрема, гіпонатріємія, гіперкаліємія, гіпоглікемія)
Гостра ниркова недостатність (зокрема, гострий тубулярний некроз)

Гостра печінкова недостатність
Гострий панкреатит
<u>Інші</u>
Десемінована внутрішньосудинна коагулопатія/поліорганна недостатність
Рабдоміоліз
Переломи
Інфекції (зокрема, легень, шкіри, сечовивідних шляхів)
Тромбофлебіт, травми шкіри

Небезпечним ускладненням ЕС є те, що навіть поодиноким випадком довоготривалого епілептичного нападу може призвести до структурних і функціональних порушень у ЦНС та епілептогенезу.

1.3.2. Механізми епілептогенезу

Наразі процес епілептогенезу визначають як процес формування осередку хронічного підвищення збудливості у ЦНС, здатного генерувати аномальну спонтанну електричну активність, що призводить до виникнення епілептичного нападу та прогресії епілепсії у майбутньому. Важливим є те, що у сучасному визначенні епілептогенезу увага приділяється також і механізмам прогресування захворювання, які можуть продовжуватися навіть після діагностики епілепсії (Pitka et al., 2015). Більшість досліджень вказує на те, що такі механізми відіграють важливу роль, особливо у формуванні коморбідних епілепсій захворювань. Так дослідження з використанням тривалого ЕЕГ-моніторингу щурів із історією ЕС статусу демонструють, що набута епілепсія

продовжує прогресувати після появи перших спонтанних неспровокованих епілептичних нападів (Kadam et al., 2010).

Насьогодні розроблено ряд експериментальних протоколів, що дозволяють моделювати різні форми епілепсії, завдяки яким проводяться дослідження молекулярних механізмів формування набутої епілепсії. Більшість таких моделей спрямовано на моделювання скроневої епілепсії (із огляду на те, що скронева епілепсія є найбільш розповсюдженою парціальної (фокальною) формою цієї хвороби у дорослих людей). Епілептична активність за умов скроневої епілепсії виникає внаслідок формування епілептогенного осередку у скроневій частці кори головного мозку, але, в багатьох випадках, розвиток скроневої епілепсії може призводити до структурних та функціональних змін і інших, пов'язаних із цією ділянкою структур мозку. Унаслідок нападу змінюється іонний баланс ліквору, зокрема підвищується концентрація іонів K^+ та зменшується концентрація іонів Ca^{2+} , що призводить до деполяризації нейронів, збільшує ймовірність вивільнення нейромедіаторів та підвищення подальшого збудження клітин. Завдяки таким молекулярним змінам нейрони можуть утворювати епілептичну мережу, активність якої клінічно проявляється спонтанними неспровокованими епілептичними нападами (Timofeev et al., 2014).

Початок нападів характеризується одночасними високочастотними сплесками потенціалів дії нейронів (гіперактивація) та синхронною активацією великої кількості клітин (гіперсинхронізація). На ЕЕГ даний процес спостерігають у вигляді різноманітних патернів синхронної активності, які значно відрізняються від базової активності, яка в свою чергу призводить до пароксизмального деполяризаційного зсуву (Pitkänen et al., 2015a; Timofeev et al., 2014).

Генераторна активність, що виникає як наслідок пароксизмально-деполяризаційного зсуву, зумовлюється надходженням позаклітинних

іонів Ca^{2+} , що призводить до відкриття потенціалозалежних Na^+ каналів та підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Na^+ . Подальша гіперполяризація нейронів підтримується завдяки активації ГАМК-рецепторів та роботі кальцієвих та калієвих каналів, що в свою чергу призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca та виходом іонів K^+ у зовнішньоклітинне середовище. Також було показано, що такий стан підтримується завдяки активації АМПА- та НМДА-рецепторів (Stafstrom, 1998).

Епілептична активність також може призводити до структурних змін у мозковій тканині (апоптоз, гліоз, патологічний нейрогенез, розростання аксонів з подальшим формуванням очагів гіперсинхронізації), зміни ефективності синаптичної передачі та зміни молекулярного складу рецепторів. При цьому залишається нез'ясованим, чи дані зміни виникають як наслідок роботи компенсаторних механізмів, чи є лише епілептогенними (Ben-Ari, 2008).

За допомогою досліджень з використанням тваринних моделей епілепсії та ЕС було описано ряд патологічних процесів, які супроводжують епілептогенез (Ekdahl et al., 2003). Було продемонстровано, що ушкодження нейронів в першу чергу зумовлюється ексайтотоксичністю. Ексайтотоксичність – це патологічний процес, при якому гіперактивуються НМДА- та АМПА-рецептори, що призводить до гіперзбудливості клітин. Наступним кроком є потрапляння надлишкової кількості іонів кальцію усередину клітини, що в свою чергу провокує вивільнення ферментів, які руйнують цитозольні структури та посиляють сигнали до запуску апоптозу. Часткова загибель нейронів призводить до структурних змін у синаптичній системі, що призводить до зменшення гальмівного впливу інтернейронів та подальшого підвищення збудливості системи в цілому (Sharma et al., 2007).

Патологічні процеси, які відбуваються в гіпокампі внаслідок епілептичного нападу досить добре описані. По-перше, епілептичні судоми призводять до нейродегенерації, при яких в першу чергу гинуть клітини CA1 зони гіпокампа та хілусі (Pitkänen & Lukasiuk, 2009). Пірамідні нейрони, інтернейрони зони CA2 та гранулярні клітини зубчастої звивини менш вразливі для ексайтотоксичного ураження внаслідок патологічного підвищення збудливості нейронів. Також було показано, що епілептичні напади можуть призводити до виражених змін в цитологічній структурі нервових клітин. У дослідженнях з використанням методів імуногістохімії, електронної та конфокальної мікроскопії було продемонстровано збільшення кількості нейрофіламентів в нейронах, потовщення дендритів та їх розгалуження. Також було продемонстровано подібні морфологічні зміни в нейронах сусідніх із гіпокампом структур лімбічної системи, а саме у мигдалеподібному комплексі, енторинальній корі та парагіпокампальній звивині (Pitkänen, Lukasiuk, Dudek, & Staley, 2015). Найбільш імовірно, що такі морфологічні зміни нейронів є наслідком структурних змін нейронних мереж гіпокампа та пояснюються активацією адаптивних механізмів (Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JJ, 2006).

Окрім морфологічних змін нейронів гіпокампа, спостерігаються функціональні, в першу чергу спрямовані на зміни у гальмівній синаптичній системі. Кошикоподібні клітини, ГАМК-ергічні інтернейрони гіпокампа, які формують синапси на тілах і проксимальних дендритах пірамідних нейронів, можуть синхронізувати синаптичну активність гіпокампа. Втрата інтернейронів у висхідному і лакунозно-молекулярному шарах зони CA1 гіпокампа провокує втрати дендритного інгібування, тоді як збереження і збільшення зв'язків з кошикоподібними клітинами може призводити до більшої синхронізації пірамідних клітин (Sharma et al., 2007).

Клітинна смерть пірамідних нейронів та інтернейронів гіпокампа супроводжується активним гліозом, в результаті чого частина нейронів замінюється астроцитами (Pitkänen et al., 2015b).

Нейрогенез, процес утворення нових нейронів, є характерним для початкових стадій епілептогенезу. Так було показано, що ЕС причиняє активний нейрогенез у зубчастій звивині. Продемонстровано, що 75 – 90 % нейронів утворених після ЕС протягом чотирьох тижнів експресують маркери зрілих клітин. Цікаво, що при хронічній скроневої епілепсії спостерігається дуже низкий рівень проліферативної активності та нейрогенезу. На основі цих спостережень було висловлено припущення, що судоми можуть прискорювати розвиток нових нейронів та їх вбудовування в синаптичну мережу (Hattiangady et al., 2004).

В деяких випадках гальмування проліферативної активності клітин зубчастої звивини в період епілептогенезу призводить до поліпшення симптомів епілепсії, таким чином можна зробити припущення, що нейрогенез зубчастої звивини має антиепілептогенний ефект. З іншого боку, було продемонстровано, що зниження нейрогенезу зубчастої звивини, навпаки, може провокувати збільшення частоти нападів та підвищувати загальну збудливість синаптичної системи гіпокампа (Cho et al., 2015; Iyengar et al., 2015). Таким чином, роль нейрогенезу під час розвитку епілепсії залишається невизначеною. Висловлюється припущення, що зміна структурної організації мереж гіпокампа провокує порушення балансу збудження і гальмування оскільки в мережу вбудовуються нейрони з різними електрофізіологічними характеристиками. Внаслідок цього формуються циклічні зв'язки, які провокують гіперзбудження гіпокампа та підвищують епілептичну активність (Danzer, 2012).

1.3.4. Зміни синаптичної пластичності при епілепсії

Синаптична пластичність відіграє важливу роль у діяльності хребетних, вона дає можливість нервовій системі змінюватися у відповідь на зміну зовнішніх та внутрішніх факторів, змінюючи власну структуру та характер активності. Синаптична пластичність може змінювати як зв'язок між окремими нейронами, активність окремих нервових мереж та і характер взаємозв'язку між окремими системами ЦНС. (Citri & Malenka, 2008)

Говорячи про синаптичну пластичність, в першу чергу розглядають процеси навчання та пам'яті, але пластичність є важливим компонентом багатьох інших процесів у ЦНС. Залежно від часу, протягом якого зберігаються зміни ефективності синаптичної передачі, розрізняють коротко- та довготривалу синаптичну пластичність. Короткотривалу синаптичну пластичність розглядають для процесів, які тривають від мілісекунд до секунд. Зміни короткотривалої синаптичної пластичності відображаються на амплітуді наступного реєстрованого постсинаптичного струму, тобто провокують депресію (зменшення амплітуди) або полегшення (фасилітацію) синаптичної передачі (Citri & Malenka, 2008). В основі короткотривалої фасилітації ефективності синаптичної передачі лежить механізм короткотривалого підвищення концентрації вивільнених іонів Ca^{2+} , які сприяють вивільненню більшої кількості нейромедіатора під час наступної стимуляції. Можливими механізмами короткотривалої депресії вважають інактивацію потенціал-залежних натрієвих та кальцієвих каналів або виснаження везикулярного пулу внаслідок надмірного виділення нейромедіатора під час першої стимуляції (Katz & Miledi, 1968).

Довготривалі зміни синаптичної пластичності також демонструють зниження або підвищення інтенсивності відповіді на викликаний сигнал. Розглядають довготривалу потенціацію та довготривалу депресію. Довготривала потенціація розглядається як

процес, що безпосередньо відповідає за формування пам'яті та навчання (T. V. P. Bliss & Lømo, 1973; T. V Bliss & Lomo, 1973).

В різних частинах ЦНС представлені різні форми довготривалої потенціації, які залежать від багатьох факторів. Сигнальні шляхи, які забезпечують виникнення довготривалої потенціації, дуже різноманітні. Було продемонстровано, що довготривалу потенціалію забезпечують активація НМДА та АМПА-рецепторів, активація метаботропних глутаматних рецепторів (mGluR1-3,5), рецепторів ендоканабіноїдів (через активацію потенціал-залежних кальцієвих каналів) та ін. (Maggio et al., 2018; Robert C Malenka & Bear, 2004). У дослідженнях довготривалої потенціації гіпокампа розглядають два типи довготривалої потенціації: НМДА-залежну і НМДА-незалежну (Collingridge et al., 1983).

НМДА-рецептор являє собою іонотропний рецептор, який активується при одночасному зв'язуванні у відповідних ділянках молекул гліцину і глутамату. В неактивованій формі канал рецептора блокується іоном магнію (при чому зниження концентрації магнію в позаклітинному середовищі значно підвищує збудливість системи та ймовірність виникнення довготривалої потенціації). В нормі деполяризація постсинаптичної мембрани забезпечує звільнення НМДА-рецептора від магнієвого блоку та подальшу його активацію. Активація і відкриття НМДА-рецептора, в свою чергу, забезпечує потік іонів K^+ , Na^+ і Ca^{2+} у внутрішньоклітинне середовище нейрона (Paoletti & Neyton, 2007). Іони кальцію виконують роль вторинних посередників та беруть участь в індукції синаптичної потенціації (Lynch et al., 1983).

Показано, що на індукцію довготривалої пластичності гіпокампа значний вплив має субодиничний склад НМДА-рецепторів. Так, з використанням літій-пілокарпінової моделі та методу полімеразно-ланцюгової реакції було показано, що епілептичний статус спричинює зміну у співвідношенні NR2B та NR2A субодиниць, збільшуючи

відношення перших порівняно з останніми шляхом підвищення їх експресії (Т. У. Postnikova et al., 2017). Селективне блокування NR2В-субодиниці НМДА-рецептора в умовах літій-пілокарпінової моделі ЕС зберігало рівень довготривалої потенціації гіпокампа в умовах стимулювання коллатералей Шаффера. Отже, можна зробити висновок щодо впливу епілептичних нападів на структурну композицію НМДА-рецептора, що може пояснювати зниження рівня довготривалої потенціації при епілепсії та зниження ймовірності її індукції.

Досліджено велику кількість ферментів, які, як вважається, є мішенню підвищеної внутрішньоклітинної концентрації кальцію, їх активація є пусковим механізмом для індукції довготривалої потенціації. Один з них, кальцій/кальмодулін-залежна протеїн кіназа II (CaMKII), активована CaMKII може зазнавати автофосфорильяції та залишатися в активному стані (R C Malenka & Nicoll, 1999). Вона активує АМПА-рецептори двома способами: фосфорильяцією АМПА-рецепторів, які вже присутні на постсинаптичній мембрані, що підвищує проникність мембрани для іонів натрію, та провокує вбудовування АМПА-рецепторів у мембрану, що підвищує кількість рецепторів, які можуть бути активовані.

Когнітивні порушення та зменшення здатності до запам'ятовування, які є частими коморбідностями скроневої епілепсії, пов'язують з патологічними змінами гіпокампа (Inostroza et al., 2011). Окрім того, електрофізіологічні дослідження демонструють суттєві зміни довготривалої та короткотривалої пластичності у корі головного мозку.

1.4. Гіпокамп та його роль у формуванні поведінкових реакцій

1.4.1. Морфологічні та фізіологічні особливості гіпокампа

Гіпокамп у функціональному і анатомічному сенсі займає найбільш важливе і центральне положення у лімбічній системі. Термін «гіпокамп» має кілька значень. По-перше, його застосовують для позначення однієї з декількох взаємопов'язаних частин мозку, які разом утворюють функціональну систему під назвою гіпокампальна формація. По-друге, гіпокампом називають цілісну парну структуру, розташовану у медіальних скроневих відділах півкуль мозку (рис. 1.1).

Власне гіпокамп, як частина формації, поділяється на три відділи: СА3, СА2, і СА1. Інші ділянки формації включають зубчасту звивину, субікулум, пресубікулум, парасубікулум і енторинальну кору (Andersen et al., 2006; Knierim, 2015).

Гіпокамп відіграє важливу роль у формуванні епізодичної пам'яті, тобто утворення нових спогадів про пережиті події. Двостороннє пошкодження гіпокампа в обох півкулях призводить до антероградної амнезії, тобто втрати здатності до формування нових спогадів (Andersen et al., 2006)

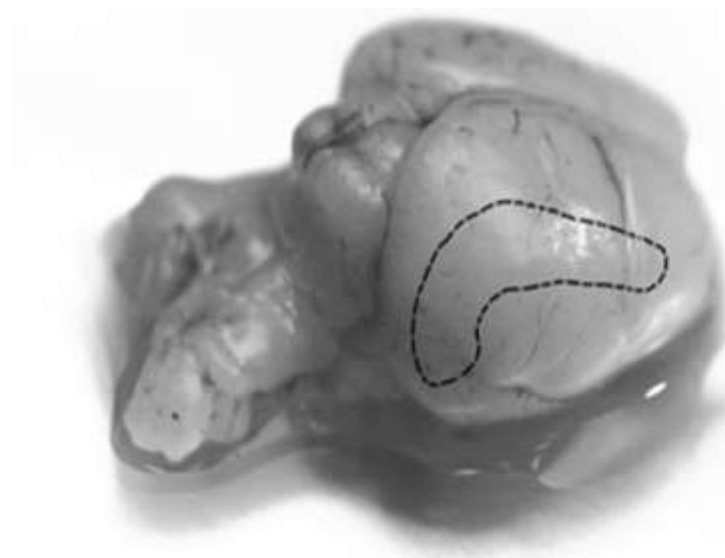


Рис. 1.1. Схематичне зображення гіпокампальної формації та її розташування у головному мозку щура (J. Н. (John H. Martin, 2012)

Гіпокамп є частиною філогенетично давньої частини кори – архікортексу і має в своєму складі сім шарів. Альвеолярний шар (*alveus*), що лежить на вентрикулярній поверхні, складається з мієлінізованих аксонів пірамідних нейронів полів CA1 і CA2, які прямують в горизонтальному напрямку. Базальні дендрити і початкові сегменти аксонів знаходяться у висхідному шарі (*stratum oriens*). Наступний пірамідний шар (*stratum pyramidale*) складається з тіл пірамідних нейронів. Далі розташовані радіальний шар (*stratum radiatum*), що містить стовбури апікальних дендритів, і лакунозно-молекулярний шар (*stratum lacunosum-moleculare*) – шар претермінальних і термінальних розгалужень апікальних дендритів. Довгі аксони, які йдуть від гранулярних клітин зубчастої звивини (мохоподібні волокна), утворюють найтонший шар *stratum lucidum*.

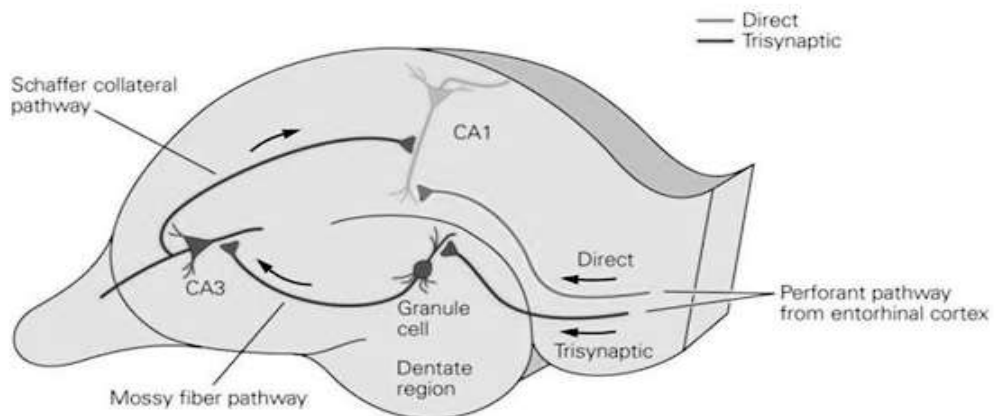
У полі CA1 нейрони розташовані дуже щільно, тіла їх невеликі, апікальні дендрити, віддаючи лише тонкі бічні відростки, йдуть на значній відстані від тіла клітини як єдиний стовбур і дихотомічно діляться лише в лакунозно-молекулярному шарі, не маючи великих шипикових виростів (Andersen et al., 2006).

В полі CA2 пірамідні нейрони значно крупніші, стовбур апікальних дендритів також не покритий шипиками. Нейронні поля CA3 дуже великі і розташовані не так щільно. Їх апікальні дендрити утворюють біфуркацію недалеко від клітинного тіла (у радіальному шарі). Від аксонів пірамідних нейронів поля CA3 відгалужуються товсті мієлінізовані колатералі, які спрямовуються до поля CA1.

Інформаційний обмін в гіпокампі здійснюється через енторинальну кору за двома основними проекціями – перфорантному і альвеолярному шляхах. (рис. 1.2)

Перфорантний шлях являє собою односпрямовану передачу сигналу, замкнену в петлю. Саме цей факт обумовлює унікальні анатомічні особливості гіпокампальної формації порівняно з іншими

кортикальними областями, зв'язки яких організовані реципрокно. Шлях починається з аксонів нейронів другого шару енторинальної кори, які утворюють синаптичні контакти з гранулярними нейронами зубчастої звивини та пірамідними нейронами поля СА3. Далі гранулярні нейрони надсилають свої проєкції – мохоподібні волокна, до СА3. Аксони пірамідних нейронів цього поля – колатералі Шаффера, в свою чергу, далі передають сигнали апікальним дендритам пірамідних нейронів поля СА1. Аксони СА1 нейронів проєктуються до субікулума та енторинальної кори. Нейрони субікулума, в свою чергу, утворюють синаптичні контакти з нейронами пресубікулума і парасубікулума, але їх основні проєкції прямують до глибоких шарів енторинальної кори. Зв'язки нейронів СА1 і субікулума з енторинальною корою замикають цикл інформаційної обробки, який починається з поверхневих клітинних шарів кори і закінчується її глибокими шарами (Andersen et al., 2006).



**Рис. 1.2. Загальна анатомія і провідні шляхи гіпокампа
(Derdikman & Knierim, 2014)**

Через систему локальних вставних нейронів здійснюються процеси зворотнього збудження і зворотнього інгібування пірамідних нейронів. Співвідношення числа функціонуючих у кожний момент збуджуючих та гальмівних синапсів пірамідних нейронів гіпокампа визначають базову активність нервової мережі. Цей механізм підтримує

активну мікроциркуляцію збудження у нейронних ланцюгах, яка, як було показано, залучена у процесах пам'яті (Andersen et al., 2006).

Отже, у деяких відношеннях нейронна організація частин гіпокампальної формації подібна до організації кори. Наприклад, наявність великих пірамідних проекційних нейронів та дрібних вставних нейронів. Проте, односпрямована передача інформації у внутрішніх мережах та складна система розгалужених асоціативних зв'язків формують її унікальну анатомію. Гіпокамп отримує потужний потік аферентації із зовнішнього середовища та інших структур мозку, його внутрішні нейронні мережі використовуються не тільки для обробки сенсорної інформації, а й для забезпечення вищих мозкових функцій.

1.4.2. Функції гіпокампа

Дослідження демонструють, що гіпокамп бере участь в механізмах відповідних за мотивацію, емоційний стан, консолідацію пам'яті, навчання і просторову навігацією (Anand & Dhikav, 2012; Andersen et al., 2006). Також у тварин гіпокамп бере участь в нюховому розпізнаванні та реакціях уникнення небезпеки (Fogwe & Mesfin, 2019).

Для гіпокампа характерна певна функціональна спеціалізація вздовж дорзо-вентральної осі. Насамперед це пояснюється зв'язками з різними структурами (Poppenk et al., 2013).

Дорзальний гіпокамп завдяки наявності великої кількості «клітин місця» забезпечує когнітивну карту для орієнтації тварин в просторі (Fanselow & Dong, 2010; Poppenk et al., 2013). На відміну від вентрального гіпокампа, який більшою мірою забезпечує кодування, дорзальний гіпокамп відповідає за пошук нової інформації (Poppenk et al., 2013). Пошукова дослідницька поведінка забезпечується через контроль локомоції (вентральна область покришки), орієнтації рухів (чорна речовина) та напрямленості у просторі (сосочкові тіла) (Fanselow & Dong, 2010). За фізіологічних умов для дорзального гіпокампа на

відміну від вентрального характерний нижчий поріг деполяризації та вища частота потенціалів дії (ПД), через що легше розвивається довготривала потенціація та повільніше знижується рівень глутамату в синаптичній щілині (Dubovyk & Manahan-Vaughan, 2018).

Вентральний гіпокамп має зв'язки з прилеглим ядром, що пояснює його роль у запам'ятовуванні інформації, яка стосується винагороди (Porreik et al., 2013). Він контролює мотивовану поведінку, пов'язану з емоційними компонентами, таку як прийом їжі (годування та вживання), розмноження (батьківство) та захист (Fanselow & Dong, 2010). Через взаємодії з мигдалиною гіпокамп бере участь в обробці негативних емоцій та генерації відчуття тривожності. Вентральний гіпокамп має більші рецептивні поля ніж дорзальний і тому відповідає за глобальну просторову репрезентацію та сприйняття сутності подій. Також він забезпечує обробку вестибулярної інформації (Porreik et al., 2013). Вентральний гіпокамп зазвичай має слабшу довготривалу потенціацію та вищу сприйнятливність до епілептичних розладів (Dubovyk & Manahan-Vaughan, 2018).

Гіпокамп є цілісною структурою. Незважаючи на те, що дорзальна частина гіпокампа функціонально відмінна від вентральної, для них також характерні спільні властивості. Зокрема це стосується подібностей в цитоархітектоніці та наявності внутрішніх трисинаптичних зв'язків.

1.4.3. Синаптична пластичність гіпокампа

Пластичність є невідомою рисою нервової системи, завдяки їй мозок набуває здатності змінюватися та адекватно відповідати на дію різноманітних факторів внутрішнього та зовнішнього середовища. Особливою пластичністю мозок володіє в ранньому онтогенезі, коли зміни внаслідок навчання та набуття досвіду є найбільш актуальними, а також за рахунок цього нервова система є більш стійкою до пошкоджень. Для зрілого мозку пластичність зберігається на

нейронному та системному рівнях. Синаптична пластичність специфічно стосується зміни активності та ефективності синаптичної передачі при існуючих синапсах, залежно від активності нервової мережі. В той же час явище синаптичної пластичності полягає не лише у зміні характеру передачі сигналу, а також і у зміні кількості синапсів. Синаптична пластичність модифікує зв'язок між конкретними нейронами, активність локальних нейронних мереж та взаємозв'язки між окремими системами мозку, вважається, що цей процес відіграє центральну роль у здатності мозку переводити короточасну пам'ять у довгочасну. (Kandel & Pittenger, 1999)

Також вважається, що синаптична пластичність відіграє ключову роль у ранньому розвитку нервової схеми, а порушення механізмів синаптичної пластичності сприяють появі ряду нервово-психічних розладів. Таким чином, з'ясування детальних молекулярних механізмів, що лежать в основі синаптичної пластичності різних областей мозку, є важливим для розуміння нервової основи багатьох аспектів нормальної та патологічної функції ЦНС. (Citri & Malenka, 2008)

Процеси збудження та гальмування в ЦНС залежать від динаміки передачі сигналу між синапсами, вивільнення нейромедіатора та його зв'язування з відповідними рецепторами провокує появу локальних іонних струмів та передачі нервового імпульсу. Також для багатьох синапсів ефективність зв'язування нейромедіатора та його рецепторів не є постійною, що також є проявом пластичності, та є відповіддю на різноманітні обставини. (Kandel & Pittenger, 1999) Розглядають велику кількість видів синаптичної пластичності.

Численні форми короточасної синаптичної пластичності, тривалістю від мілісекунд до декількох хвилин, спостерігаються практично у кожному синапсі, дослідженому в організмах, починаючи від безхребетних тварин до ссавців. (Zucker & Regehr, 2002) Вважається, що вони відіграють важливу роль у короткостроковій адаптації до

сенсорних подразнень, тимчасових змінах у поведінкових реакціях та формації короткочасної пам'яті. Більшість форм *короткотривалої синаптичної пластичності* спричинені короткими сплесками активності, що в свою чергу провокує тимчасове накопичення кальцію в пресинаптичних терміналях. Це збільшення концентрації пресинаптичного кальцію, в свою чергу, провокує зміни ймовірності вивільнення нейромедіатору шляхом прямої зміни біохімічних процесів, що лежать в основі екзоцитозу. (Citri & Malenka, 2008) Короткотривалу пластичність можна поділити на декілька форм, таких як аугментація, депресія, потенціація та фасилітація. (Zucker & Regehr, 2002)

Однією з форм досліджуваної короткотривалої синаптичної пластичності є *синаптична пластичність в умовах парної стимуляції*. Коли два стимули передаються протягом короткого інтервалу, відповідь на другий подразник може бути як посиленою, так і пригніченою щодо відповіді на перший подразник. (Katz & Miledi, 1968; Zucker & Regehr, 2002) Депресія в умовах парної стимуляції зазвичай спостерігається у всіх синапсах на коротких (менше 20 мс) інтерстимулюсних інтервалах і, швидше за все, є результатом інактивації натрієвих або кальцієвих каналів, залежних від напруги, або тимчасового збіднення пресинаптичних терміналей. Багато синапсів демонструють парне імпульсне полегшення з більш тривалими міжстимульними інтервалами (20–500 мс). Найбільш імовірне пояснення цього явища полягає в тому, що залишковий кальцій, що залишився після першого стимулу, сприяє додатковому вивільненню під час другого, але також вважається, що задіяні і додаткові механізми. Вони можуть включати активацію білкових кіназ, які модулюють активність пресинаптичних фосфопротейнів. Наприклад, миші з нокаутом пресинаптичних синапсинів демонстрували аномальну короткотривалу пластичність. (De Camilli, 1990; Rosahl et al., 1995, 1993)

Поява полегшення або депресії в умовах парної стимуляції, залежить від недавньої історії активації синапсу. Оскільки ці форми пластичності значною мірою є наслідком зміни ймовірності вивільнення нейромедіатора, синапси, у яких така ймовірність вища, як правило, пригнічують свою реакцію на другий стимул. (Dobrunz & Stevens, 1997) В той же час, синапси з низькою початковою ймовірністю вивільнення нейромедіатора зазвичай демонструють збільшення такої ймовірності у відповідь на другий стимул. Відповідно до цієї ідеї, маніпуляції, що знижують ймовірність вивільнення (наприклад, активація пресинаптичних авторецепторів), майже завжди спричиняють підвищення полегшення в умовах парної стимуляції або навіть перетворення депресії в полегшення. Таким чином, один і той же синапс може демонструвати полегшення або депресію, залежно від його недавньої історії активації та модуляції. (Citri & Malenka, 2008)

Більш довготривалою у часі є короткотривала фасилітація або депресія унаслідок повторної або більш довготривалої високочастотної тетанічної стимуляції синапсів (приблизно від 200 мс до 5 с; 10–200 Гц). (Zucker & Regehr, 2002) *Фасилітація та посттетанічна потенціація* (ПТП) характеризуються підвищенням вивільнення нейромедіатора тривалістю від секунд (фасилітація) до декількох хвилин (ПТП). Вони також передбачають збільшення ймовірності вивільнення нейромедіатора у відповідь на потенціал дії, що значною мірою пояснюється накопиченням концентрації кальцію в пресинаптичній терміналі під час стимуляції. Цей залишковий кальцій може поєднуватися з новим, вивільнення якого викликається подальшою стимуляцією, що посилює вивільнення нейромедіатора, або може призвести до біохімічних модифікацій пресинаптичних білків. (Magleby & Zengel, 1982; Zucker & Regehr, 2002)

У деяких синапсах повторювана активація призводить до депресії, яка може тривати протягом декількох секунд і навіть хвилин. (Betz, 1970;

Zucker & Regehr, 2002) Як і при депресії в умовах парної стимуляції, це, як правило, відбувається в синапсах, які мають високу ймовірність вивільнення нейромедіатора, і, вважається, що це є наслідком перехідного виснаження готового до вивільнення пулу везикул. Зниження синаптичної сили може також виникати внаслідок вивільнення модулюючих речовин з активованих пресинаптичних терміналей, постсинаптичних клітин або навіть сусідніх клітин, ініціюючи каскад сигналізації, що призводить до гальмування механізму пресинаптичного вивільнення нейромедіатора. Нарешті, постсинаптичний механізм короточасної пластичності може включати десенсибілізацію рецепторів, що робить цільовий нейрон менш чутливим до нейромедіатора.

Більшість пресинаптичних терміналей мають у своєму складі ряд різних типів метаботропних рецепторів, пов'язаних з G-білками, а також іонотропних рецепторів. (Macdermott et al., 1999) Імовірність вивільнення нейромедіатора, що є важливим фактором визначення синаптичної сили, частково контролюється зайнятістю цих рецепторів, яка, в свою чергу, модулюється позаклітинними концентраціями їх агоністів. У деяких випадках рівня тонізуючих ендогенних лігандів достатньо для часткової активації цих рецепторів. Тим не менш, синаптична активність може додатково збільшити заповнення рецепторів, тимчасово підвищуючи концентрацію різних пресинаптичних нейромодуляторів. (Citri & Malenka, 2008) Залежно від їх специфічних властивостей, активація цих рецепторів може або посилювати, або пригнічувати синаптичну передачу.

Завдяки вивільненню ряду нейромодуляторів, постсинаптичні клітини також можуть впливати на вивільнення нейромедіатора з пресинаптичних терміналей. У відповідь на сильну постсинаптичну деполяризацію дендрити вивільняють ретроградні месенджери, які діють через рецептори, пов'язані з G-білком, розташовані на пресинаптичних

терміналях. Ретроградні месенджери, які були визначені у конкретних типах клітин, включають дофамін, динорфін, глутамат, ГАМК, оксид азоту, нейротрофічний фактор мозку та окситоцин.(Citri & Malenka, 2008; Nagappan & Lu, 2005; Nugent et al., 2007) Постсинаптичне кальційзалежне злиття везикул є одним із поширених механізмів вивільнення ретроградних месенджерів, вони також можуть вивільнятися неvezикулярними механізмами. Наприклад, добре вивчена система посередницької ретроградної синаптичної сигналізації, яка передбачає постсинаптичне вивільнення ендогенних канабіноїдів, таких як анандамід та 2-арахідоноілгліцерол, які виробляються розщепленням фосфоліпідів і сприймаються рецепторами CB1 на пресинаптичних терміналях. Механізми вивільнення ендоканабіноїдів не до кінця зрозумілі і можуть включати транспортер, що полегшує дифузію через плазматичну мембрану. (Chevalleyre et al., 2006) Така ретроградна сигналізація шляхом постсинаптичного вивільнення ендокананабіноїдів може бути ініційована сильною деполяризацією або активацією постсинаптичних метаботропних рецепторів, і показано, що в декількох областях мозку (у тому числі і в гіпокампі) вона тимчасово пригнічує гальмівні та збудливі синапси. (Chevalleyre et al., 2006) Цікаво, що в стріатумі є форма *довготривалої депресії*, яка викликається вивільненням ендоканабіноїдів.

Також зростає кількість інформації щодо того, що глія може бути залучена до деяких форм короткострокової пластичності. (Araque et al., 2001; Haydon, 2001) Завдяки тісному зв'язку з синапсами, астроцити та пресинаптичні клітини Шванна відіграють важливу роль у кліренсі нейромедіатора і можуть брати участь у синаптичній пластичності, контролюючи швидкість та ступінь такого кліренсу.(Danbolt, 2001) Це, в свою чергу, може вплинути на ступінь активації та десенсибілізації постсинаптичних рецепторів. Інший спосіб залучення глії до синаптичної пластичності – це вивільнення позаклітинних месенджерів,

а потім вивільнення речовин, які, в свою чергу, можуть безпосередньо впливати на синаптичну ефективність. (Araque et al., 2001; Citri & Malenka, 2008; Haydon, 2001) Глія експресує багато різних нейромедіаторних рецепторів (наприклад, рецепторів глутамату), які при активації призводять до вивільнення речовин (наприклад, АТФ), які потім можуть бути залучені у регулювання вивільнення нейротрансмітерів на пресинаптичні термінали.

Спочатку було встановлено, що короткотривала синаптична пластичність відіграє важливу функцію у поведінкових реакцій найпростіших. (Kandel & Taub, 1965) У мозку ссавців важливим наслідком короткотривалої синаптичної пластичності є залученність у регулювання обробки інформації, що дозволяє синапсам діяти як фільтри з широким спектром властивостей. Наприклад, синапси з низькою початковою ймовірністю вивільнення нейромедіатора функціонують як високочастотні фільтри, оскільки вони потенціюють під час високочастотних сплесків потенціалів дії, тоді як низькочастотні сплески не передаються з однаковою ефективністю. На відміну від цього синапси з високою початковою ймовірністю вивільнення функціонують як низькочастотні фільтри, оскільки вони пригнічуються під час високочастотних сплесків потенціалів дії, але надійно ретранслюють низькочастотну активність. (Abbott & Regehr, 2004) Характеристики фільтрації синапсу можна регулювати за допомогою модуляції початкової ймовірності вивільнення. Найчастіше це відбувається через вивільнення нейромодуляторів, які шляхом активації пресинаптичних рецепторів зменшують ймовірність вивільнення нейромедіатора. Це змінює фільтруючі характеристики синапсу, внаслідок чого полегшення переважає над депресією. Таким чином, пресинаптичне гальмування може перетворити синапс з низькочастотного у високочастотний фільтр.

Поширена думка, що досвід будь-якого виду модифікує подальшу поведінку через залежні від діяльності тривалі модифікації синаптичної

пластичності. Мозок кодує зовнішні та внутрішні події у великих ансамблях нейронів, які можна концептуалізувати як «нейронні ланцюги». Ключовою особливістю, що визначає поведінку будь-якого такого нейронного ланцюга, є схема синаптичних ваг, що з'єднують окремі нейрони. Наслідком цієї гіпотези є висновок про те, що нова інформація зберігається, коли активність в ланцюзі викликає тривалу зміну структури синаптичних ваг.

Експериментальна підтримка самого існування таких тривалих, залежних від активності змін синаптичної сили з'явилася на початку 1970-х років, коли з'явилися дані щодо того, що повторна активація збудливих синапсів у гіпокампі викликала потенціацію, яка може тривати годинами чи навіть днями. (Andersen et al., 2006; Bliss & Gardner-Medwin, 1973; Bliss & Lomo, 1973) Це явище, яке наразі називають *довготривалою потенціацією*, було об'єктом інтенсивного дослідження, оскільки існує широка думка, що довготривала потенціація є важливою для розуміння деяких клітинних та молекулярних механізмів, за допомогою яких формуються спогади. (S. J. Martin et al., 2000; Pastalkova et al., 2006; Whitlock, 2006)

Вважається, що довготривала потенціація гіпокампа – це лише одна з декількох різних форм тривалої синаптичної пластичності, які існують у мозку ссавців. Добре встановлено, що більшість синапсів, які демонструють довготривалу потенціацію, також виражають одну або кілька форм довготривалої депресії. Таким чином, ключовим поняттям є те, що синаптична сила збуджуючих синапсів двосторонньо змінюється. (Citri & Malenka, 2008)

Також розглядають інші види пластичності, такі як, наприклад, *гомеостатична пластичність* та *метапластичність*. (Abraham & Bear, 1996; Turrigiano & Nelson, 2004) Головною формою гомеостатичної пластичності є «синаптичне масштабування», яке описує явища, завдяки яким сила всіх синапсів у даній клітині регулюється у відповідь на

тривалі зміни активності. Зокрема, тривале зниження загальної активності спричиняє збільшення загальної синаптичної ефективності, тоді як тривале збільшення активності викликає, навпаки, її зменшення. Ця форма пластичності діє на значно повільніші часові шкали ніж довготривала потенціація та депресія і може бути особливо важливою під час розвитку нейронних ланцюгів. Метапластичність означає вплив, який діяльність може мати на здатність синапсів виражати тривалу пластичність.

Найбільш широко вивченими є такі форми синаптичної пластичності як довготривала потенціація та депресія в області CA1 гіпокампа, які є НМДА-залежними. Інтерес щодо вивчення цього процесу пояснюється переконливими свідченнями участі цих видів пластичності у формуванні різних форм довготривалої пам'яті, які були отримані у гризунів, приматів і людей. (S. J. Martin et al., 2000)

Основним успіхом у розумінні збуджуючої синаптичної передачі та механізмів, що обумовлюють довготривалу потенціацію стала демонстрація того, що два основних типи іонотропних рецепторів глутамату (АМПА- та НМДА-рецептори) сприяють постсинаптичній відповіді на глутаматергічні синапси. Ці рецептори часто, виявляються колокалізованими на окремих дендритних шипиках. АМПА-рецептор є проникним для одновалентних катіонів (Na^+ і K^+), і активація даного рецептора забезпечує більшу частину внутрішнього струму, який генерує збуджуючу синаптичну відповідь, коли мембрана клітини близька до потенціалу спокою. На відміну від АМПА-рецепторів, НМДА-рецептор виявляє сильну залежність від напруги через блокування його каналу магнієвим блоком при негативних мембранних потенціалах. Як результат, НМДА-рецептори мало сприяють постсинаптичній реакції під час базової синаптичної активності. Однак, коли клітина деполяризована, магній дисоціює зі свого сайту зв'язування, дозволяючи іонам кальцію та натрію потрапляти в клітину.

Встановлено, що індукція довготривалої потенціації в області CA1 гіпокампа вимагає активації НМДА-рецепторів під час сильної постсинаптичної деполяризації, що призводить до збільшення постсинаптичної концентрації кальцію, що, ймовірно, має досягти деякого критичного порогового значення для активації біохімічних процесів, необхідних для індукції довготривалої потенціації. (Robert C Malenka & Bear, 2004; Nicoll & Malenka, 1999) Експериментально це, як правило, досягається шляхом застосування високочастотної тетанічної стимуляції до синапсів або використання „протоколу сполучення”, під час якого постсинаптична клітина безпосередньо деполяризується при підтримці синаптичної низькочастотної активації.

Через те, що його внесок у постсинаптичні зміни повторно вимагає як пресинаптичного вивільнення глутамату, так і постсинаптичної деполяризації через одночасну активацію популяції синапсів, НМДА-рецептор можна назвати «детектором збігу». (Citri & Malenka, 2008) Ці властивості НМДА-рецептора також пояснюють основні властивості НМДА-залежної довготривалої потенціації. Такі характеристики як кооперативність та асоціативність виникають через необхідність одночасної активації декількох синапсів для генерації адекватної постсинаптичної деполяризації, яка видаляє магнієвий блок рецептора.

Також було показано, що велика кількість молекул нейротрансмітерів відіграє певну роль у передачі кальцієвого сигналу, необхідного для запуску довготривалої потенціації. (Robert C. Malenka & Bear, 2004) В той же час лише для кількох з таких молекул показано обов'язкову участь у індукції довготривалої потенціації. Наприклад, було показано, що кальцій/кальмодулін(CaM) -залежна протеїнкіназа II (CaMKII) відіграє ключову роль у формуванні довготривалої потенціації. CaMKII зазнає автофосфорильяції після запуску довготривалої потенціації, її індукція була неможливою як у мишей нокауту критичної субодиниці CaMKII, так і у тварин, у яких

ендогенна CaMKII була замінена формою, на якій відсутня ділянка автофосфорилування. Крім того, інгібування активності CaMKII шляхом прямого завантаження постсинаптичних клітин пептидами, які погіршують функцію CaMKII, блокує довготривалу потенціацію. (Malenka et al, 1989; Malinow et al, 1989) Тоді як різке збільшення постсинаптичної концентрації активної CaMKII збільшує синаптичну ефективність і ймовірність індукції довготривалої потенціації.

1.5. Протеази в ЦНС та їх рецептори

Серинові протеази, інгібітори серинових протеаз та протеазаактивовані рецептори (ПАР) широко відомі через їх вплив на коагуляцію, гемостаз та запалювальні процеси. Останні дослідження демонструють, що ці білки ендogenно зустрічаються в центральній нервовій системі та беруть участь як у нормальній фізіології її тканин, так і в супутніх різним захворюванням ЦНС процесах. Відомо, що серинові протеази, їх попередники, ендogenousні інгібітори та рецептори впливають на синаптичні функції та формування поведінки. Було продемонстровано залученість ПАР у процеси формування емоційно-зумовленої пам'яті та тривожній поведінці. Окрім того, активність цих молекул, яка відхилюється від норми, відіграє істотну роль у багатьох неврологічних захворюваннях, таких як, наприклад, нейродегенеративні захворювання, інсульт, черепно-мозкові травми та ін.

Протеазаактивовані рецептори (ПАР) представляють собою сімейство з чотирьох рецепторів, спряжених з G-білком (ПАР1-4), які активуються протеолітичним розщепленням їх аміно-сайтів сериновими протеазами, такими як, наприклад, тромбін, плазмін та трипсін (табл. 1.3).

Таблиця 1.3

Протеази, які активують та інактивують ПАР

	ПАР1	ПАР2	ПАР3	ПАР4
Активуючі протеази	Тромбін FXa APC Гранзим А Трипсін	Трипсін Триптаза FVIIa FXa NT-SP1 Протеаза 3 Акрозін	Тромбін Катепсін G	Тромбін Трипсін Катепсін G
Інактивуючі протеази	Плазмін Катепсін G Еластаза Протеаза 3 Трипсін	Катепсін G Еластаза		
Розщеплювані сайти	LDPR ⁴¹ ↓ S ⁴² FLLRN	SKGR ³⁴ ↓ S ³⁵ LIGKV	LPIK ³⁸ ↓ T ³⁹ FRGAP	PAPR ⁴⁷ ↓ G ⁴⁸ YPGQV
Локалізація	Тромбоцити, ендотелій, фібробласти, моноцити, нервові клитини, астроцити.	Ендотелій, епітелій, фібробласти, моноцити, нервові клітини, астроцити.	Тромбоцити, ендотелій, моноцити, астроцити.	Тромбоцити, ендотелій, моноцити, астроцити.

L – лейцин, D – аспарагінова кислота, P – пролін, R – аргінін, F – фенілаланін, N – аспарагін, S – серін, K – лізин, G – гліцин, I – ізолейцин, V – валін, T – треонін, Y – тірозин, Q – глутамін, A – аланін

Це розщеплення формує нову аміно-терміналь, яка діє в якості ліганда для активації рецептора. Також ПАР можуть бути активовані короткими пептидними послідовностями, які імітують пов'язаний ліганд. Ці короткі пептиди-агоністи використовуються для вивчення ролі ПАР в багатьох типах клітин, в яких вони були знайдені.

Загальні властивості ПАР, їх структура, активація та сигналізація добре описані (Almonte et al., 2007, 2013). Також відома їх участь у розвитку ЦНС, нейропротекторних процесах та нейродегенеративних захворюваннях (Bourgognon et al., 2013) (рис. 1.3).

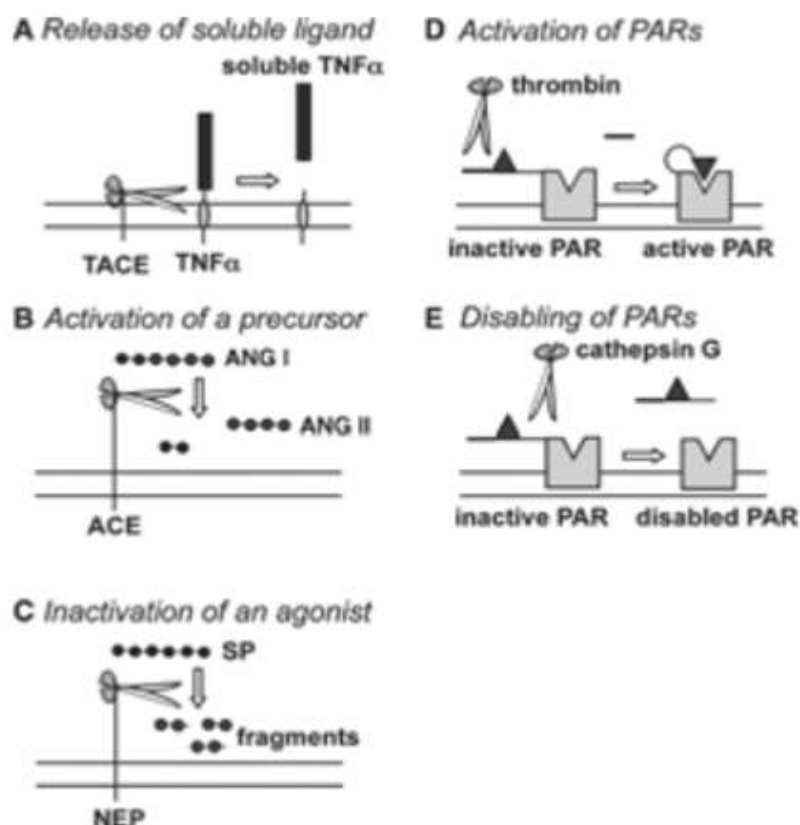


Рис. 1.3. Механізм регуляції сигнальних шляхів під впливом протеаз. А – визволення розчинного фактора некрозу (TNFα); TNFα – перетворюючий фермент TACE. В – утворення біологічно-активних пептидів; ангіотензин I (ANG I), ангіотензин II (ANG II), ангіотензин-утворюючий фермент (ACE). С – інактивація нейропептида (SP) під дією нейтральної ендопептидази (NEP). D – активація ПАР тромбіном. Е – інактивація ПАР катепсином G (Яровая, Г.А., Блохина, Т.Б., Нешкова, 2009)

Активация всіх чотирьох ПАР має загальний механізм за допомогою якого протеази розщеплюють специфічні центри в екстрацелюлярних N-кінцевих ділянках рецепторів. Це розщеплення експонує нову N-кінцеву ділянку, яка служить сполучним лігандним доменом, і взаємодіє з ділянками другої екстрацелюлярної петлі розщепленого рецептора, що і призводить в результаті до ініціювання трансдукції сигналу. Функція N-термінального фрагмента рецептора, який видаляється протеолізом, поки не відома.

1.5.1. Протеазаактивованний рецептор 1

Протеаза-активованний рецептор 1 (ПАР1) – нетиповий рецептор, спряжений з G-білком, який активується протеолітичним розщепленням під дією серинової протеази. Дослідження показали, що інгібування активації ПАР1 має нейропротекторний вплив в моделях ішемії, мозкових травм та нейротоксичних впливів, хоча про вплив ПАР1 на нормальне фізіологічне функціонування мозку відомо досить мало.

ПАР1 представляє собою білок, що складається з 425 амінокислотних залишків, які формують 7 гідрофобних доменів. ПАР1 містить внутриклітинну N-кінцеву послідовність з 75 амінокислотних залишків, включаючи тромбін-зв'язуючий сайт (LDPR41 ↓ S42 FLLRN, де ↓ означає сайт протеолізу тромбіном). ПАР1 експресується тромбоцитами, епітеліальними клітинами, фібробластами, міоцитами, нейронами та астроцитами. В центральній нервовій системі ПАР1 експресується в гліальних клітинах і нейронах гіпокампа, регіону, відповідального за формування пам'яті.

Активация ПАР1 проходить шляхом розщеплення аміно-терміналі сериновою протеазою, яке формує нову аміно-терміналь (рис. 1.4). Під час активації ПАР1 може утворювати пари з $G\lambda q/11$, $G\lambda i/o$, $G\lambda 12/13$ з активацією їх відповідних сигнальних шляхів (Almonte et al., 2013; Inostroza et al., 2011). В ЦНС активация ПАР1 може впливати на

підвищення експресії PAR1, секрецію фактору росту нервів (NGF), розвиток нейритів та проліферацію астроцитів (D. Isaev et al., 2015). У мозку ссавців PAR1 інтенсивно експресується у специфічних ділянках кори, базальних гангліях, стріатумі та сірій речовині (Kemppainen et al., 2006). Також показано експресію PAR1 в мигалеподібному комплексі та гіпокампі, тобто зонах, важливих для навчання та пам'яті та обробки емоційних реакцій. У гіпокампі PAR1 експресується в астроцитах та нейронах (Lopes et al., 2016).

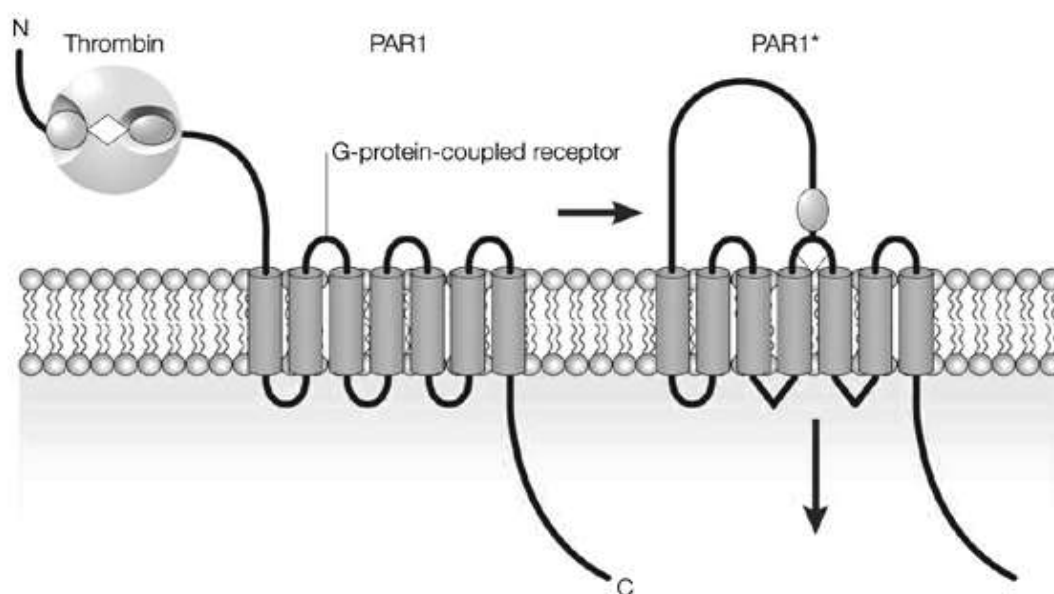


Рис. 1.4. Активація PAR1. PAR1 активуються протеолітичним розщепленням їх аміно-терміналі сериною протеазою з подальшим формуванням нової аміно-терміналі, що як наслідок провокує каскад клітинної сигналізації (Coughlin, 1999)

У мишиній моделі нікотинової залежності активація PAR1 на дофамінергічних нейронах регулює нікотин-індукований дофаміновий викид та пов'язаний з ним поведінковий рефлекс (Campos et al., 2013). Також активація PAR1 може модулювати синаптичні відповіді у гіпокампі. Активація PAR1 в астроцитах веде до везикулярного

вивільнення глутамату, який може бути зв'язаний НМДА-рецепторами нейронів, і таким чином активація PAR1 може впливати на функцію НМДА. (Lopes et al., 2016) Для всіх типів клітин, у яких були знайдені PAR1, показано, що активація PAR1 є тригером ERK/MAPK сигнальних шляхів (Lopes et al., 2016; McNHugh et al., 2004), таким чином в нормі PAR1 ймовірно може брати участь у регуляції синаптичної пластичності та проліферації ендотеліальних клітин при ангіогенезі.

У мозку ссавців експресія PAR1 виявлена у специфічних нейрональних та гліальних популяціях кори, базальних гангліїв, стріатуму та сірої речовини (Airan et al., 2009; Lopes et al., 2016; Pellow et al., 1985a; Shi et al., 2007). Як у гіпокампі людини, так і у гризунів, дослідження показали експресію PAR1 в астроцитах (McNHugh et al., 2004; Pellow et al., 1985a; Shi et al., 2007; Wheaton & Coughlin, 1991)

PAR1 активно досліджується також через його роль у неврологічних порушеннях спричинених ішемією та мозковими травмами. В ішемічній та гіпоксичній моделях видалення або фармакологічна блокада PAR1 призводить до зменшення об'єму інфаркту (Airan et al., 2009). В моделі колотої рани кортикальної області активація PAR1 є тригером астрогліозу, пов'язаного з формуванням рубців після черепно-мозкової травми (Soh et al., 2010). Інгібування або видалення PAR1 мало нейропротекторний вплив у дофамінергічних нервових терміналях в стріатумі мишиної моделі хвороби Паркінсона (Matys et al., 2004). В моделях нікотинової та морфінової залежностей активація PAR1 на дофамінергічних нейронах регулює нікотик-індуковані дофамінові викиди (Robert Pawlak et al., 2003). Ці дані дозволяють зробити висновок щодо різноманіття ролей PAR1 у нормальній роботі мозку і при патологічних ушкодженнях.

Показано, що активація PAR1 модулює синаптичні відповіді в гіпокампі. Електрофізіологічна реєстрація сигналів пірамідальних клітин зони CA1 гіпокампа показала, що активація PAR1 призводить до

потенціації НМДА-опосередкованих струмів (R. Pawlak et al., 2005), може пояснювати полегшення індукції довгострокової потенціації за умов присутності в позаклітинному середовищі активаторів цих рецепторів (Almonte et al., 2007). З використанням моделі ПАР1-дефіцитних мишей показано, що зниження кількості ПАР1 призводить до дефіциту пам'яті та навчання в тестах, пов'язаних з пасивним униканням, формуванням умовних рефлексів та формуванням контекстуальних умовних рефлексів (Campos et al., 2013). Ці дані дозволяють припустити можливість щодо залучення ПАР1 у регуляцію НМДА-залежних механізмів формування пам'яті та синаптичній пластичності.

1.5.2. Локалізація ПАР1 в зонах, задіяних у регуляції емоційно-мотивованої поведінки

У мозку ссавців експресія ПАР1 виявлена у специфічних нейрональних та гліальних популяціях кори, базальних гангліїв, стріатуму та сірої речовини (Bokoch et al., 2010; Horii, 2008; Samson & Medcalf, 2006a). У гіпокампі дослідження показали експресію ПАР1 в астроцитах і нейронах (Luo et al., 2007b; R. Pawlak et al., 2005; Traynelis & Trejo, 2007) переважно у пірамідному шарі гіпокампа.

Активація ПАР1 в астроцитах призводить до везикулярного вивільнення глутамату, що потім сприймається НМДА-рецепторами нейронів, таким чином ПАР1 впливає на функціонування НМДА рецепторів та процеси синаптичної пластичності (Luo et al., 2007a; R. Pawlak et al., 2005; Traynelis & Trejo, 2007). Таким чином, ПАР1 може впливати на синаптичну пластичність та поведінкові реакції, зокрема, через посередницькі процеси у тристоронніх синапсах (Kandel & Pittenger, 1999; Traynelis & Trejo, 2007).

1.5.3. Роль PAR1 та механізми участі PAR1 у регуляції поведінкових реакцій

Показано, що PAR1 беруть участь в регуляції поведінки, пов'язаної з тривожністю у епілептичних щурів (Kandel & Pittenger, 1999). PAR1 також відіграє принципову роль в процесах пасивного уникнення та формуванні умовного рефлексу замирання, характерних типах тривожної поведінки. Відома важливість активності PAR1 для НМДА-залежного формування пам'яті та довготривалої синаптичної пластичності в гіпокампі (рис. 1.5). (Almonte et al., 2007, 2013; Bourgognon et al., 2013) Сім трансмембранних G-білків (GPCR,) складають найбільш численне сімейство сигнальних білків і активуються різними природними лігандами. Агоніст зв'язування GPCR трансдукує клітинні сигнали для широкого діапазону G білків, пов'язаних з різними біохімічними шляхами.

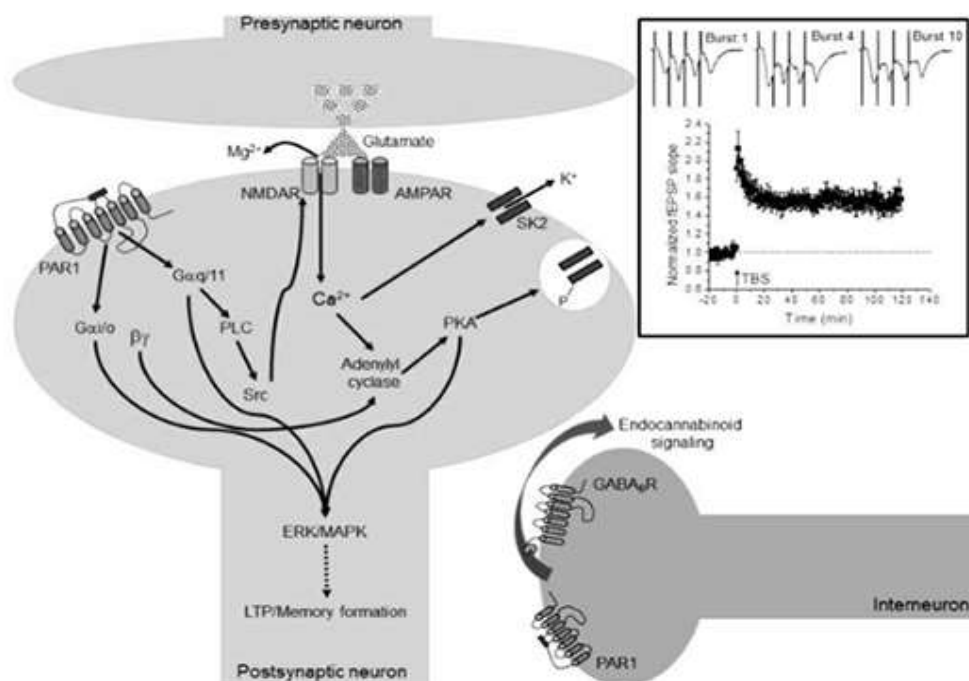


Рис. 1.5. А Модель участі PAR1 у гіпокампальній синаптичній пластичності (Bourgognon et al., 2013)

Протеаза-активовані рецептори – сімейство G-білків, які активуються протеолізом їх N-термінального домена, діючи на прив'язний ліганд, який діє в якості агоніста відносно рецептора (R. Pawlak et al., 2005). ПАР1 вивчено найкраще з усього сімейства цих білків. ПАР1 може бути протеолізовано рядом протеаз, таких як тромбін, tPA, плазмін, X фактор, активований протеїн C, які мають різні особливості субстрату.

Таким чином після розщеплення N-кінцевої ділянки ПАР1 генерується інший N-кінець, відповідно до різних протеаз, викликаючи різні, навіть контрастні клітинні реакції. (Hogii, 2008)

Позаклітинні протеази в мигдалеподібному комплексі та гіпокампі є ключовими регуляторами нейронної активності, пов'язаної зі страхом та тривожністю (рис. 1.6, 1.7). (Almonte et al., 2007; Campos et al., 2013; Robert Pawlak et al., 2003) Вивільнення протеаз в область збудливих синапсів (Bourgognon et al., 2013; Robert Pawlak et al., 2003) модулює нейронну активність шляхом сколювання мембранних рецепторів, латентних факторів росту або адгезивних молекул (Matys et al., 2004). Ці протеази також активують ПАР1, активність якого пов'язана також з передачею синаптичного збудження та навчанням (Samson & Medcalf, 2006b).

Пам'ять про пережитий страх набувається за допомогою нейронної пластичності, спланованої послідовності подій, що регулюється на рівні іонного обміну та клітинному рівні. Традиційна модель формування набутого страху передбачає унімодальну (тобто збудливу або інгібуючу) роль модуляторних рецепторів в контролі нейронної активності та навчання. Всупереч цьому, показано, що ПАР1 провокують контрастні нейронні реакції у залежності від емоційного стану тварини шляхом динамічного зсуву між різними частинами пар G-білків (Robert Pawlak et al., 2003)

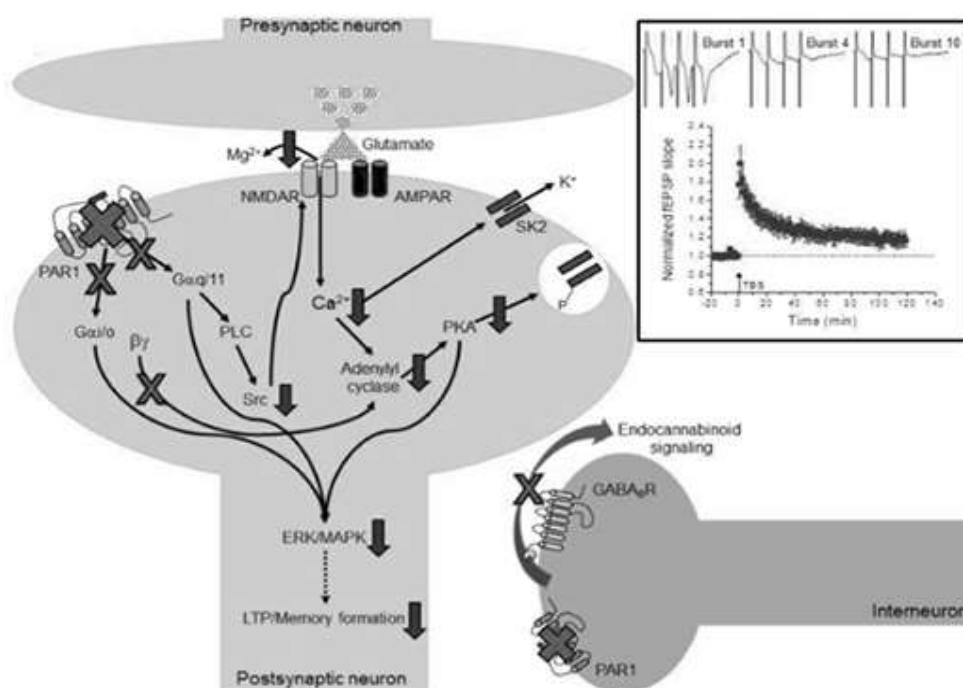


Рис. 1.6. Модель, яка характеризує наслідки втрати функціонування ПАР1 (Bourgognon et al., 2013)

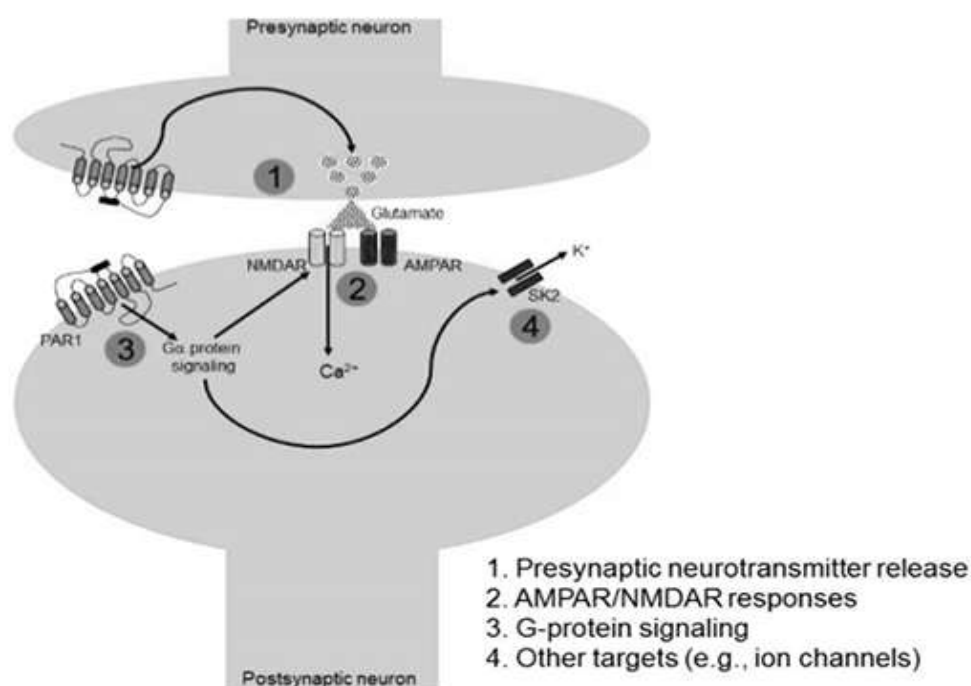


Рис. 1.7. Потенційні сайти для ПАР1-регуляції індукування довготривалої потенціації. Принципова електрична схема, яка зображує потенційні синаптичні компоненти які регулюються ПАР1 під час індукування довготривалої потенціації (Almonte et al., 2013)

Стимуляція PAR1 перед формуванням рефлексу, але після інгібування, збуджує базальні нейрони мигдалеподібного комплексу. Первісне погіршення довгострокової потенціації у PAR1-дефіцитних мишей провокувало збільшення довгострокової потенціації і підвищення страху після утворення рефлексу. Ці ефекти корелюють з більш частими AMPA-рецептор-опосередкованими незначними постсинаптичними подіями та підвищеною збудливістю нейронів (Robert Pawlak et al., 2003).

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Методичні підходи

Для дослідження ролі ПАР1 у патогенезі поведінкових реакцій щурів після ЕС застосовувались такі методичні підходи:

- виділення гостроізолюваних зрізів гіпокампа;
- методи реєстрації викликаних позаклітинних потенціалів;
- поведінкові тести.

2.1. Експериментальні тварини

В даній роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця та мали вільний доступ до їжі та води. Усі протоколи досліджень та експерименти дотримувались положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 року), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 року) та інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі, що було підтверджено комітетом біомедичної етики Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця.

Вік тварин, яких брали в експерименти, становив 27-28 дні. Тварини були розподілені на чотири групи: контроль, контроль + SCH, ЕС, ЕС + SCH.

2.2. Індукція епілептичного статусу

Для проведення експериментальних досліджень, присвячених вивченню патофізіологічних механізмів епілептогенезу та вдосконаленню методів лікування епілепсії, загальноприйнятими вважаються модель кіндлінгу та постстатусні моделі. Показано, що після введення агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів, пілокарпіну, у тварин послідовно реєструються поведінкові й електрографічні зміни, які характеризують три основні періоди формування пілокарпін-зумовленого розвитку хронічної епілепсії: гострий період, латентний період та хронічний період з повторюваними спонтанними судомами (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Схема проведення експериментального дослідження та відображення стадій формування епілепсії

Для зменшення смертності тварин у процесі ініціації епістатусу ми використовували протокол повторних ін'єкцій з малими дозами пілокарпіну (Glien et al., 2001).

За 20-22 год до ін'єкції агоніста мускаринових ацетилхолінових рецепторів щурам інтраперитоніально вводили розчин LiCl (127 мг/кг), розчинений у 0.9 % хлориду натрію. Ін'єкції пілокарпіну здійснювали з інтервалом 30 хв з початковою дозою 40 мг/кг та наступними дозами 10 мг/кг до моменту появи ЕС. Початком ЕС вважали досягнення експериментальними тваринами V стадії епілептичних нападів за

шкалою Расіна (табл. 2.1) (Racine et al., 1972). Тварини, що не досягали V стадії епілептичних нападів при дозі пілокарпіну 60 мг/кг, вважалися резистентними до ін'єкцій пілокарпіну та були виключені з експерименту. Через 60 хв після початку ЕС епілептичні напади зупиняли за допомогою двох ін'єкцій діазепаму (по 20 мг/кг кожна) з інтервалом 5 хв.

Таблиця 2.1

Шкала оцінки тяжкості судом за умов експериментальної епілепсії

Стадія	Поведінкові прояви
0	Нормальна поведінка тварин
1	Гіперсалівація, занепокоєння, підвищений рівень рухової активності, посилення дефекації
2	Атипові міоклонічні судоми голови
3	Міоклонічні судоми кінцівок і тулуба
4	Поза «кенгуру»: клонічні судоми кінцівок, тонічні судоми тулуба
5	Важкі тоніко-клонічні судоми з втратою пози

Через 15 хв після припинення епілептичних нападів щурам вводили інтраперитоніально селективний блокатор ПАР1 рецепторів (SCH79797 [SCH]) або відповідний об'єм ін'єкції 0.9 % розчину хлориду натрію. SCH вводили в концентрації 25 мкг/кг. Ін'єкції SCH для експериментальних груп та відповідні за об'ємом ін'єкції 0.9 % розчину хлориду натрію для контрольних тварин повторювали протягом 10 днів (Bogovik et al., 2017).

З 14-го по 21-й дні дня після ЕС проводили поведінкові тести та електрофізіологічні дослідження.

2.3. Поведінкові тести

2.3.1. Тести на збудливість

Поведінкові тести на збудливість проводили через 14 днів після ініціації ЕС протягом 3 днів. Поведінкові тести на збудливість, розроблені в лабораторії DeLorenzo (Rice et al., 1998), широко використовуються для перевірки антиепілептичних сполук та можуть бути використані у якості поведінкових маркерів епілептогенезу (Brandt et al., 2006, 2007; Polascheck et al., 2010). Ці тести були в свою чергу запозичені з комплексу обсерваційних тестів функціонального стану тварин, описаних в статті Мозер та співавторів (V C Moser et al., 1988). Нами було проведено три тести, які вважаються найбільш чутливими для дослідження епілепсії: тест на наближення предмету, тест на дотик і тест на піднімання тварини. Результати кожного тесту оцінювали за відповідною шкалою.

Тест на наближення предмету: предмет (у нашому випадку: скляна паличка) у вертикальному положенні повільно і поступово наближають у напрямку до морди тварини (табл. 2.2).

Тест на дотик до тварини: тупим кінцем олівця експериментатор обережно доторкується до спини щура біля основи хвоста (табл. 2.3).

Тест на піднімання тварини: тварину піднімають обхопивши навколо тулуба (табл. 2.4).

Таблиця 2.2

**Шкала оцінювання поведінкових реакцій тварин у тесті на
наближення до тварини**

Реакція	Бал
тварина не реагує на предмет	1
тварина повертається у напрямку до предмета і обнюхує його	2
тварина відходить від предмета	3
тварина завмирає	4
тварина стрибає геть від предмета	5
тварина стрибає у напрямку від предмета чи навіть нападає на нього	6

Таблиця 2.3

**Шкала оцінювання поведінкових реакцій тварин у тесті на дотик до
тварини**

Реакція	Бал
тварина не реагує на дотик	1
тварина обертається мордою до предмета	2
тварина відходить від предмета	3
при доторканні тварина завмирає	4
тварина здригається від торкання і розвертається у напрямку до предмета	5
тварина розвертається і відплигує геть від предмета	6
тварина відплигує від предмета з вокалізацією	7

Таблиця 2.4

**Шкала оцінювання поведінкових реакцій тварин у тесті на
піднімання**

Реакція	Бал
тварину підняти дуже легко	1
тварина дає себе підняти легко, але з вокалізацією	2
виникають складнощі, тварина дає себе підняти, але повертає морду у напрямку до руки	3
при підніманні тварина завмирає з або без вокалізації	4
тварину підняти важко, вона втікає від руки	5
тварина займає оборонну позицію, може атакувати руку	6

2.3.2. Тести на рівень тривожності

Тест «Відкрите поле»

«Відкрите поле» являє собою камеру розміром 100*100 см, розкреслену на 25 квадратів (5*5). Квадрати поділяються на дві групи: зовнішні (16 шт. на периферії) та внутрішні (9) у центрі. На початку тесту щура поміщають в центр камери. За природною схильністю здорова тварина прагне, по-перше, триматися біля стінок камери та уникати відкритого простору, та, по-друге, все ж таки дослідити нову територію. Таким чином, здорова тварина проводить більше часу у зовнішній частині камери, зрідка виходячі у внутрішню частину (рис. 2.2).

Тест «Хрестоподібно припіднятий лабіринт»

«Хрестоподібно припіднятий лабіринт» являє собою два перехрещені у формі хреста рукави, причому один з них закритий стінками (рис. 2.3). Закритий рукав дає можливість щуру уникати

яскравого світла і відкритого простору, тобто проявляти захисну поведінку. Вихід до відкритого рукава є проявом дослідницької поведінки.



Рис. 2.2. Будова установки «відкрите поле» (Maze basics¹)

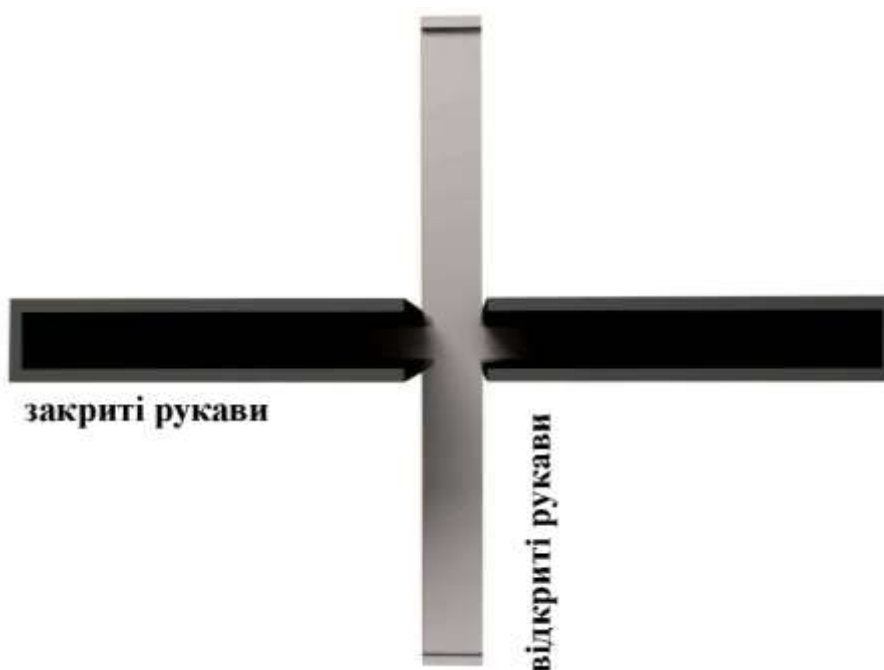


Рис. 2.3. Будова установки хрестоподібного припіднятого лабіринту (Maze basics²)

¹ Посилання на електронний ресурс: <https://mazeengineers.com/>

² Посилання на електронний ресурс: <https://mazeengineers.com/>

2.3.3. Водний тест (лабіринт) Морріса

Водний лабіринт Морріса (ВЛМ) є однією з класичних моделей вивчення просторової пам'яті і процесу навчання у лабораторних гризунів, розробленою Річардом Моррісом в 1984 році (Andersen et al., 2006). ВЛМ широко використовується для вивчення різноманітних нейрокогнітивних порушень і механізмів їх фармакологічної корекції (McHugh et al., 2004).

Принцип методу полягає у розміщенні експериментальної тварини в стартових точках в різних кутах басейну із замутною водою, звідки тварина має доплисти до встановленої підводної платформи. Оскільки платформа знаходиться в непрозорій воді, тварина не здатна покладатись на зір або нюх під час пошуку. Впродовж тестування фіксується час від старту до знаходження платформи. З кожною новою спробою цей час скорочується, а шлях спрощується, що свідчить про формування у тварини уявлення про просторове розміщення платформи на основі зовнішніх орієнтирів (рис. 2.4).

Як було показано раніше, просторове навчання залежить від скоординованої дії різних ділянок мозку та систем нейромедіаторів, що складають функціонально інтегровану нейронну мережу. Руйнування, так само як і порушення взаємозв'язків областей мозку, залучених у процесах просторового навчання (гіпокамп, базальні ганглії, базальні структури переднього мозку, мозочок, кора головного мозку), погіршують якість навчання в ВЛМ. За допомогою цього тесту, оцінюють динаміку формування твариною орієнтувальної навички, стратегію поведінки в ході досліджу, встановлюють поведінкові відмінності.

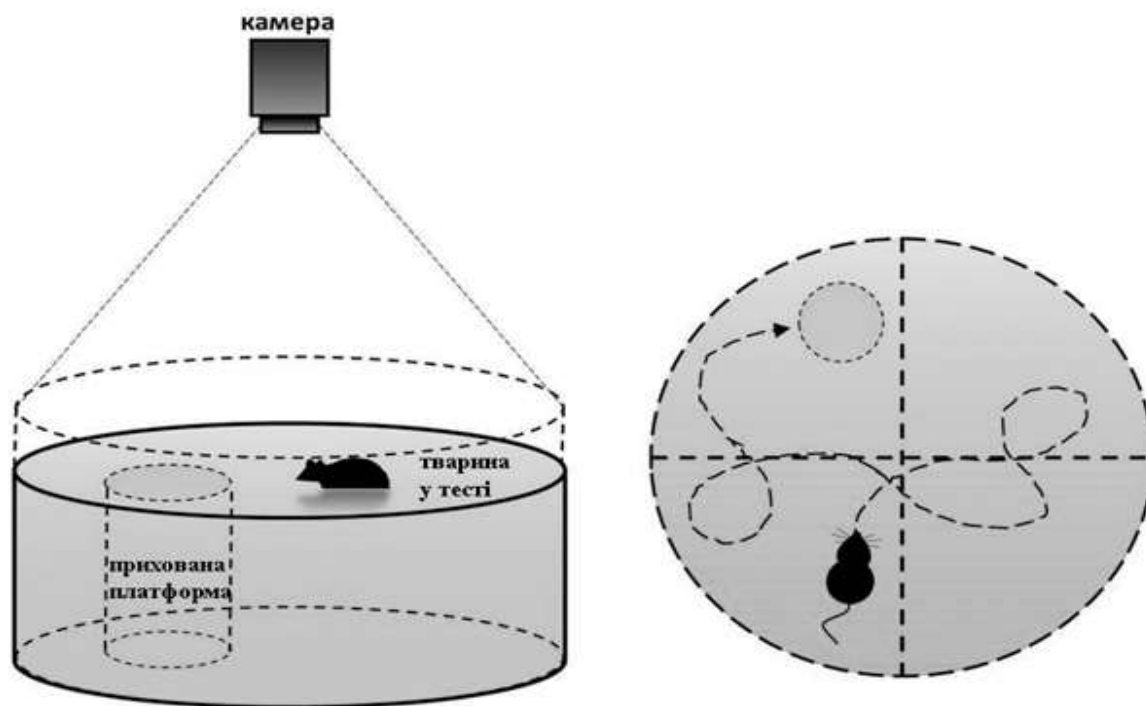


Рис. 2.4. Загальний вигляд водного лабіринту Морріса. Лінією позначена траєкторія руху тварини (Iptyshev et al., 2017)

Тестування проводили в круглому басейні, діаметром 1,5 м та висотою 40 см. Воду заздалегідь підігрівали до температури 25–26° С і фарбували харчовим барвником, безпечним для дослідних тварин. Тест складався з одного тренувального дня, коли завдання полягає у знаходженні видимої, припіднятої над водою, платформи (0.1 м x 0.1 м) і чотирьох дослідних днів зі схованою підводною платформою. Під час тренування платформа знаходилася над водою, а кожну тварину переміщували на платформу, де та знаходилась протягом 20 с. Далі щура поміщали в чотирьох різних стартових точках, звідки тварина мала дістатись платформи впродовж 60 с. У випадку, якщо тварині не вдавалося знайти платформу за 60 с, експериментатор орієнтував тварину, допомагаючи їй досягти платформи. Під час досліду, експериментальну тварину одразу розміщували на старті, а платформа була прихована під водою. У тестові дні кожен щур розміщувався у восьми різних точках (однакових для кожної експериментальної

тварини). Час досягнення платформи реєструвався і оцінювався для кожної спроби.

2.3.4. Тест «перегородка»

Тест «перегородка», розроблений у лабораторії Кроулі.(Crawley, 2006; Nadler et al., 2004), широко використовується для оцінки характеру соціальної поведінки дослідних тварин. Ідея тесту базується на тому, що за природною схильністю щури, як високо соціалізовані тварини, прагнуть більше часу проводити з іншою твариною аніж з неживими об'єктами. Тестова установка складається з трьох камер, відділених одна від одної за допомогою непрозорих перегородок. У бокових камерах установки знаходяться невеликі клітки, у яких може бути розміщений незнайомий тестованому щур (рис. 2.5).



Рис. 2.5. Будова установки тесту «Перегородка», справа та зліва у бічних камерах розміщені клітки для не знайомих тестованому щурів. У першій сесії тесту одна з кліток залишається пустою та виступає у якості неживого об'єкта. (Maze basics³)

³ Посилання на електронний ресурс: <https://mazeengineers.com/>

Тест складається з двох частин (сесій). У першій сесії тестованій тварині пропонується протягом десяти хвилин дослідити тестову систему, де в одній з бічних камер розміщена клітка з незнайомим щуром (суб'єкт 1), а у другій бічній камері розміщено пусту клітку, що виступає у якості неживого об'єкта. Оцінюється час, проведений твариною з суб'єктом 1 та об'єктом, а також загальна кількість переходів між камерами. Після закінчення першої сесії тварину виймали з установки та швидко поміщали нового незнайомого щура у пусту клітку (суб'єкт 2). За природною схильністю щури прагнуть більше часу проводити з незнайомим суб'єктом 2 (реакція на соціальну новизну). У другій сесії порівнюється час, проведений експериментальним щуром з суб'єктами 1 і 2. Також оцінюється час загальної соціальної взаємодії в двох сесіях, тобто загальний час проведений з суб'єктом 1 у першій сесії та суб'єктами 1 і 2 у другій.

2.3.5. Тест на дослідження обумовленого страху

Умовна реакція страху є однією з форм навчання, що базується на формуванні умовного рефлексу, який ґрунтується на зв'язку між стимулами та їх авersiveними наслідками. (Curzon et al., 2009)

Принцип роботи цього тесту ґрунтується на обумовленні вродженої реакції страху, яка для гризунів проявляється у завмиранні. Тест проводився за триденним протоколом, де у перший день тварині пропонувалося дослідити експериментальну установку та звикнути до неї (рис. 2.6). На другий день тварина отримувала безумовний стимул (больовий стимул по лапках) та умовний (звук). На третій день тварина отримувала лише умовний стимул. Час перебування тварини в експериментальній установці – 5 хв кожного дня, за цей період на другий та третій дні тестування вона отримувала по три стимули.

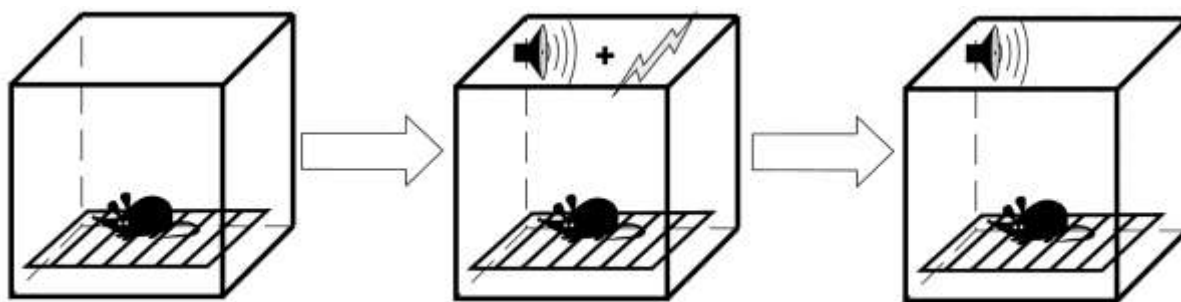


Рис. 2.6. Будова установки та схема проведення тесту на формування умовної реакції страху
(Warthen et al., 2011)

Оцінювали такі параметри як контекстуальний страх та умовна реакція страху. Для того, щоб оцінити рівень контекстуального страху порівнювали час завмирання за двадцять секунд до сигналу у другий та третій дні тесту для кожної з експериментальних груп. Для того, щоб оцінити рівень умовної реакції страху порівнювали час завмирання під час подання звукового сигналу у другий та третій дні тесту.

2.4. Метод отримання свіжоізольованих зрізів

Експериментальних щурів глибоко анестезували діетиловим ефіром з наступною декапітацією. За допомогою шпателя мозок обережно діставали із черепної коробки та розміщували у чашці Петрі із фільтрувальним папером на дні, заповненій льодяним оксигенованим (95% – O₂/5% – CO₂) модифікованим розчином ACSF (штучна цереброспінальна рідина, табл. 2.6).

За допомогою хірургічного леза відрізали мозочок, а далі робили серединний сагітальний надріз, тим самим розділяючи півкулі між собою. Використовуючи шпателі меншого розміру по чергові фіксували півкулі головного мозку, обережно відокремлюючи гіпокамп від оточуючих тканин. Виділений гіпокамп розміщували у заглибленнях заздалегідь виготовленого агарового блоку (3,7% агар, рис. 2.7). Кілька

крапель клею наносили на тарілку вібротома (SYS-NVLS, World Precision Instr., США) та розподіляли його тонким рівномірним шаром. Агаровий блок з гіпокампами приклеювали до поверхні тарілки, щоб забезпечити його надійну фіксацію під час виготовлення зрізів.

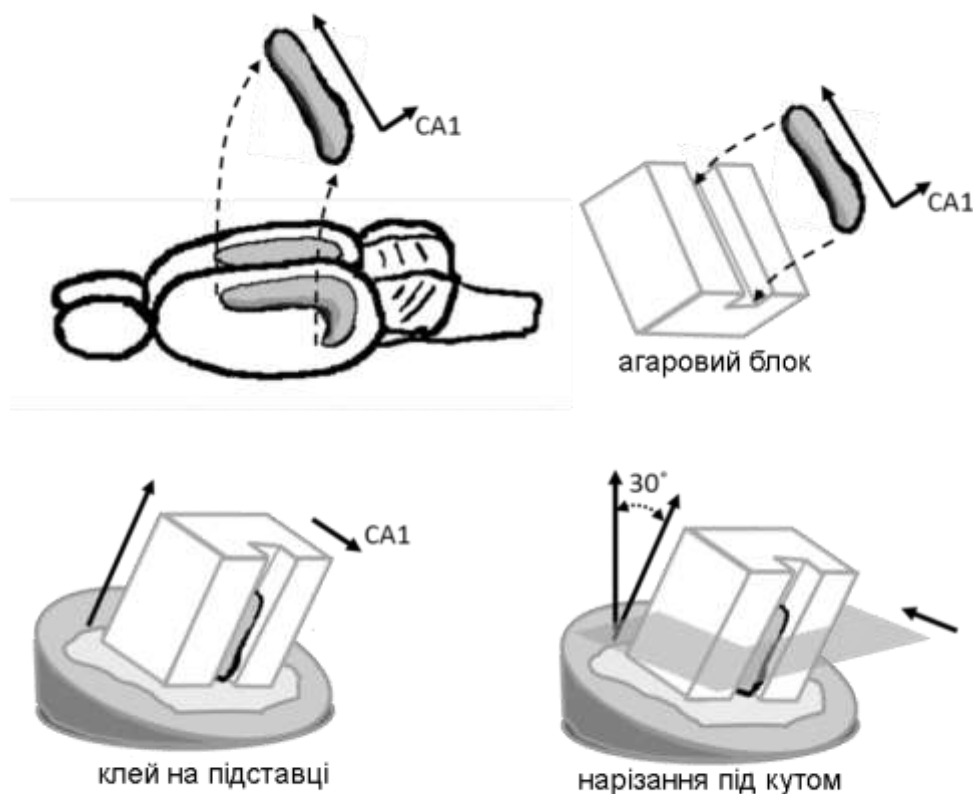


Рис. 2.7. Схема отримання свіжоізолюваних зрізів гіпокампа. (Yu-Wei Wu, 2012)

Товщина зрізів складала 400 мкм. Після виготовлення зрізи розташовували в інкубаційній камері. Камера була заповнена ACSF (Т 26°C, табл. 2.5.), та оксигенувалась протягом всього досліджу.

2.5. Електрофізіологічні дослідження

Позаклітинні відведення виконувались від свіжоізолюваних зрізів гіпокампа. Для експерименту, зрізи були перенесені до термостатичної камери повністю зануреного типу (Warner Instrument Corp., США), де

вони постійно перфузувались оксигенованим ACSF зі швидкістю 2 мл/хв (30-32°C). Популяційні потенціали відводили від радіального шару апікальних дендритів CA1-зони гіпокампа за допомогою скляних мікроелектродів (1-3 МОм), заповнених ACSF, із використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму (A-M Systems, США; смугопропускання 0,1 Гц 1 кГц; коефіцієнт підсилення 100). Записи оцифровували із використанням аналогово-цифрового перетворювача (NI PCI-6221, National Instruments, США) та накопичували за допомогою програми WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Велика Британія).

Для реєстрації показників синаптичної пластичності гіпокампа, здійснювали подразнення колатералей Шаффера на рівні зони CA3 та відводили популяційні ЗПСП у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа. Зростаюча по інтенсивності стимуляція, починаючи із 10 мкА, прикладалась до CA3-аксонів кожні 5 с до досягнення максимальної амплітуди ЗПСП, або до появи популяційного спайку. Амплітуда стимулів при цьому досягала 5 – 10 мА. Для запису базової лінії, величину стимулу зменшували таким чином, щоб амплітуда ЗПСП дорівнювала приблизно 30% від максимальної відповіді. Подразнення наносили кожні 20 с. Запис стабільної базової активності тривав 10 – 15 хв. При флуктуаціях базових умов більш, ніж на 10% ми замінювали зріз. В залежності від досліджуваного виду синаптичної пластичності, ми застосовували різні протоколи її індукції.

Найпростішою формою синаптичної пластичності є полегшення синаптичної передачі та її депресія внаслідок парної стимуляції. Інтервал між стимулами дорівнював від 50 мс. Фасилітацію/депресію визначали як співвідношення амплітуди другого ЗПСП (A2) до амплітуди першого (A1), тобто $A2/A1$ (рис. 2.8).

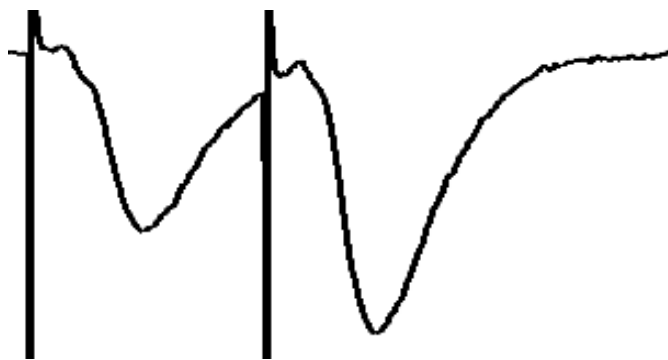


Рис. 2.8. Приклад фасилітації синаптичної пластичності внаслідок парної стимуляції

Однією із форм короткотривалої пластичності є посттетанічна потенціація (ПТП). ПТП являє собою короткотривале збільшення викиду нейромедіатора (Cook et al., 2003), яке найбільш вірогідно викликається під час високочастотної імпульсації (Cordero et al., 2005). При дослідженні ефекту пригнічення активності ПАР1 на процеси посттетанічної потенціації за контрольних умов та в умовах епілептичного статусу, використовували протокол короткотривалої високочастотної стимуляції (100 імпульсів із частотою 100 c^{-1}). Відомо, що посттетанічна відповідь включає в себе короткотривалу фазу – аугментацію (з константою спаду 5-10 с) і ПТП, але у зв'язку зі складністю розрізнення даних фаз, використовуючи наш експериментальний протокол, ми розглядали їх, як єдиний процес. Перед індукцією ПТП ми відводили базову активність протягом 10-20 хв. По отриманню стабільних базових умов, здійснювали подразнення колатералей Шафера короткотривалим високочастотним тетанічним стимулом, після чого повертались до вихідного протоколу стимуляції. ПТП оцінювалась як середнє трьох значень амплітуд ВПСП після тетанічної стимуляції. Також ми здійснювали контроль значень стимуляційного артефакту і волоконного потенціалу до і після індукції ПТП. Незмінність даних показників свідчить про стабільні умови реєстрації, що є необхідною умовою для отримання точних результатів.

Для індукції довготривалої потенціації ми використовували протокол тетанічної стимуляції, який складався із 100 стимулів, частотою 100 с^{-1} . Довготривала потенціація характеризувалась збільшенням потенціації, яке тривало більш ніж годину (рис. 2.9).

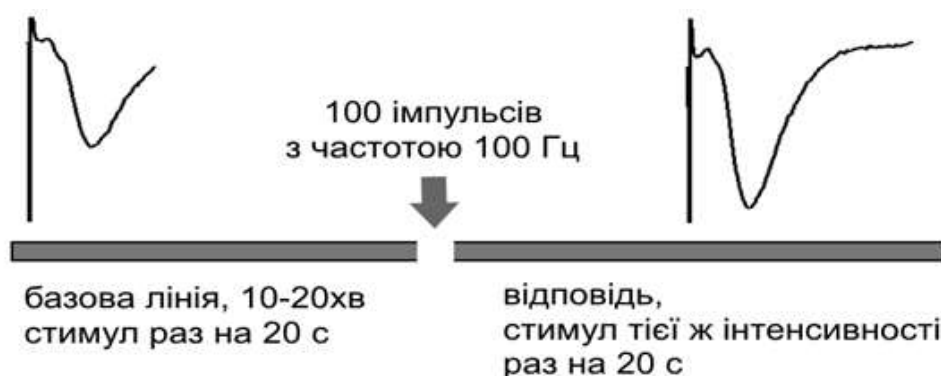


Рис. 2.9. Протокол індукції довготривалої потенціації, використаний нами в роботі

Збільшення ефективності синаптичної передачі після короточасної високочастотної (тетанічної) стимуляції, яке тривало протягом декількох хвилин, визначали, як посттетанічну потенціацію.

Синаптичну пластичність досліджували в чотирьох групах щурів: контроль, контроль + SCH, ЕС, ЕС + SCH, реєструючи сигнал у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа.

2.6. Хімічні реактиви

Селективний блокатор ПАР1 був придбаний у Tocris Bioscience, США. Всі інші хімічні реактиви були придбані у компанії Sigma-Aldrich, США.

Розчини для електрофізіологічних досліджень

Для виготовлення усіх експериментальних розчинів використовували деіонізовану воду з високим опором. Значення рН розчинів контролювали за допомогою рН-метру Cyberscan 510 рН, з температурним сенсором. Питоме значення рН досягалося під час

постійної карбогенізації (95% – O₂/5% – CO₂) розчину за допомогою додавання стокового розчину NaOH (табл. 2.5-2.6).

Точність вимірювання pH-метра 0.01 pH.

Таблиця 2.5

Склад базового зовнішньоклітинного розчину ACSF (mM)

NaCl	119
KCl	3,5
CaCl ₂	2,0
MgSO ₄	1,3
NaHCO ₃	26
NaH ₂ PO ₄	1,0
Глюкоза	11
pH	7,35

Таблиця 2.6

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

NaCl	87
KCl	2,5
CaCl ₂	0,5
MgCl	7
NaHCO ₃	25
Сахароза	75
NaH ₂ PO ₄	1,25
Глюкоза	25
pH	7,35

Така модифікація дозволяє зменшити збудливість клітин під час приготування зрізів та таким чином підвищити їх виживаність для подальшої роботи. Модифікований таким чином розчин ACSF часто використовують в електрофізіологічних дослідженнях, з метою продовження часу життя зрізів в цілому та клітин на поверхні зріза безпосередньо.

Розчини для ін'єкцій

Стоковий розчин блокатору ПАР1 рецепторів (Tocris Bioscience, США) було приготовано з використанням 98% спирту. Для експериментальної роботи сток блокатору додавали до 0,9% розчину NaCl та отримували розчин для ін'єкцій з концентрацією блокатора 25 $\mu\text{g/kg}$. Контрольні тварини отримували дози розчину 0,9% NaCl з еквівалентним об'ємом спирту.

Розчин пілокарпіну для ін'єкцій (Sigma-Aldrich, США) отримували, розчиняючи пілокарпін у 0,9% розчині NaCl.

2.7. Методи статистичного аналізу

Для обробки та аналізу результатів використовували такі програми: Clampfit (Axon Instruments, США), Origin 7.5 (OriginLab, США), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Для визначення нормальності розподілу всі набори даних аналізувалися тестом Шапіро-Вілка.

Результати у роботі представлені у вигляді «середнє значення $\pm$ стандартна похибка середнього». У випадку, якщо результати були розподілені за Гаусом, для визначення статистичної вірогідності міжгрупових розбіжностей використовували дисперсійний аналіз (ANOVA, ANalysis Of VAriance) з подальшим post-hoc аналізом за допомогою тесту Тьюкі.

Деякі з результатів поведінкових тестів не відповідали критерію нормальності розподілу, у такому випадку для їх аналізу

використовували метод дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями з подальшим post-hoc аналізом за допомогою тесту Дана. Вірогідними вважались розбіжності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Наслідки епілептичного статусу, індукованого у молодому віці, та ефект блокування ПАР1, щодо поведінкових реакцій щурів

Першим завданням дослідження було ідентифікування впливу епілептичного статусу спричиненого у молодому віці на поведінкові реакції молодих експериментальних тварин, і визначення ролі ПАР1 у модуляції таких реакцій. Поведінкові тести є важливим етапом фізіологічних досліджень, який допомагає не лише визначити фенотип розладу пов'язаний із впливом зовнішніх факторів, але й допомогти з визначенням подальшої стратегії дослідження.

Більшість поведінкових досліджень спрямовано не просто на виявлення змін певної поведінкової реакції, але й на визначення структури ЦНС, що залучена в її реалізацію. Так, тест «водний лабіринт Моріса» в першу чергу визначає порушення функції гіпокампа, а результати тестів «відкрите поле» та «припіднятий хрестоподібний лабіринт» можуть бути пов'язаними із розладами таких структур як вентральний гіпокамп та мигдалеподібний комплекс. Нами було досліджено вплив ЕС та пригнічення функції ПАР1 на поведінку дослідних щурів у таких поведінкових тестах як «водний лабіринт Моріса», «відкрите поле» та «припіднятий хрестоподібний лабіринт», тест «перегородка» (спрямований на оцінку параметрів соціальності тварини), тести на наближення, доторк та піднімання, тест на дослідження обумовленого страху.

3.1.1. Зміни поведінкової збудливості щурів після епілептичного статусу та внаслідок блокування ПАР1

Спостереження за щурами через 2 тижня після ініціації ЕС виявили підвищену тривожність експериментальних тварин, їх різку

поведінкову реакцію при наближенні експериментатора та на звукові подразники, що відповідає попереднім дослідженням (Huang et al., 2012; Rice et al., 1998)

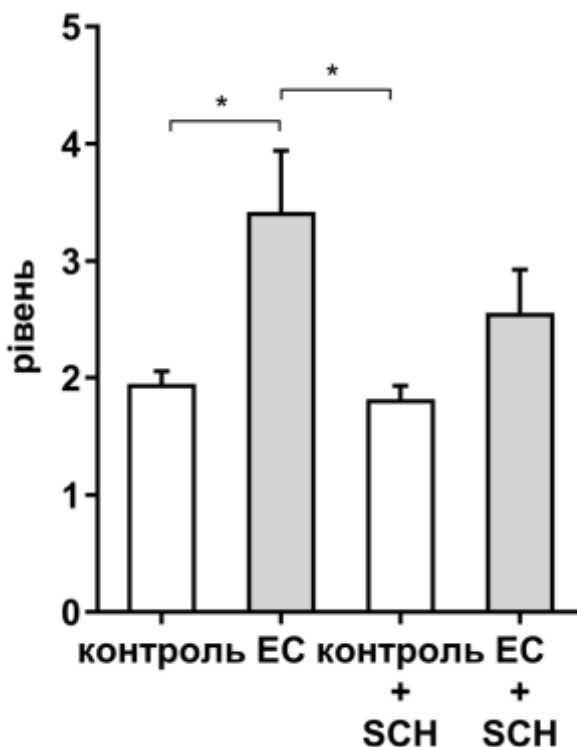


Рис. 3.1. Поведінкова збудливість щурів, визначена за оцінками тесту на наближення предмету до тварини. Пригнічення функції ПАР1 відновлювало поведінку тварин з ЕС до контрольного рівня.* $P < 0,05$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль + SCH $n = 10$, ЕС $n = 11$, ЕС + SCH $n = 13$

Для визначення впливу інгібітора ПАР1 на поведінкову збудливість дослідних тварин ми провели три тести: тест на наближення предмету до тварини, тест на піднімання тварини та тест на дотик до тварини. Дослідження поведінкових реакцій тварин здійснювали через 14 діб після ініціювання ЕС. Встановлено статистично достовірне підвищення збудливості тварин із історією епістатусу порівняно із контрольною групою та групою ЕС в усіх проведених тестах ($P < 0,05$;

рис. 3.1-3), що відповідає літературним даним щодо впливу ЕС на поведінкову збудливість дорослих тварин у літій-пілокарпіновій моделі ЕС (Almonte et al., 2007), але демонструє нові дані для ювенільного віку.

Окрім того, ці результати узгоджуються з даними, отриманими з використанням обсерваційних тестів проведених на дорослих тваринах. Так було показано, що після ЕС тварини часто виявляють агресію та підвищення збудливої поведінки (Striggow et al., 2001).

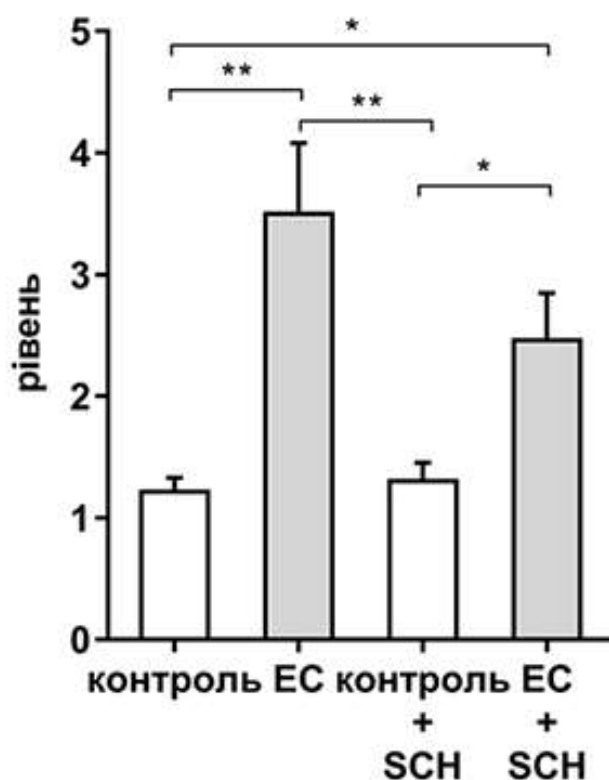


Рис. 3.2. Поведінкова збудливість щурів, визначена за оцінками тесту на піднімання тварини. Інгібітор ПАР1 знижував рівень поведінкової збудливості групи ЕС + SCH порівняно з показниками ЕС групи. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль + SCH $n = 10$, ЕС $n = 11$, ЕС + SCH $n = 13$

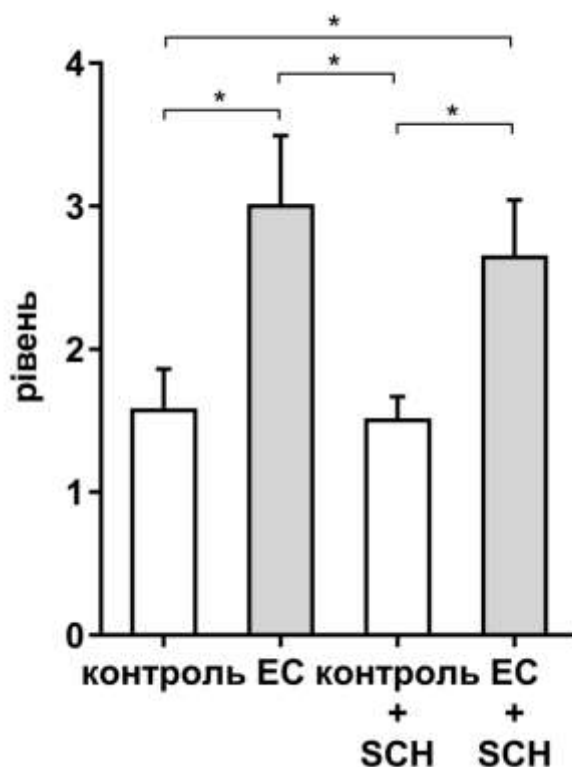


Рис. 3.3. Тест на дотик до тварини. Інгібування ПАР1 призводило до зниження збудливої поведінки тварин спричиненої ЕС. Кількість тварин у тесті: контроль n = 14, контроль + SCH n= 10, ЕС n = 11, ЕС + SCH n = 13

Між контрольною групою та групою контроль + SCH не виявлено значущої різниці ($P > 0,05$, в усіх тестах), що свідчить про відсутність ефекту ін'єкцій селективного блокатора ПАР1 на досліджувану форму поведінки у щурів контрольної групи. Між групами контроль/контроль + SCH та ЕС + SCH не спостерігали значущої різниці у тесті на наближення предмету ($P > 0,05$, рис. 3.1), що вказує на віновлення поведінки тварин після ЕС за умов інгібування ПАР1. У тесті на доторк не було виявлено ефекту блокування ПАР1 на поведінку для тварин після ЕС (рис 3.3). А у тесті на піднімання, який вважається найбільш чутливим в цій серії поведінкових тестів (Almonte et al., 2007), знижувався рівень збудливості у тварин групи ЕС + SCH порівняно зі

щурами групи ЕС (різниця між контрольною та ЕС групами $P = 0,001$, між контрольною групою та групою ЕС + SCH $P = 0,04$).

Модель СЕ індукована пілокарпіном у щурів характеризується підвищеною збудливістю (Rice et al., 1998). Поведінкові тести, які визначають функціональний стан тварин, використовують для встановлення токсичності речовин (Virginia C. Moser, 2011a). Завдяки своїй простоті та можливості швидко отримати результати, поведінкові тести на збудливість також використовуються в різних лабораторіях для фармакологічного дослідження та тестування антиепілептичних сполук, які впливають на різноманітні молекулярні шляхи під час латентного періоду після ініціації ЕС, індукованого як електричним, так і хімічним способом (Brandt et al., 2006; Huang et al., 2012; Rice et al., 1998).

3.1.2. Ефект блокування ПАР1 на рівень тривожності щурів, модифікований викликаним епілептичним статусом.

Тривалість місцезнаходження щура в різних ділянках лабіринту під час проведення тестів «відкрите поле» і «припіднятий хрестоподібний лабіринт» ми оцінювали у відсотках: як співвідношення часу, проведеного твариною у відповідній ділянці лабіринту до загальної тривалості експерименту.

«Відкрите поле» – класичний тест на визначення рівня тривожності, дослідницької поведінки та локомоторної активності щурів. Відносний час перебування щурів групи ЕС у внутрішніх квадратах лабіринту був тривалішим порівняно з іншими групами, але статистичний аналіз не виявив значущої різниці за даним показником між експериментальними групами, нами спостерігалася тенденція до збільшення часу, проведеного в центральній частині тесту у групи ЕС (різниця між групами ЕС та ЕС + SCH $P = 0,09$) (рис. 3.4). Для дослідження впливу ЕС і пригнічення функції ПАР1 на локомоторну активність піддослідних тварин оцінювали загальну пройдену відстань

під час виконання тесту. Статистично значущої різниці між групами по цьому показнику не виявлено (рис.3.5).

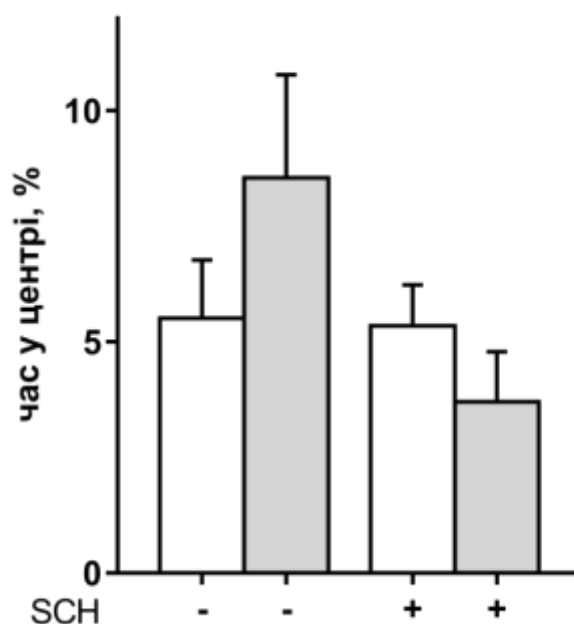


Рис. 3.4. Вплив пригнічення функції ПАР1 на показники часу, проведеного щурами групи ЕС і контрольними щурами у внутрішніх квадратах лабіринту «відкрите» поле». Дані представлені, як середнє $\pm$ ПС. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 13$, контроль + SCH $n = 12$, ЕС $n = 11$, ЕС + SCH $n = 15$

Отримані результати свідчать про недостовірне зменшення рівня тривожності щурів з історією ЕС, яким не вводили блокатор ПАР1. Показники загальної пройденої відстані впродовж тесту не відрізнялись між дослідними групами, що може свідчити про збереження загальної рухової активності під час латентної стадії формування епілепсії, яка є проявом дослідницької поведінки.

Отримані дані узгоджуються з низкою досліджень в яких використовували пілокарпінову і каїнатну моделі нападів. Як показали дослідження, епілептичний статус у щурів викликає зниження рівня тривожності (Epps et al., 2012; Inostroza et al., 2012; Marques-Carneiro et

al., 2014). Подібна анксиолітична поведінка також спостерігалась у щурів із вентральним ураженням гіпокампа. Ця зона особлива вразлива під час скроневої епілепсії ніж інші відділи лімбічної системи.

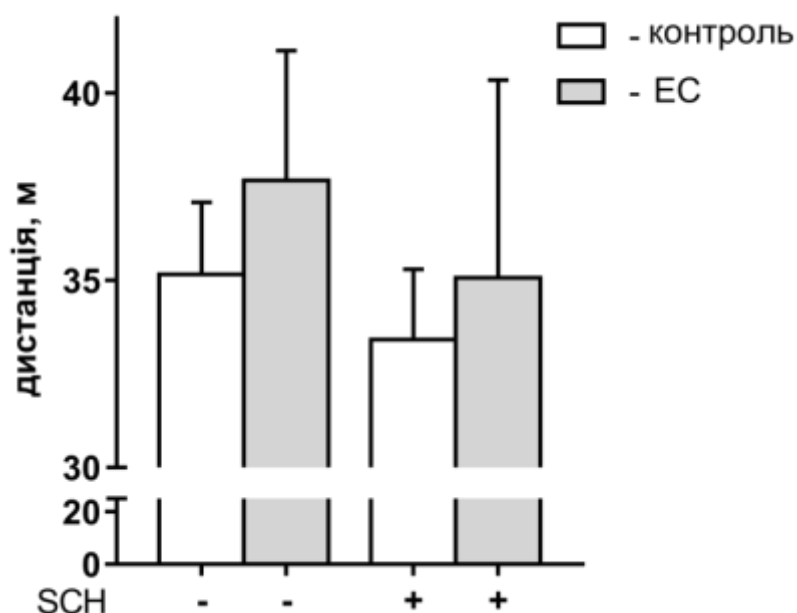


Рис. 3.5. Загальна дистанція, пройдена дослідними тваринами під час тесту «відкрите поле». Дані представлені, як середнє $\pm$ ПС. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 13$, контроль + SCH $n = 12$, EC $n = 11$, EC + SCH $n = 15$

У тесті «припіднятий хрестоподібний лабіринт» група щурів з ЕС без блокатора ПАР1 продемонструвала значне збільшення часу, проведеного у відкритих рукавах лабіринту порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3.7). В експерименті не було виявлено значущої зміни часу, проведеного у відкритих рукавах дослідною групою з SCH та контрольною групою, що свідчить про нормалізацію тривожної поведінки (рис. 3.7).

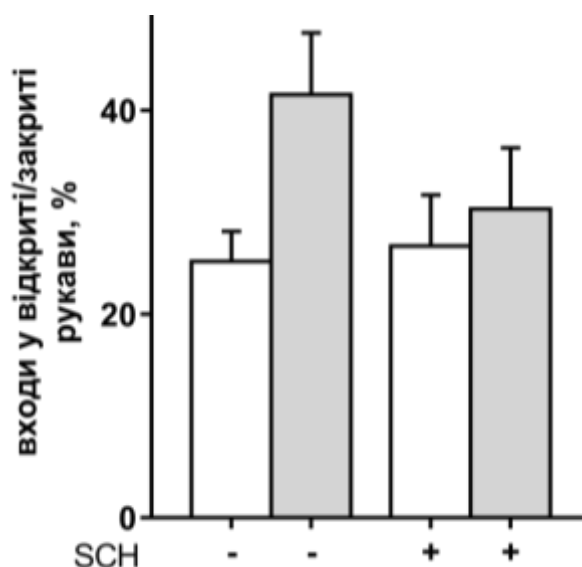


Рис. 3.6. Ефект індукції ЕС у молодому віці та блокування ПАР1 на відношення загальної кількості входів у відкриті та закриті рукави тесту припіднятий хрестоподібний лабіринт. Дані представлені, як середнє $\pm$ ПС, * $p < 0.05$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль з SCH $n = 14$, EC $n = 11$, SCH $n = 10$

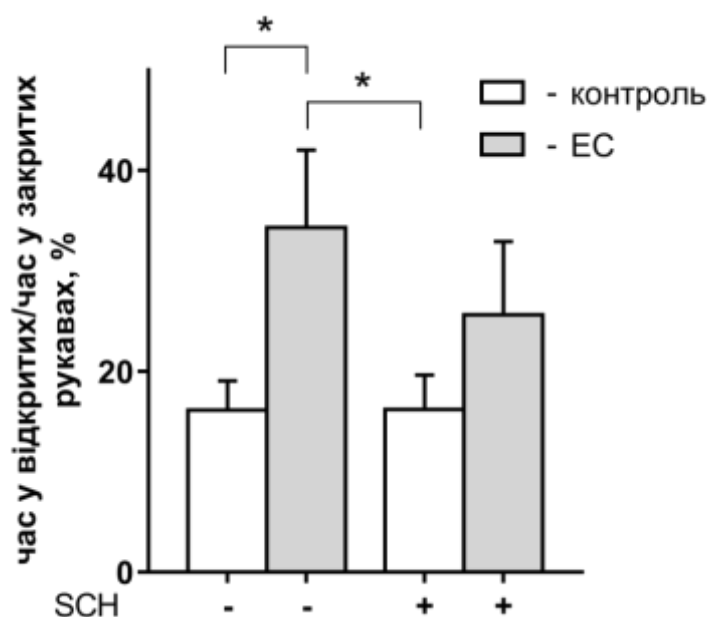


Рис. 3.7. Ефект індукції ЕС у молодому віці та блокування ПАР1 на час, проведений у закритих рукавах тесту припіднятий хрестоподібний лабіринт. Дані представлені, як середнє $\pm$ ПС, * $p < 0.05$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль з SCH $n = 14$, EC $n = 11$, SCH $n = 10$

Також в експерименті не було виявлено значущої зміни загальної кількості входів у відкриті рукави, проте спостерігалась тенденція до її збільшення для щурів з ЕС, порівняно з контрольною групою (рис. 3.6). Це може свідчити про збільшення рівня їх локомоторної активності та зменшення рівня тривожності. Для епілептичних щурів, які отримували блокатор, спостерігалась тенденція до нормалізації локомоторної активності порівняно з контрольною групою.

Ці дані співвідносяться з результатами тесту «відкрите поле» і демонструють, що фармакологічне пригнічення дії ПАР1 нормалізує показники поведінкових реакцій щурів після ЕС до рівня результатів контрольних тварин.

3.1.3. Вплив ЕС на здатність тварин до формування умовної реакції страху та ефект фармакологічної блокади ПАР1 на здатність до формування умовної реакції

Отримані дані вказують на статистично достовірну різницю у часі завмирання на третій день тестування (умовна реакція страху) у групах контроль та контроль + SCH ($P < 0.001$ для контрольної групи та $P < 0.05$ для групи контроль + SCH) (рис. 3.9).

Ми не спостерігали різниці у часі завмирання у груп ЕС та ЕС + SCH, що свідчить про відсутність формування умовної реакції страху у молодих тварин після ЕС. Дані узгоджуються з результатами тестів які проводилися для дорослих тварин після ЕС. Фармакологічне пригнічення ПАР1 не впливає на патогенез розладів емоційно-зумовленої пам'яті у щурів після ЕС. Хоча блокада експресії ПАР1 у тварин, нокаутних за геном, що кодує даний рецептор, провокувала зниження здатності тварин до формування умовного рефлексу у даному тесті, наші дослідження з фармакологічної блокади роботи ПАР1 продемонстрували відсутність ефект у контролі.

На другий день тестування, у який визначається реакція контекстуального страху не було виявлено достовірної різниці у часі завмирання для жодної групи (рис. 3.8).

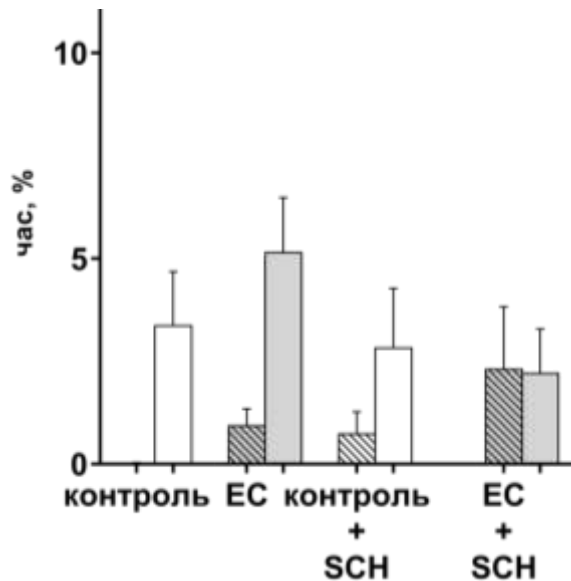


Рис. 3.8. Вплив блокатора ПАР1 на поведінку тварин під час тестів на пам'ять, обумовлену страхом. Кількість завмирань (%) у другий день тесту. Дані представлені, як середнє $\pm$ ПС. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 12$, контроль з SCH $n = 11$, EC $n = 17$, SCH $n = 12$

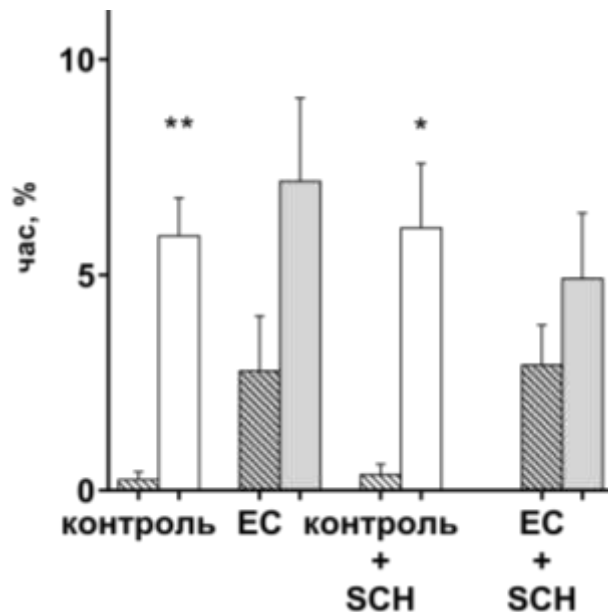


Рис. 3.9. Вплив блокатора ПАР1 на поведінку тварин під час тестів на пам'ять, обумовлену страхом.

Кількість завмирань (%) у третій тестовий день. Дані представлені, як середнє $\pm$ ПС, *,** $p < 0.05$, 0.001 . Кількість тварин у тесті: контроль $n = 12$, контроль з SCH $n = 11$, EC $n = 17$, SCH $n = 12$

3.1.4. Ефект блокування PAR1 на просторову пам'ять та формування орієнтувальної навички

Час, необхідний тварині для пошуку платформи зменшувався з однаковою швидкістю для усіх чотирьох дослідних груп. Але час, необхідний тваринам після ЕС, був значно більшим, аніж у обох групах контролю. Протягом тренувального дня тварини після ЕС також демонстрували меншу швидкість навчання, при цьому поведінка таких тварин у перший тестовий день демонструвала майже повну відсутність отриманої у тренувальний день навички на відміну від результатів, які демонстрували контрольні тварини.

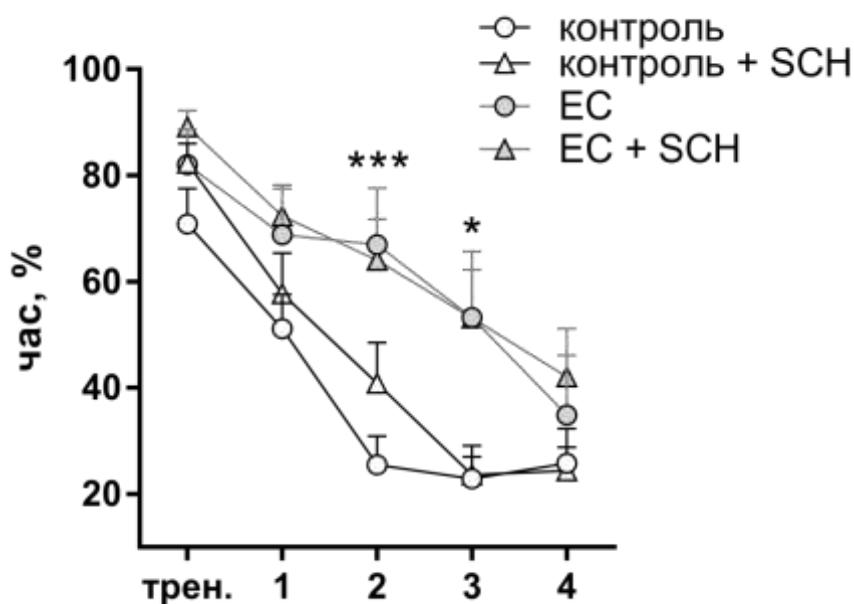


Рис. 3.10. Вплив блокатора PAR1 на поведінку тварин під час тесту на просторову пам'ять. *,***– $P < 0.05, 0.0001$ відносно контролю. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 11$, контроль з SCH $n = 10$, ЕС $n = 6$, SCH $n = 8$

Нами було показано, що у водному лабіринті Морріса обидві дослідні групи щурів з ЕС, які отримували і не отримували блокатор PAR1 досягають підводної платформи значно довше за контрольних тварин (рис.3.10). Таким чином фармакологічна блокада PAR1 не

впливає на патогенез розладів пам'яті у тварин після ЕС. Ми також не спостерігали різниці у часі, необхідному для досягання підводної платформи контрольним тваринам та контрольним тваринам, які отримували ін'єкції блокатора ПАР1.

3.1.5. Вплив ЕС та фармакологічної блокади ПАР1 на параметри соціальної поведінки щурів

Встановлено, що під час першої сесії щури групи ЕС проводили значно менше часу з «соціальним» подразником, ніж контрольна група ($P = 0,001$, рис. 3.11).

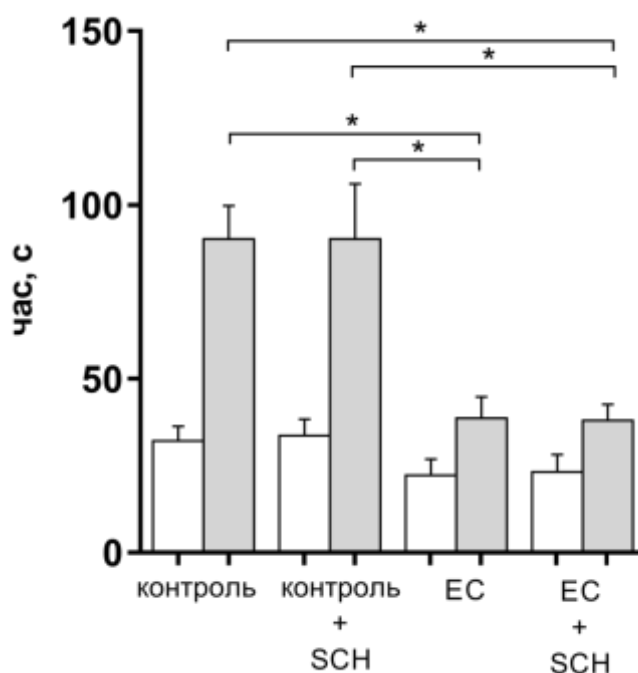


Рис. 3.11. Вплив блокування ПАР1 на рівень товариськості дослідних тварин, де білі стовпчики – час, проведений з об'єктом, сірі – час, проведений з суб'єктом. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль з SCH $n = 10$, ЕС $n = 11$, SCH $n = 13$

Тварини контрольної групи взаємодіяли з незнайомим щуром (незнайомець 1) $15,04 \pm 1,59$ % від загального часу та $5,35 \pm 0,70$ % часу

з об'єктом ($P = 0,0001$, тест Краскера-Уолліса з post-hoc аналізом за допомогою тесту Дана), а тварини групи ЕС, відповідно – $5,85 \pm 1,11$ % часу з незнайомим щуром та $3,39 \pm 0,78$ % часу з об'єктом ($P = 0,03$).

Зміни в часі разом із «соціальним» і «несоціальним» подразниками не залежали від загальної кількості перетинів центральної камери ($P = 0,34$, порівняно кількість перетинів центральної камери контрольною та ЕС групою), що свідчить про те, що тварини групи ЕС не просто частіше та активніше пересувалися з однієї бічної камери до іншої (проявляли гіперактивний поведінковий фенотип під час поведінкового тесту, який є характерною ознакою поведінки тварин, хворих на епілепсію, та після ЕС), а витрачали менше часу на соціальну взаємодію як таку.

Для дослідження впливу фармакологічної блокади ПАР1 на поведінку дослідних тварин під час першої сесії тесту ми здійснювали порівняльний аналіз часу, який тварини провели поряд з соціальним і несоціальним подразниками, а також відношення цих показників між групами ЕС та ЕС + SCH, та групами контроль та контроль + SCH. Ми не виявили статистично достовірних змін цих показників ($P > 0,05$ в усіх випадках). Варто відзначити, що загальна тенденція проводити більше часу з твариною, ніж з неживим об'єктом, зберігалася у тварин усіх чотирьох груп.

Під час другої сесії тесту, яка характеризує реакцію дослідної тварини на соціальну новизну, щури групи ЕС проводили менше часу з незнайомою твариною, порівняно з тваринами контрольної групи ($P < 0,005$, рис 3.12). В той же час, тварини контрольної групи віддавали перевагу спілкуванню із незнайомим щуром (незнайомиць 2) порівняно зі знайомим з попередньої сесії ($13,87 \pm 2,03$ % від загального часу поряд із незнайомою твариною порівняно до $8,17 \pm 1,22$ % часу зі знайомою), в той час як тварини групи ЕС не виділяли його за рівнем свого соціального інтересу від реакції на знайому тварину ($4,23 \pm 1,48$ % від

загального часу поряд із незнайомою твариною щодо $3,12 \pm 0,74$ % часу зі знайомою).

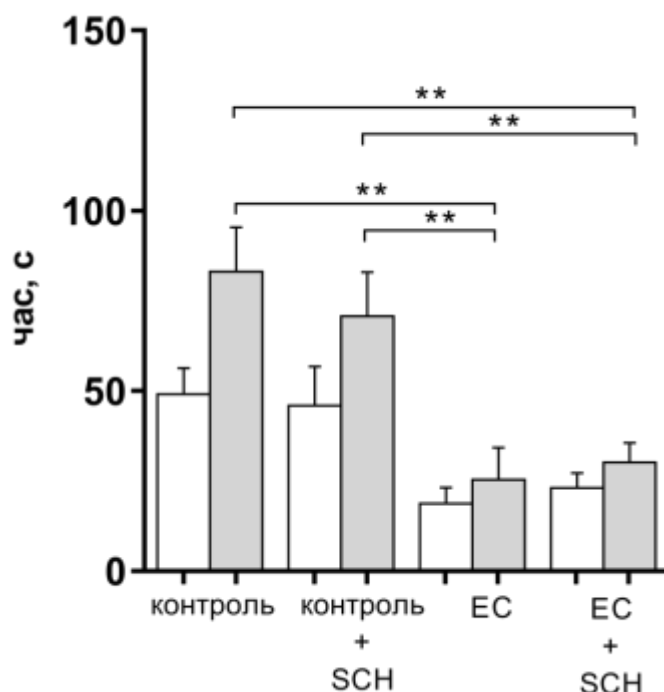


Рис. 3.12. Вплив блокування ПАР1 у дослідженні реакції дослідних тварин на соціальну новизну, де білі стовпчики – час проведений з знайомим суб'єктом, сірі – час проведений з незнайомим. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль з SCH $n = 10$, EC $n = 11$, SCH $n = 13$

Порівняно загальний час проведений дослідними тваринами поряд із соціальними подразниками (знайомий і незнайомий шур) впродовж першої та другої сесій (загальна соціальна взаємодія). (рис. 3.13) Встановлено зниження цього показника у тварин з EC порівняно з контрольними, що свідчить про зниження загального соціального інтересу тварин після EC. Ми не спостерігали різниці між рівнем інтересу до соціальної новизни між групами EC і EC + SCH ($P > 0,05$), контроль та контроль + SCH ($P > 0,05$). Ефекту блокування ПАР1 на

загальний час, проведений за соціальною взаємодією, також не виявлено ні в контролі, ні в групі тварин після ЕС.

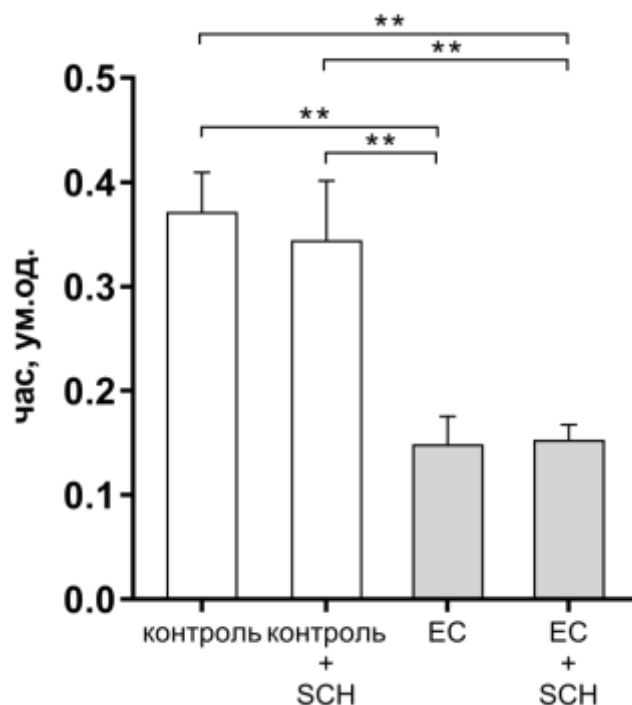


Рис. 3.13. Вплив блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу (ПАР1) на загальний час, проведений дослідними тваринами за соціальною взаємодією у двох серіях тесту. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$. Кількість тварин у тесті: контроль $n = 14$, контроль з SCH $n = 10$, EC $n = 11$, SCH $n = 13$

Результати підрозділу 3.1 опубліковані у роботах (Semenikhina et al., 2019; Семеніхіна et al., 2018, 2019).

3.2. Ефект блокування PAR1 на процеси синаптичної пластичності гіпокампа

В наступній серії експериментів ми досліджували вплив інгібування PAR1 на процеси синаптичної пластичності. Пластичність нейронних зв'язків є невід'ємною рисою нервової системи. Завдяки пластичності може змінюватись структура та активність нейронних мереж у відповідь на дію численних факторів зовнішнього та внутрішнього середовища. Механізми синаптичної пластичності, тобто здатність нейронів до змін функції внаслідок адаптації, є одним з актуальних питань сучасної нейрофізіології. В основі явища пластичності нервової системи лежать процеси модуляції передачі сигналів через синапси.

Із використанням електрофізіологічних методів відведення польових позаклітинних потенціалів, ми досліджували вплив пригнічення активності протеазаактивованих рецепторів 1 на викликані польові постсинаптичні потенціали (ВПСП) у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа. Для експерименту використовували зрізи із чітким гіпокампом і переносили їх до реєструвальної камери. Зрізи закріплювали срібною підковкою із капроновими нитками так, щоб зони відведення та стимуляції залишались інтактними.

3.2.1. Ефект блокування PAR1 на показники синаптичної ефективності

Для оцінки синаптичної ефективності радіального шару гіпокампа, ми здійснювали відведення ВПСП у зоні CA1 при стимуляції колатералей Шафера на рівні зони CA3. Синаптичну ефективність визначали із урахуванням пікових значень амплітуди польових постсинаптичних потенціалів. Викликані польові потенціали зазвичай складаються із двох компонентів: раннього компоненту, який часто

перекривається стимуляційним артефактом, та слідуючим за ним, більш тривалим компонентом (Hempel et al., 2000) (рис. 3.14).

Фармакологічні проби (Varela et al., 1997) визначили ранній компонент, як пресинаптичний польовий потенціал дії, який з'являється в результаті синхронно-виникаючих потенціалів дії активованих нейронів, які безпосередньо отримували стимуляцію, та другий компонент – як польовий постсинаптичний потенціал.

Для аналізу базових та пікових значень амплітуд ВПСП були проведені відведення від 17 зрізів контрольної групи, 22 зрізів групи контроль + SCH, 19 зрізів ЕС групи та 22 зрізів групи ЕС + SCH. Піковими вважались значення, при яких збільшення інтенсивності стимуляції не призводило до подальшого зростання амплітуди ВПСП.

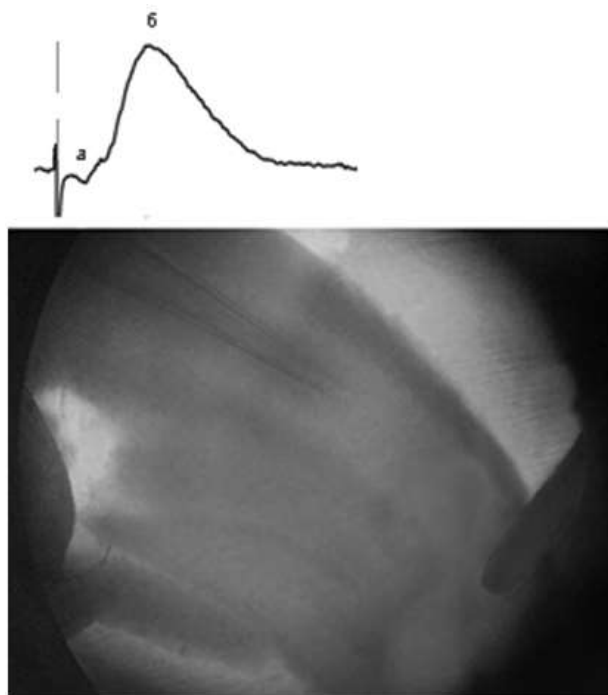


Рис. 3.14. Визначення амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів радіального шару зони CA1 гіпокампа: а – волоконний потенціал; б – амплітуда ВПСП

Базова лінія вимірювалась на такому рівні стимуляції, при якому амплітуда ВПСП дорівнювала 30-40% максимальної амплітуди.

Інтенсивність стимуляції за цих умов була практично однорідною для усіх чотирьох груп, та коливалась в межах 200-400 мкА. Мінімальна стимуляція, при якій виникала відповідь на подразнення, складала приблизно 50-100 мкА. Максимальні значення стимуляції, по досягненню яких фіксувались пікові значення постсинаптичних потенціалів, дорівнювали 1000-1200 мкА.

Аналіз отриманих даних свідчить про відсутність змін у синаптичній ефективності у групах після ЕС порівняно з контролем (рис. 3.15).

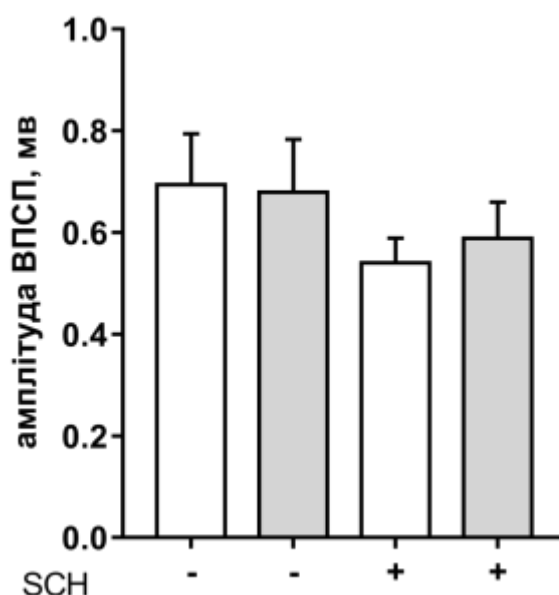


Рис. 3.15. Зміни амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів у радіальному шарі CA1-зони гіпокампа щурів.

Діаграма зображує амплітуди ВПСП в контролі (білі стовпчики) та після епілептичного статусу (сірі стовпчики). Дані представлені як середнє $\pm$ ПС. Кількість зрізів: контроль $n = 17$, контроль + SCH

$n = 22$, ЕС $n = 19$, ЕС + SCH $n = 22$

Варто відмітити, що дослідження з використанням пост-статусних моделей на дорослих тваринах та у випадку хронічної епілепсії демонструють суттєве зниження показників синаптичної ефективності,

що може бути пов'язано як з морфологічними змінами (у випадку хронічної епілепсії), так і з функціональними. Молоді тварини демонструють більшу стійкість до розвитку патологічних проявів захворювання для даного показника.

3.2.2. Зміни короткотривалої пластичності зони СА1 гіпокампа щурів внаслідок ЕС та блокування PAR1

Ми досліджували короткотривалу синаптичну пластичність, викликану парною стимуляцією із інтервалом між стимулами в 50 мс. Для розрахунку значення співвідношення амплітуди другого ВПСП до амплітуди першого ВПСП ($A2/A1$) ми визначали середнє 3 таких значень для кожного зріза. При дослідженні пластичності в умовах парної стимуляції, інтенсивність стимуляції встановлювали на рівні 30% для уникнення появи популяційного спайку. Перед реєстрацією парних відповідей ВПСП, ми записували базову активність протягом 10-15 хв для отримання стабільних значень постсинаптичних потенціалів.

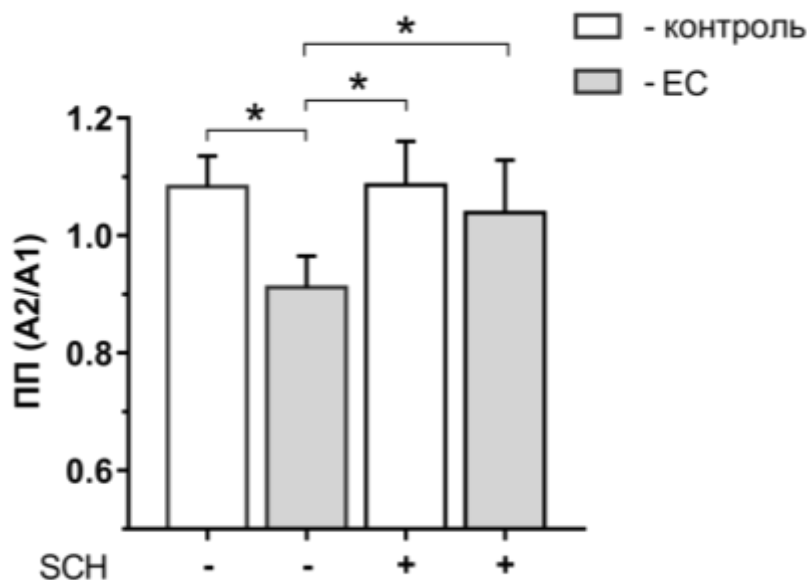


Рис. 3.16. Порівняльна характеристика короткотривалої пластичності, викликаній парною стимуляцією. Фармакологічна блокада PAR1 в період епілептогенезу відновлює зпровоковане ЕС

зниження пластичності. Кількість зрізів: контроль n = 19, контроль з SCH n= 24, ЕС n = 23, SCH n = 24. * P < 0,05

Під час парної стимуляції в усіх експериментальних групах окрім групи ЕС спостерігалась фасилітація другої відповіді в більшості випадків ($P = 0,019$ для груп контроль та ЕС). Ми не виявили впливу фармакологічної блокади ПАР1 у контролі, водночас введення селективного блокатора ПАР1 нормалізувало показники групи ЕС + SCH. (рис. 3.16) Ми не виявили статистично значущої різниці між групами контроль, контроль + SCH та ЕС + SCH. Для порівняння впливу блокування ПАР1 на короткотривалу пластичність, викликану парною стимуляцією, кожна вибірка підлягала перевірці на нормальність розподілу із використанням критерію симетричності та ексцесу (дані не показані). Аналіз проводився за допомогою тесту Краскера-Уолліса з подальшим post-hoc-аналізом за допомогою тесту Дана.

3.2.3. Вплив ЕС та блокування ПАР1 на посттетанічну потенціацію у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа

Нами було досліджено значення ПТП радіального шару зони CA1 гіпокампа. Даний показник характеризує короткотривале збільшення викиду нейромедіатора у синаптичну щілину, яке найпростіше можна спровокувати за допомогою височастотної стимуляції.

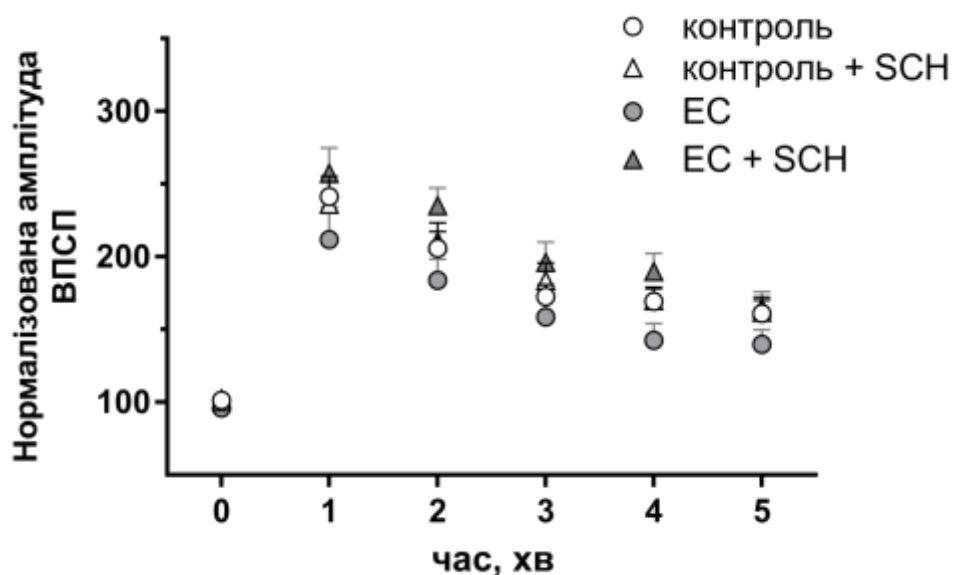


Рис. 3.17. Зміни амплітуди ВПСР у відповідь на короткотривалу тетанічну стимуляцію. Кількість зрізів: контроль n = 17, контроль з SCH n= 23, EC n = 21, EC + SCH n = 20

Короткотривала високочастотна стимуляція викликала ПТП у 100% випадків в усіх чотирьох групах. Зрізи групи EC у більшості випадків демонстрували зниження рівню ПТП, хоча нами не було виявлено статистично значущої різниці для даного показника ($P = 0,055$ для груп контроль та EC). Зрізи групи EC + SCH також демонстрували схожу динаміку, але рівень ПТП, яка все ж викликала, був вищим (рис. 3.17-3.18).

Також варто відмітити, що стабілізація відповіді при записі базової лінії була швидшою у зрізах обох контрольних груп та зрізах групи EC + SCH, в той час як для зрізів групи EC досягти стабілізації базової відповіді було значно складніше, та такий процес займав більшу кількість часу.

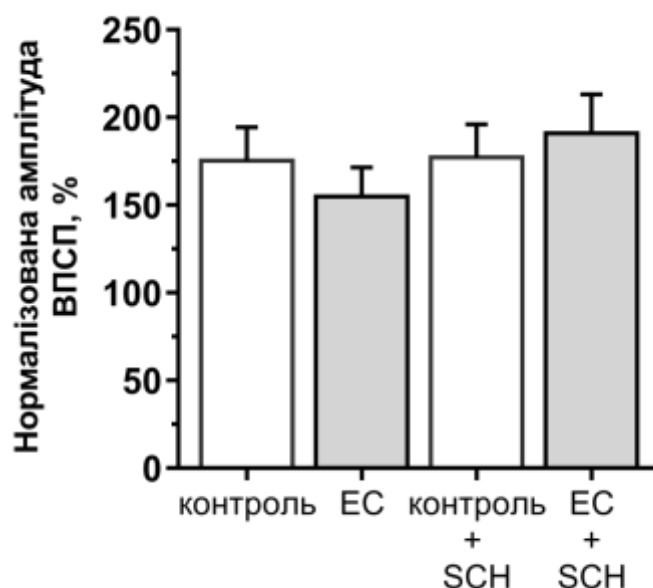


Рис. 3.18. Рівень інтенсивності посттетанічної потенціації радіального шару поля CA1 гіпокампа. Кількість зрізів: контроль n = 19, контроль з SCH n = 24, EC n = 23, EC + SCH n = 24

3.2.4. Роль EC та фармакологічної блокади PAR1 у модуляції параметрів довготривалої пластичності у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа

В наступній серії дослідів ми вивчали зміни довготривалої потенціації у контрольних та епілептичних тварин у відповідь на блокування PAR1. Довготривала потенціація представляє собою довгострокове підвищення ефективності синаптичної передачі нейронів, що є результатом їхньої синхронної стимуляції. Припускається, що підвищення ефективності зв'язку здійснюється за рахунок зростання чутливості постсинаптичної клітини на сигнали, отримані від пресинаптичної. Порівняно із короткотривалою пластичністю, довготривала потенціація опосередковується не лише пресинаптичними механізмами, але й постсинаптичними.

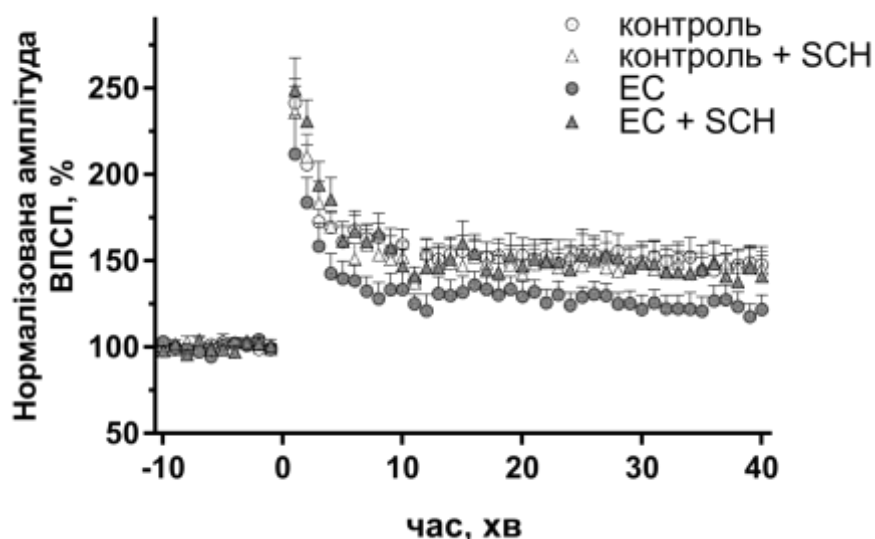


Рис. 3.19. Зміни у процесах довготривалої пластичності у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа контрольних та епілептичних щурів внаслідок блокування PAR1.

На графіку представлені нормалізовані за середнім значенням базової активності амплітуди ВПСР до і після тетанічної стимуляції.

Кількість зрізів: контроль $n = 19$, контроль з SCH $n = 24$, EC $n = 23$, EC + SCH $n = 24$

В даному експерименті ми використовували зрізи з центральної частини гіпокампа. В попередніх дослідженнях була показана функціональна різниця між вентральним та дорзальним гіпокампом. Було продемонстровано, що дорзальний гіпокамп є більш задіяним, порівняно із темпоральним, у процесах просторової пам'яті; у той час, як вентральний задіюється для модуляції емоційних реакцій. Поясненням цієї різниці можуть бути різні зовнішні анатомічні зв'язки двох частин гіпокампа.

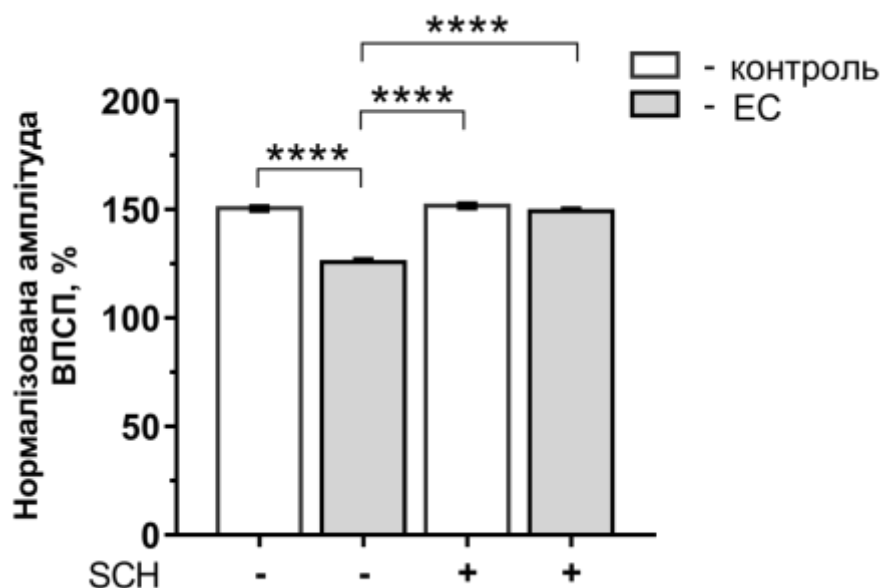


Рис. 3.20. Рівень довготривалої пластичності у радіальному шарі зони CA1 гіпокампа контрольних та епілептичних щурів внаслідок блокування PAR1. На графіку представлені нормалізовані за середнім значенням базової активності амплітуди ВПСП. Кількість зрізів: контроль $n = 19$, контроль з SCH $n = 24$, EC $n = 23$, EC + SCH $n = 24$. ** $P < 0,0001$**

Метою даної частини нашого дослідження було визначити вплив ЕС на показники довготривалої синаптичної потенціації та вплив фармакологічної блокади PAR1 на цей процес. (рис. 3.19-3.20). Також ми визначали ймовірність виникнення довготривалої потенціації внаслідок впливу ЕС та фармакологічної блокади PAR1. (рис. 3.21).

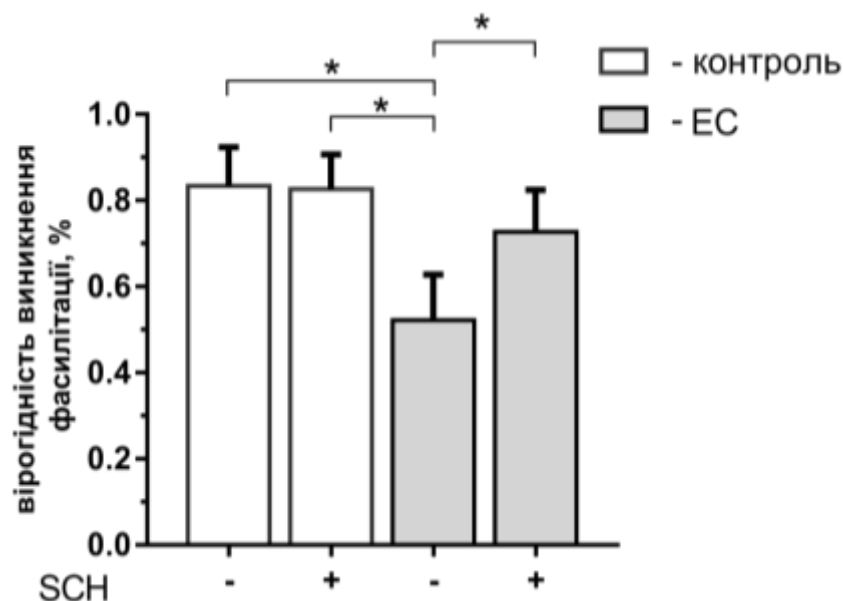


Рис. 3.21. Вірогідність виникнення довготривалої потенціації у радіальному шарі поля CA1 у зрізах гіпокампа чотирьох піддослідних груп тварин. Дані представлені як середнє± ПС, * $p < 0,0001$. Кількість зрізів: контроль $n = 19$, контроль з SCH $n = 24$, EC $n = 23$, SCH $n = 24$. * $P < 0,05$

Отримані дані свідчать про зниження рівню довготривалої потенціації у щурів групи EC, що узгоджується з літературними даними стосовно досліджень проведених на дорослих тваринах та у випадку хронічної епілепсії в пост-статусних моделях даного захворювання. В той же час фармакологічна блокада PAR1 не впливала на контрольних тварин, але статистично достовірно відновлювала рівень довготривалої потенціації у щурів групи EC + SCH. Не можна з впевненістю сказати, за рахунок яких механізмів фармакологічна блокада PAR1 чинить такий ефект, але він може бути пов'язаний як з нейропротекторною дією, так і впливом на роботу рецепторів, задіяних у модуляції довготривалої потенціації.

Також нами було продемонстровано статистично достовірне підвищення ймовірності виникнення довготривалої потенціації у щурів групи EC + SCH.

Результати підрозділу 3.2 опубліковані у роботах (Semenikhina et al., 2019; Семеніхіна et al., 2018, 2019).

РОЗДІЛ 4.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За результатами попередніх даних відомо, що під час ЕС спостерігається значне підвищення у концентрації тромбіну та зниження імунореактивності ПАР1 у зоні гіпокампа СА1. Було показано, що введення селективного блокатора ПАР1 SCH79797 після закінчення ЕС знижує смертність тварин внаслідок ЕС, втрату клітин, спричинену епілептичним нападом, а також знижує епілептиформу активність і поведінкові розлади, що пов'язані з ЕС (D. Isaev et al., 2015).

Спираючись на ці дані, можна спекулювати на тему використання блокади ПАР1 у якості мішені для створення лікувальних засобів при епілептичних станах чи станах, що супроводжуються порушення ГЕБ, при якому вивільнення тромбіну у ліквор може бути причиною запальних процесів у мозку. Тому блокування рецептору ПАР1 може виступати у якості механізму захисту клітин мозку від ураження, загибелі та запалення.

Тромбінові рецептори експресуються нейронами і гліальними клітинами у багатьох відділах ЦНС. Тромбін залучений у регуляції таких процесів як проліферація глії, ріст і розгалуження аксонів, а також, приймає участь у підтримці життєздатності центральних та периферійних нейронів, що було продемонстровано *in vivo* та *in vitro* (Donovan et al., 1997). Фізіологічний ефект тромбіну варіює залежно від його концентрації. Припускають, що при низьких концентраціях він здатен проявляти нейропротекторну дію, але великі дози тромбіну призводили до розвитку запальних процесів, апоптозу і підвищення збудливості нейронів через активацію ПАР (Gieseler et al., 2013). В той же час низка досліджень показала, що в умовах стресу тромбін призводить до загибелі клітин навіть за низьких концентрацій (Mbebi et al., 2001).

Нещодавні дослідження продемонстрували значне збільшення рівня тромбіну в зоні CA1 гіпокампа після ЕС, індукованого пілокарпіном. Однак, навіть незначного збільшення концентрації тромбіну може бути достатньо для потенціації НМДА-рецепторів, яка, в свою чергу, може посилити опосередковану глутаматом ексайтотоксичність і нейродегенерацію (Nicoll & Malenka, 1999). Ефект пригнічення PAR1 на синаптичну пластичність гіпокампа може бути пов'язаний із послабленням впливу підвищеної концентрації тромбіну, викликаного епістатусом, на функцію НМДА-рецепторів, оскільки довготривала потенціація синапсів колатералей Шафера є НМДА-залежним процесом. Інший можливий механізм пов'язаний із пригніченням ЕС-індукованих прозапальних шляхів, які здатні значно погіршувати синаптичну пластичність гіпокампа (Virginia C. Moser, 2011a).

4.1. Вплив епілептичного статусу, індукованого у молодому віці, на афективну поведінку щурів

Наразі зростає кількість літератури, що вказує на значний вплив маніфестуючої у молодому віці епілепсії на поведінкові та емоційні розлади, що розвиваються у подальшому житті. Показано, двосторонній зв'язок між розвитком епілепсії та розвитком депресії, тобто у осіб, що мають епілепсію, або навіть поодинокі випадки судом, в анамнезі, зростає ймовірність розвитку депресії і навпаки. У пацієнтів з епілепсією часто спостерігаються тривожнісні розлади: причому лікарі спостерігають як тривожність, пов'язану з безпосередньо очікуванням нападу, так і загальну тривожність або, наприклад, соціальну тривожність.

У даній роботі ми демонструємо, що ЕС, індукований у молодому віці, провокує розлади емоційної та соціальної поведінки навіть на ранніх стадіях розвитку захворювання. Літературні дані, що стосуються

впливу епілептичних нападів на рівень тривожності є неоднозначними та варіюють від збільшення до зниження рівню тривожності в залежності від обраної експериментальної моделі та віку.(Bokoch et al., 2010; Glien et al., 2001; Helmstaedter et al., 2003; Luo et al., 2007a; Mula & Monaco, 2009; Traynelis & Trejo, 2007) В той же час літературні огляди, що стосуються пацієнтів, хворих на епілепсію, також вказують на неоднозначний вплив цього захворювання на тривожність, але напевне ясно, що епілепсія певним чином впливає на роботу структур мозку, що відповідають за обробку таких емоційних реакцій.

В нашій роботі ми показали, що ЕС, індукований у молодому віці, провокує зниження рівню тривожності тварин у тестах «відкрите поле» та припіднятий хрестоподібний лабіринт. Ці дані співвідносяться з результатами досліджень, що були проведені на дорослих тваринах з використанням літій-пілокарпінової моделі ЕС та канатної моделі ЕС, де також було показано зниження рівню тривожності експериментальних щурів.(Denenberg, 1969; Pellow et al., 1985b) Зниження рівню тривожності також спостерігалось у тварин, для яких було змодельовано ураження вентральної частини гіпокампа, тобто зони, яка за останніми літературними даними є відповідальною за модуляцію емоційних реакцій та соціальної поведінки.(Hånell & Marklund, 2014) Вентральний гіпокамп, мигдалеподібний комплекс та скронева частка кори головного мозку відповідають за обробку, аналіз та модуляцію відповіді на емоційні та соціальні подразники. З використанням магнітно-резонансної томографії для тварин було проведено дослідження на мишах, яке вказує на превалюючу активність мигдалеподібного комплексу, вентрального гіпокампа та скроневих часток кори під час соціальної взаємодії та соціальних ігор у молодих тварин.(Kim et al., 2015) В той же час саме ці структури мозку є найбільш вразливими для епілепсії. З огляду на те, що епілепсія є мережевим явищем, першими вона вражає ті ділянки, що мають найбільшу кількість внутрішніх

шляхів передачі сигналу та найбільшу кількість зв'язків з оточуючими структурами мозку. Таким чином саме лімбічна система, тобто сукупність структур мозку, яка модулює сприйняття, аналіз та відповідь на різноманітні емоційні чинники та є ключовою у роботі когнітивних функцій та пам'яті, у тому числі – емоційно-зумовленої пам'яті, стає найбільш вразливою для епілепсії.

Епілептичний стан супроводжується як порушеннями в збуджуючій системі мозку, так і порушеннями нейронного гальмування. В літературі припускається, що порушення у гальмівній системі внаслідок, наприклад, травми головного мозку суттєво впливає на емоційну поведінку, в тому числі і під час епілепсії.

Зниження соціальної активності, причому як соціальної активності загалом, так і зниження інтересу до соціальної новизни, продемонстроване в наших експериментах тваринами під час першої та другої сесій у тесті «перегородка», співвідноситься з даними, отриманими для дорослих тварин, та є критичними для молодого віку, коли відповідь на соціальні стимули є вирішальною для формування соціальних навичок у цілому.

Клінічні та фундаментальні дослідження вказують на те, що епілептичні напади можуть обумовлювати зниження емоційно-зумовленого навчання та пам'яті (Detour et al., 2005). Отримані в нашій роботі результати узгоджуються із цими дослідженнями, про що свідчить істотне погіршення пам'яті, обумовленої страхом, у щурів із ЕС. Реакція молодих тварин після ЕС у тесті водний лабіринт Моріса демонструє зниження когнітивних здібностей. Молоді тварини після ЕС більш повільно виконували завдання та демонстрували зниження швидкості навчання та запам'ятовування. Згідно з теорією когнітивних карт, дослідження нового оточення з часом допомагає тварині побудувати пізнавальну карту цього середовища в гіпокампі, і коли ця карта встановлена, час на виконання завдання зменшується (Dudchenko

& Wood, 2015; Muller et al., 1996). Таким чином, епілептичний статус, пережитий у молодому віці, знижує здатність тварини до створення таких когнітивних карт.

Гіпокамп – структура, що окрім консолідації пам'яті виконує провідну роль у процесі орієнтування як у тварин, так і у людини (наприклад, дослідження з використанням магнітно-резонансної томографії показало, що люди, які постійно за професією стикаються з питанням орієнтації у просторі та запам'ятовуванням маршрутів, мають більш розвинутий гіпокамп) однією з перших страждає при епілепсії, а шкода, завдана гіпокампу у молодому віці може більш суттєво вплинути на ЦНС, яка ще розвивається.

Підсумовуючи, проведені нами тести після ЕС, індукованого у молодому віці, демонструють, що молоді тварини стають менш тривожними, більш збудливими та агресивними, у таких тварин зменшується здатність до формування орієнтувальної навички та формування емоційної пам'яті. Отримані дані зпіввідносяться з низкою досліджень, проведених на дорослих тваринах, але мають важливе значення для аналізу впливу епілептичного статусу на пластичну у молодому віці ЦНС.

4.2. Патологічні зміни синаптичної пластичності гіпокампа, що розвиваються внаслідок епілептичного статусу у молодому віці

ЕС, пережитий у молодому віці може супроводжуватися не лише ймовірністю розвитку епілепсії як такої, але й провокувати різноманітні порушення у ЦНС на фоні її триваючого розвитку. У роботі показано негативний вплив ЕС на поведінку, але важливим є й дослідження процесів, що таку поведінку опосередковують. У нашій роботі ми зосередилися на дослідженні синаптичної пластичності гіпокампа, як структури, що, по-перше, є однією з найбільш залучених у патогенезі епілепсії, а по-друге, як структури, що є відповідальною за велику

кількість поведінкових та когнітивних реакцій. Хворі на епілепсію часто страждають від неврологічних розладів, які опосередковуються роботою гіпокампа. Труднощі із запам'ятовуванням та інші когнітивні порушення є частими супутніми розладами скроневої епілепсії (Inostroza et al., 2011). Сучасні електрофізіологічні дослідження надають все більше доказів, що епілептичні напади істотно змінюють властивості коротко- та довготривалої синаптичної пластичності гіпокампа та кори головного мозку. Також відомо, що розвиток епілепсії провокує структурні зміни у субодиничному складі рецепторів, робота яких опосередковує процеси синаптичної пластичності (Т. У. Postnikova et al., 2017). В неонатальний період субодиниці НМДА-рецепторів співвідносяться як $NR2B > NR2A$, тоді як у дорослому віці це співвідношення має вигляд $NR2A > NR2B$, при цьому для дорослого гіпокампа значно легше викликати довготривалу потенціацію, аніж у неонатальний період. Базуючись на таких дослідженнях субодиничного складу НМДА-рецепторів було зроблено висновок, що за НМДА-залежну довготривалу потенціацію в більшій мірі відповідає активація саме $NR2A$ субодиниць. В той же час при епілепсії субодиничний склад НМДА рецепторів змінюється у зворотній бік, тобто має вигляд $NR2B > NR2A$. Дослідження з використанням літій-пілокарпінової моделі ЕС та канатної моделі продемонстрували значне зниження показників довготривалої потенціації в CA1 зоні гіпокампа дорослих експериментальних щурів, що може бути пов'язано зі зміною субодиничного складу НМДА рецепторів. Також було продемонстровано, що селективне блокування $NR2B$ -субодиниці НМДА-рецептора при цьому сприяло збереженню довготривалої потенціації на контрольному рівні. Таким чином, по-перше, було зроблено висновок щодо впливу епілептичних нападів та епілептогенезу (навіть дослідження синаптичної пластичності в 24-годинний період після індукції ЕС демонстрували такі ж результати) на структурну композицію НМДА-рецептора, а, по-друге, було висловлено

припущення щодо того, що саме цей ефект опосередковує зниження рівня довготривалої потенціації при епілепсії. (Tatyana Y Postnikova, 2019). У нашій роботі продемонстровано значне зниження рівня довготривалої потенціації та ймовірності виникнення цього явища у молодих щурів після ЕС, що співвідноситься з попередніми даними, отриманими для дорослих тварин з використанням пост-статусних моделей епілепсії.

Довготривала синаптична пластичність в першу чергу опосередковується пост-синаптичними механізмами, в той же час ми хотіли оцінити не лише постсинаптичні процеси, але й пре-синаптичні. Для останнього використовують дослідження короткотривалої синаптичної пластичності. Такі як ПТП та короткотривала потенціація (або депресія) в умовах парної стимуляції.

Явище короткотривалої синаптичної пластичності в умовах парної стимуляції описується співвідношенням першої та другої відповіді на парну стимуляцію та розглядається як коефіцієнт пресинаптичної ефективності. (Markram & Tsodyks, 1996) Зрізи мозку молодих щурів після ЕС демонстрували зниження рівня відповіді на другий стимул у більшості випадків. Дослідження явища короткотривалої депресії в умовах парної стимуляції продемонстрували, що в нормі такий процес може використовуватися для фільтрування та регулювання фасилітації, таким чином готуючи синаптичну систему до несподіваних змін. (Abbott & Regehr, 2004) При цьому на відміну від короткотривалої потенціації, короткотривала депресія задіює не лише пресинаптичні, але і постсинаптичні механізми. Із пресинаптичного боку, механізми, відповідальні за депресію, включають виснаження пулу нейромедіаторів та інактивацію сайтів викиду; та гальмування або інактивацію кальцієвих каналів (Abbott & Regehr, 2004; Fioravante & Regehr, 2011; Zucker, 1989; Zucker & Regehr, 2002).

Короткотривала депресія є взаємозалежною з короткотривалою потенціацією, завдяки задіянню спільних компонентів, таких як, наприклад, іонний рівень пресинаптичного кальцію, завдяки чому регулюється поповнення пулу везикул та регулюється ймовірність виділення нейромедіатора. (Савотченко, 2012)

В той же час короткотривала депресія опосередковується такими постсинаптичними механізмами, як десенситизація рецепторів та їх насичення. За умов короткотривалої депресії відбувається швидке насичення синаптичної ефективності у відповідь на стимуляцію, що певним чином контролює динамічний діапазон синаптичного фільтру та забезпечує швидке насичення відповіді. Порушення у механізмах, що опосередковують короткочасну депресію та потенціацію супроводжують хронічну епілепсію та хворобу Паркінсона. (Doherty & Dingledine, 2001; Galarraga et al., 2007)

4.3. Ефект блокування PAR1 на емоційно-зумовлену поведінку після епілептичного статусу

Літературні джерела вказують на залученість PAR1 у процеси модуляції поведінкових реакцій. Було продемонстровано, що у мишей з нокаутом гену, що кодує експресію PAR1 спостерігається достовірне зниження обумовленої страхом пам'яті та зниження здатності до формування контекстуальної реакції страху. (Dos Santos et al., 2005) На мишах нокаутних по PAR1 було продемонстровано зміни в рівні тривожності у тестах «відкрите поле» та припіднітий хрестоподібний лабіринт та тесті на реакцію пасивного уникання. Вважається, що дані реакції опосередковуються роботою гіпокампа та мигдалеподібного комплексу, в той же час дослідження демонструють залученість PAR1 у роботу цих структур. Так, нокаут PAR1 знижує рівень довготривалої потенціації гіпокампа, а активація PAR1 в залежності від емоційного

стану тварини може діяти на нервову активність базальної мигдалини шляхом зсуву її G-білок зв'язаного профілю (Hernan et al., 2014).

Позитивний ефект блокування ПАР1 на рівень тривожності щурів після ЕС може бути пов'язаний як з нейропротекторною дією блокади ПАР1 в гіпокампі, так і певним чином впливати на патологічні процеси в період епілептогенезу. За допомогою фармакологічних та генетичних методів було встановлено, що тривожнісні розлади часто пов'язані зі змінами в роботі та структурному складі НМДА-рецепторів. Отриманий нами ефект потребує подальшого дослідження, але можливо активація ПАР1 у складі їх сигнального каскаду чинить певний вплив на регуляцію емоційно-зумовленої поведінки.

ЕС також характеризується підвищеною збудливістю тварин, нами було показано зниження рівня емоційної збудливості внаслідок фармакологічного блокування ПАР1 у щурів після ЕС. В той же час, з використанням такої ж моделі ЕС, було показано, що блокада ПАР1 не впливає на рівень збудливості дорослих щурів у хронічній стадії епілепсії, таким чином, ймовірно блокада ПАР1 має часозалежний ефект на дану поведінкову характеристику. (Lunko et al., 2018) Це може бути пов'язано як з подальшим розвитком захворювання до хронічної стадії, так і з більшою пластичністю компенсаторних механізмів мозку молодих тварин.

Блокування роботи ПАР1 не вплинуло на здатність щурів до формування навички просторового орієнтування у водному лабіринті, ці дані узгоджуються з ідеєю участі ПАР1 у сигнальному каскаді НМДА-рецепторів. Було показано, що НМДА рецептори гранулярних клітин зубчастої звивини і нейронів зони СА1, ймовірно, не відіграють ключову роль у процесах формування та зберігання просторової пам'яті, залежної від гіпокампа. (Bannerman et al., 2012) У даному експерименті видалення NR2A-субодиниці НМДА-рецепторів призвело до зниження довготривалої потенціації гіпокампа та істотно знизило здатність тварин

до формування просторової пам'яті. В той же час видалення N1-субодиниці НМДА-рецепторів з гранулярних клітин зубчастої звивини і дорзальних пірамідних клітин зони СА1 гіпокампа не вплинуло на рівень довготривалої потенціації та результати тесту ВЛМ.

4.4. Вплив блокування PAR1 в період епілептогенезу на зміни синаптичної пластичності гіпокампа внаслідок епілептичного статусу

Тромбінові рецептори експресуються нейронами і гліальними клітинами у багатьох відділах ЦНС. Тромбін залучений у регуляції таких процесів як проліферація глії, ріст і розгалуження аксонів, а також, приймає участь у підтримці життєздатності центральних та периферійних нейронів, що було продемонстровано *in vivo* та *in vitro*. (Dopovan et al., 1997) Фізіологічний ефект тромбіну варіює залежно від його концентрації. Було продемонстровано, що низькі концентрації тромбіну у ЦНС мають нейропротекторний ефект, але в той же час підвищення концентрації призводило до апоптозу та мало прозапальний ефект. (Gieseler et al., 2013) З іншого боку, з використанням культури нервової тканини людини було показано, що в умовах стресу навіть низька концентрація тромбіну провокує патологічні процеси. (Weinstein et al., 2002)

Показано значне підвищення рівня тромбіну в зоні СА1 гіпокампа після ЕС, індукованого холіноміметиком пілокарпіном. В той же час, навіть незначного збільшення концентрації тромбіну може бути достатньо для потенціації НМДА-рецепторів, яка, в свою чергу, може посилити опосередковану глутаматом ексайтотоксичність і нейродегенерацію. (Nicoll & Malenka, 1999) В нашій роботі продемонстровано достовірне відновлення рівня довготривалої та короткотривалої потенціації гіпокампа у щурів після ЕС внаслідок блокування PAR1. Такий ефект пригнічення PAR1 на синаптичну

пластичність гіпокампа може бути пов'язаний із послабленням впливу підвищеної концентрації тромбіну, викликаного епістатусом, на функцію НМДА-рецепторів, оскільки довготривала потенціація синапсів колатералей Шафера є НМДА-залежним процесом. Іншим можливим механізмом такого впливу може бути пригнічення індукованих ЕС прозапальних шляхів, активація яких знижує здатність синаптичної системи гіпокампа до потенціації. (Virginia C. Moser, 2011b)

У роботі показано, що блокада ПАР1 в період епілептогенезу призводить до нормалізації як довготривалої, так і короткотривалої синаптичної пластичності. У зрізах мозку щурів після ЕС, які отримували блокатор ПАР1 спостерігалось явище потенціації, на відміну від щурів після ЕС, які не отримували блокатор ПАР1. Таким чином можна зробити висновок у залученність ПАР1 як до постсинаптичних так і пресинаптичних механізмів синаптичної пластичності гіпокампа. В той же час, те, що ми не спостерігали ефекту у контролі надає можливість пипускати, що ПАР1 відіграє допоміжну, але не обов'язкову роль в активації процесів синаптичної пластичності.

Вважається, що довготривала пластичність індукується внутрішньоклітинним каскадом, який починається з вивільнення кальцію та зв'язування глутамату та закінчується експресією рецепторів та синтезом протеїнів *de novo*. (Froc et al., 2000; Trepel & Racine, 1998) Наші експерименти демонструють зміну у ранній фазі довготривалої потенціації (вимірювання менше однієї години), ця фаза починається вивільненням глутамату внаслідок високочастотної стимуляції, глутамат в свою чергу зв'язується з АМПА-рецепторами, що провокує надходження натрію до постсинаптичної терміналі, що індукує викликаний постсинаптичний потенціал. (Савотченко, 2012) Достатній рівень деполяризації внаслідок активації АМПА-рецепторів призводить до активації НМДА-рецепторів внаслідок вивільнення магнієвого блоку, що в свою чергу провокує надходження кальцію до

постсинаптичної терміналі, активуючи експресію ферментів, які є відповідальними за підтримання ранньої фази довготривалої потенціації. До таких ферментів відносяться кальцій-кальмодулін кіназа та протеїн-кіназа С, а також протеїн-кіназа А. Було продемонстровано зв'язок протеїн-кінази С та активації PAR1: в моделі ушкодження міокарда було продемонстровано, що патологічна реорганізація актину, спровокована активацією PAR1, знижується при додаванні інгібітора протеїн-кінази С. (Otani et al., 2011)

Протеїн-кіназа С також відіграє роль у роботі пресинаптичних механізмів, які опосередковують короточасну потенціацію. Наприклад, було показано її роль в індукції ПТП: протеїн-кіназа С може знизити зв'язуваність кальцію, таким чином один і той же кальцієвий сигнал викликає вивільнення більшого пулу везикул. (Савотченко, 2012)

Підсумовуючи, у проведеному дослідженні продемонстровано залучення PAR1 у регуляцію тривожної та емоційно-зумовленої поведінки епілептичних щурів та залучення PAR1 у процеси гіпокампальної пластичності. З огляду на те, що нами продемонстровано відсутність ефекту фармакологічної блокади PAR1 на такі процеси як просторова пам'ять та формування навички просторового орієнтування, а також на параметри соціальної поведінки дослідних щурів можна зробити висновок щодо залучення PAR1 саме у роботу вентральної частини гіпокампа. В той же час, з огляду на те, що у роботі використовувалися зрізи центральної частини гіпокампа, ймовірно, що хоча більший терапевтичний ефект блокада PAR1 має на поведінкові процеси, що опосередковуються вентральною частиною гіпокампа, спостерігається також підвищення коротко- та довгочасної потенціації у центральній частині гіпокампа. Отримані дані вказують на ймовірне залучення PAR1 у роботу NMDAR2B-залежних шляхів сигналізації гіпокампа. Цікавим було б подальше дослідження залучення PAR1 у роботу різних відділів гіпокампа, а саме було б цікавим дослідження

різниці залучення PAR1 у процеси синаптичної пластичності дорзального гіпокампа у порівнянні з вентральним. А також ми вважаємо, що вивчення механізмів синаптичної пластичності мигдалеподібного комплексу може бути перспективним щодо визначення механізмів роботи PAR1 у модуляції поведінкових розладів, що розвиваються внаслідок ЕС.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань було досліджено роль протеазаактивованих рецепторів першого типу у патогенезі поведінкових реакцій, викликаних епілептичним статусом. Розглянуто вплив фармакологічної блокади ПАР1 на такі поведінкові реакції експериментальних щурів як тривожність, соціальність, реакція на соціальну новизну, емоційно-зумовлена пам'ять, просторова пам'ять, емоційна збудливість. На основі результатів поведінкових тестів та електрофізіологічних досліджень запропоновано гіпотези, щодо можливих молекулярних механізмів, які сприяють розвитку поведінкових розладів при скроневій епілепсії.

1. Епілептичний статус, індукований у молодому віці, знижує рівень тривожної поведінки молодих щурів і здатність до формування емоційно-зумовленої пам'яті та підвищує рівень емоційної збудливості та агресивності.

2. Блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу в період епілептогенезу нормалізує рівень тривожності та емоційно-збудливості дослідних тварин, не впливаючи на контроль. Блокада протеазаактивованих рецепторів першого типу не впливає на формування умовної реакції страху як в контролі так і після епілептичного статусу.

3. Інгібування функції протеазаактивованих рецепторів першого типу в період епілептогенезу не впливає на здатність молодих тварин до формування просторової пам'яті та такі характеристики соціальної поведінки як соціальність та реакція на соціальну новизну.

4. Епілептичний статус, індукований у молодому віці, призводить до зниження короточасної синаптичної пластичності та зниження довготривалої потенціації в синапсах CA3-CA1 та не змінює амплітуду викликаних постсинаптичних потенціалів радіального шару, викликаних подразненням колатералей Шафера.

5. Пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу нормалізує короткотривалу синаптичну пластичність в умовах парної стимуляції у щурів після епілептичного статусу та нормалізує рівень довготривалої потенціації у синапсах CA3-CA1 гіпокампа, знижений унаслідок епілептичного статусу, та не впливає на контроль.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- Abbott, L. F., & Regehr, W. G. (2004). *Synaptic computation*. 431(October).
- Abend, N. S., Gutierrez-Colina, A. M., & Dlugos, D. J. (2010). Medical Treatment of Pediatric Status Epilepticus. *Seminars in Pediatric Neurology*, 17(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2010.06.005>
- Abraham, W. C., & Bear, M. F. (1996). Metaplasticity : plasticity of synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 19, 126–130.
- Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H., & Deisseroth, K. (2009). Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, 458(7241), 1025–1029. <https://doi.org/10.1038/nature07926>
- Almonte, A. G., Hamill, C. E., Chhatwal, J. P., Wingo, T. S., Barber, J. A., Lyuboslavsky, P. N., David Sweatt, J., Ressler, K. J., White, D. A., & Traynelis, S. F. (2007). Learning and memory deficits in mice lacking protease activated receptor-1. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(3), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.04.004>
- Almonte, A. G., Qadri, L. H., Sultan, F. A., Watson, J. A., Mount, D. J., Rumbaugh, G., & Sweatt, J. D. (2013). Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 124(1), 109–122. <https://doi.org/10.1111/jnc.12075>
- Anand, K. S., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 15(4), 239–246. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (Eds.). (2006). *The Hippocampus Book*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001>
- Araque, A., Carmignoto, G., & Haydon, P. G. (2001). DYNAMIC SIGNALING BETWEEN ASTROCYTES AND NEURONS. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 795–813.
- Bannerman, D. M., Bus, T., Taylor, A., Sanderson, D. J., Schwarz, I., Jensen,

- V., Hvalby, Ø., Rawlins, J. N. P., Seeburg, P. H., & Sprengel, R. (2012). Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1153–1159. <https://doi.org/10.1038/nn.3166>
- Ben-Ari, Y. (2008). Epilepsies and neuronal plasticity: for better or for worse? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 10(1), 17–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18472481>
- Besag, F. M. C. (2018). Epilepsy in patients with autism : links , risks and treatment challenges. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 14, 1–10. <https://doi.org/10.2147/NDT.S120509>
- Betz, B. (1970). Transmitter release. *J. Physiol.*, 206, 629–644.
- Bliss, & Gardner-Medwin. (1973). LONG-LASTING POTENTIATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE DENTATE AREA OF THE UNANAESTHETIZED RABBIT FOLLOWING STIMULATION OF THE PERFORANT PATH. *J. Physiol.*, 232, 357–374.
- Bliss, & Lomo. (1973). LONG-LASTING POTENTIATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE DENTATE AREA OF THE ANAESTHETIZED RABBIT FOLLOWING STIMULATION OF THE PERFORANT PATH. *J. Physiol.*, 232, 331–356.
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bliss, T. V, & Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Bogovik, R., Fedoriuk, M., Isaev, D., Krishtal, O., Holmes, G. L., & Isaeva, E. (2017). Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy & Behavior*, 67, 66–69.

<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.003>

- Bokoch, M. P., Zou, Y., Rasmussen, S. G. F., Liu, C. W., Nygaard, R., Rosenbaum, D. M., Fung, J. J., Choi, H.-J., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Puglisi, J. D., Weis, W. I., Pardo, L., Prosser, R. S., Mueller, L., & Kobilka, B. K. (2010). Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 463(7277), 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature08650>
- Bourgognon, J. M., Schiavon, E., Salah-Uddin, H., Skrzypiec, A. E., Attwood, B. K., Shah, R. S., Patel, S. G., Mucha, M., John Challiss, R. A., Forsythe, I. D., & Pawlak, R. (2013). Regulation of neuronal plasticity and fear by a dynamic change in PAR1-G protein coupling in the amygdala. *Molecular Psychiatry*, 18, 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.133>
- Brandt, C., Gastens, A. M., Sun, M., Hausknecht, M., & Lo, W. (2006). *Treatment with valproate after status epilepticus : Effect on neuronal damage , epileptogenesis , and behavioral alterations in rats*. 51. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.05.021>
- Brandt, C., Glien, M., Gastens, A. M., Fedrowitz, M., Bethmann, K., Volk, H. A., Potschka, H., & Löscher, W. (2007). Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: Lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology*, 53(2), 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.05.001>
- Bromfield EB, Cavazos JE, Sirven JI, E. (2006). *An Introduction to Epilepsy*. Chapter 1, Basic Mechanisms Underlying Seizures an.
- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimarães, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2), 101–111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Caplan, R. (2019). Epilepsy, language, and social skills. *Brain and Language*, 193, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.bandl.2017.08.007>

- Chao, H., Chen, H., Samaco, R. C., Xue, M., Yoo, J., Neul, J. L., Gong, S., Lu, H., Ekker, M., Rubenstein, J. L. R., & Noebels, J. L. (2011). GABAergic dysfunction mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*, 468(7321), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nature09582>.GABAergic
- Chevalleyre, V., Takahashi, K. A., & Castillo, P. E. (2006). Endocannabinoid-Mediated Synaptic Plasticity in the. *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 37–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834>
- Cho, K.-O., Lybrand, Z. R., Ito, N., Brulet, R., Tafacory, F., Zhang, L., Good, L., Ure, K., Kernie, S. G., Birnbaum, S. G., Scharfman, H. E., Eisch, A. J., & Hsieh, J. (2015). Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nature Communications*, 6(1), 6606. <https://doi.org/10.1038/ncomms7606>
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 18–41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 334(1), 33–46. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014478>
- Cook, D. L., Schwindt, P. C., Grande, L. A., & Spain, W. J. (2003). Synaptic depression in the localization of sound. *Nature*, 421(6918), 66–70. <https://doi.org/10.1038/nature01248>
- Cordero, M. I., Rodríguez, J. J., Davies, H. A., Peddie, C. J., Sandi, C., & Stewart, M. G. (2005). Chronic restraint stress down-regulates amygdaloid expression of polysialylated neural cell adhesion molecule. *Neuroscience*, 133(4), 903–910. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.046>
- Coughlin, S. R. (1999). *How the protease thrombin talks to cells How Does a Protease Talk to a Cell?* 96, 11023–11027.

- Crawley, J. N. (2006). *What's Wrong With My Mouse? What's Wrong With My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice Second Edition*. <http://www.wiley.com/go/permission>.
- Curzon, P., Rustay, N. R., & Browman, K. E. (2009). *Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65, 1–105.
- Danzer, S. C. (2012). Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis. *Experimental Neurology*, 233(1), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.05.023>
- De Camilli, P. (1990). The synapsins. *Annu. Rev. Cell Bioi.*, 6, 433–460.
- Denenberg, V. H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 159(3), 852–859. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5260302>
- Derdikman, D., & Knierim, J. J. (2014). *Space, time and memory in the hippocampal formation*.
- Detour, J., Schroeder, H., Desor, D., & Nehlig, A. (2005). A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia*, 46(4), 499–508. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.38704.x>
- Dobrunz, L. E., & Stevens, C. F. (1997). Heterogeneity of Release Probability, Facilitation, and Depletion at Central Synapses. *Neuron*, 18, 995–1008.
- Doherty, J., & Dingledine, R. (2001). *Reduced Excitatory Drive onto Interneurons in the Dentate Gyrus after Status Epilepticus*. 21(6), 2048–2057.
- Donovan, F. M., Pike, C. J., Cotman, C. W., & Cunningham, D. D. (1997). Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(14), 5316–5326. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204916>
- Dos Santos, J. G., Longo, B. M., Blanco, M. M., Menezes de Oliveira, M. G., Mello, L. E., Guilherme, J., Monteiro, B., Marcela, M., Gabriela, M., & Oliveira, M. De. (2005). Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research*, 1066(1–2), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.037>
- Dubovyk, V., & Manahan-Vaughan, D. (2018). Less means more: The magnitude of synaptic plasticity along the hippocampal dorso-ventral axis is inversely related to the expression levels of plasticity-related neurotransmitter receptors. *Hippocampus*, 28(2), 136–150. <https://doi.org/10.1002/hipo.22816>
- Dudchenko, P. A., & Wood, E. R. (2015). Place fields and the cognitive map. In *Hippocampus* (Vol. 25, Issue 6, pp. 709–712). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/hipo.22450>
- Ekdahl, C. T., Zhu, C., Bonde, S., Bahr, B. A., Blomgren, K., & Lindvall, O. (2003). Death mechanisms in status epilepticus-generated neurons and effects of additional seizures on their survival. *Neurobiology of Disease*, 14(3), 513–523. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678767>
- Epps, S. A., Tabb, K. D., Lin, S. J., Kahn, A. B., Javors, M. A., Boss-Williams, K. A., Weiss, J. M., & Weinshenker, D. (2012). Seizure susceptibility and epileptogenesis in a rat model of epilepsy and depression co-morbidity. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(13), 2756–2763. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.141>
- Ettinger, A. B., Weisbrot, D. M., Nolan, E. E., Gadow, K. D., Vitale, S. A., Andriola, M. R., Lenn, N. J., Novak, G. P., & Hermann, B. P. (1998). Symptoms of depression and anxiety in pediatric epilepsy patients. *Epilepsia*, 39(6), 595–599. <https://doi.org/10.1111/j.1528->

1157.1998.tb01427.x

- Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*, 21(2), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.003> Short-term
- Fogwe, L. A., & Mesfin, F. B. (2019). Neuroanatomy, Hippocampus. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29489273>
- Forsgren, L., & Nyström, L. (1990). An incident case-referent study of epileptic seizures in adults. *Epilepsy Research*, 6(1), 66–81. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(90\)90010-s](https://doi.org/10.1016/0920-1211(90)90010-s)
- Freund, T. F., Ylinen, A., Miettinen, R., Pitkänen, A., Lahtinen, H., Baimbridge, K. G., & Riekkinen, P. J. (1992). Pattern of neuronal death in the rat hippocampus after status epilepticus. Relationship to calcium binding protein content and ischemic vulnerability. *Brain Research Bulletin*, 28(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(92\)90227-O](https://doi.org/10.1016/0361-9230(92)90227-O)
- Froc, D. J., Chapman, C. A., Trepel, C., & Racine, R. J. (2000). *Long-Term Depression and Depotentiation in the Sensorimotor Cortex of the Freely Moving Rat*. 20(1), 438–445.
- Galarraga, E., Tecuapetla, F., & Carrillo-reid, L. (2007). *Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses*. 104(24), 1–6.
- Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D., & Kaufmann, R. (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-86>
- Gilliam, F., & Kanner, A. M. (2002). *Behavior Treatment of depressive*

disorders in epilepsy patients. 3, 2–9.

- Glien, M., Brandt, C., Potschka, H., Voigt, H., Ebert, U., & Löscher, W. (2001). Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Research*, 46(2), 111–119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463512>
- Hånell, A., & Marklund, N. (2014). Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 252. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00252>
- Hattiangady, B., Rao, M., & Shetty, A. (2004). Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. *Neurobiology of Disease*, 17(3), 473–490. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.08.008>
- Haydon, P. G. (2001). GLIA : LISTENING AND TALKING TO THE SYNAPSE. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(March), 185–193.
- Helmstaedter, C., Kurthen, M., Lux, S., Reuber, M., & Elger, C. E. (2003). Chronic epilepsy and cognition: A longitudinal study in temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*, 54(4), 425–432. <https://doi.org/10.1002/ana.10692>
- Hempel, C. M., Hartman, K. H., Wang, X.-J., Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2000). Multiple Forms of Short-Term Plasticity at Excitatory Synapses in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Journal of Neurophysiology*, 83(5), 3031–3041. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.5.3031>
- Hermann, B. P., Seidenberg, M., & Bell, B. (2002). The neurodevelopmental impact of childhood onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function and the risk of progressive cognitive effects. *Progress in Brain Research*, 135, 429–438. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)35040-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)35040-4)
- Hermann, Seidenberg, & Jones. (2008). The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed? *The Lancet Neurology*, 7(2), 151–160.

- [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351106399%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70018-8%5Cnhttp://cy7sh3vq3t.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&sid=EMBASE&issn=14744422&id=doi:10.1016/S1474-4422\(08\)70018-](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L351106399%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70018-8%5Cnhttp://cy7sh3vq3t.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&sid=EMBASE&issn=14744422&id=doi:10.1016/S1474-4422(08)70018-)
- Hernan, A. E., Alexander, A., Jenks, K. R., Barry, J., Lenck-Santini, P.-P. P., Isaeva, E., Holmes, G. L., & Scott, R. C. (2014). Focal epileptiform activity in the prefrontal cortex is associated with long-term attention and sociability deficits. *Neurobiology of Disease*, 63, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.11.012>
- Horii, Y. (2008). Increased Anxiety-Like Behavior in Neuropsin (Kallikrein-Related Peptidase 8) Gene-Deficient Mice. *Behavioral Neuroscience*, 122(3), 498–504. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.3.498>
- Huang, X., McMahon, J., & Huang, Y. (2012). Rapamycin attenuates aggressive behavior in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy. *Neuroscience*, 215, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.011>
- I.V.Lushnikova. (2009). MORPHOLOGICAL PLASTICITY OF HIPPOCAMPAL CA1 NEURONS IN VITRO AFTER SHORT-TERM ANOXIA/HYPOGLYCEMIA FOLLOWED BY REOXYGENATION. *Therapy*, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000253>
- Inostroza, M., Cid, E., Brotons-Mas, J., Gal, B., Aivar, P., Uzcateg, Y. G., Sandi, C., & de la Prida, L. M. (2011). Hippocampal-Dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022372>
- Inostroza, M., Cid, E., Menendez de la Prida, L., & Sandi, C. (2012). Different emotional disturbances in two experimental models of temporal Lobe Epilepsy in rats. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038959>

- Iptyshev, Gorina, Lopatina, Komleva, Chernykh, Belova, & Salmina. (2017). Comparison of the Tests " Radial Arm Maze " and " Morris Water Maze " At Evaluationspatial Memory in Experimental Animals in the Process of Neurobehavioral Testing. *Fundamental and Clinical Medicine*, 2(2), 62–69. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2017-2-2-62-69>
- Isaev, D., Lushnikova, I., Lunko, O., Zapukhliak, O., Maximyuk, O., Romanov, A., Skibo, G. G., Tian, C., Holmes, G. L., & Isaeva, E. (2015). Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis. *Neurobiology of Disease*, 78, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.026>
- Isaev, Dmytro, Isaeva, E., Khazipov, R., & Holmes, G. L. (2005). Anticonvulsant Action of GABA in the High Potassium–Low Magnesium Model of Ictogenesis in the Neonatal Rat Hippocampus In Vivo and In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, 94(4), 2987–2992. <https://doi.org/10.1152/jn.00138.2005>
- Iyengar, S. S., LaFrancois, J. J., Friedman, D., Drew, L. J., Denny, C. A., Burghardt, N. S., Wu, M. V, Hsieh, J., Hen, R., & Scharfman, H. E. (2015). Suppression of adult neurogenesis increases the acute effects of kainic acid. *Experimental Neurology*, 264, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.11.009>
- Jones, J. E., Siddarth, P., Almane, D., Gurbani, S., Hermann, B. P., & Caplan, R. (2016). Identification of risk for severe psychiatric comorbidity in pediatric epilepsy. *Epilepsia*, 57(11), 1817–1825. <https://doi.org/10.1111/epi.13575>
- Kadam, S. D., White, A. M., Staley, K. J., & Dudek, F. E. (2010). Continuous electroencephalographic monitoring with radio-telemetry in a rat model of perinatal hypoxia-ischemia reveals progressive post-stroke epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(1), 404–415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4093-09.2010>

- Kandel, E. R., & Pittenger, C. (1999). The past, the future and the biology of memory storage. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 354(1392), 2027–2052. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0542>
- Kandel, & Tauc. (1965). MECHANISM OF HETEROSYNAPTIC FACILITATION IN THE GIANT CELL OF THE ABDOMINAL GANGLION OF APLYSIA DEPILOANS. *J. Physiol.*, 181, 28–47.
- Kanner, A. M. (2003). Depression in epilepsy: Prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biological Psychiatry*, 54(3), 388–398. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00469-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00469-4)
- Kanner, A. M. (2008). *C Urrrent R Eview in C Linical S Cience I Maging the B Rain ' S*. 8(4), 85–89.
- Katz, B., & Miledi, R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *The Journal of Physiology*, 195(2), 481–492. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1968.sp008469>
- Kemppainen, E. J. S., Nissinen, J., & Pitk, A. (2006). *Fear Conditioning Is Impaired in Systemic Kainic Acid and Amygdala-stimulation Models of Epilepsy*. 47(5), 820–829.
- Kim, Y., Venkataraju, K. U., Pradhan, K., Mende, C., Taranda, J., Turaga, S. C., Arganda-Carreras, I., Ng, L., Hawrylycz, M. J., Rockland, K. S., Seung, H. S., & Osten, P. (2015). Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Reports*, 10, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.014>
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25(23), R1116–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>
- Lopes, M. W., Lopes, S. C., Santos, D. B., Costa, A. P., Gonçalves, F. M., de Mello, N., Prediger, R. D., Farina, M., Walz, R., & Leal, R. B. (2016). Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 55, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.001>

- Lowenstein, D. H., Bleck, T., & Macdonald, R. L. (1999). It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia*, 40(1), 120–122. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1999.tb02000.x>
- Lunko, O. O., Bogovyk, R. I., Fedoriuk, M. P., Semenets, G. S., & Isaeva, E. V. (2018). The protease-activated receptor 1 inhibition during epileptogenesis does not alter behavioral excitability in rats. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 1(64), 12–18.
- Luo, W., Wang, Y., & Reiser, G. (2007a). Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. In *Brain Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.002>
- Luo, W., Wang, Y., & Reiser, G. (2007b). Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Research Reviews*, 56(2), 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.002>
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., & Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, 305(5936), 719–721. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6415483>
- Macdermott, A. B., Role, L. W., & Siegelbaum, S. A. (1999). RECEPTORS AND THE CONTROL OF TRANSMITTER RELEASE. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, 443–485.
- Maggio, N., Shavit Stein, E., & Segal, M. (2018). Cannabidiol Regulates Long Term Potentiation Following Status Epilepticus: Mediation by Calcium Stores and Serotonin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00032>
- Magleby, & Zengel. (1982). A Quantitative Description of Stimulation-induced Changes in Transmitter Release at the Frog Neuromuscular Junction. *J Gen Physiol*, 80(October), 613–638.
- Malenka, R C, & Nicoll, R. A. (1999). Long-term potentiation--a decade of

- progress? *Science* (New York, N.Y.), 285(5435), 1870–1874.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10489359>
- Malenka, Robert C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD. *Neuron*, 44(1), 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Malenka, Robert C., & Bear, M. F. (2004). *LTP and LTD : An Embarrassment of Riches*. 44, 5–21.
- Markram, H., & Tsodyks, M. (1996). *Registribution of synaptic efficacy between piramydal neurons* (pp. 807–810). Letters to Nature.
- Marques-Carneiro, J. E., Faure, J. B., Cosquer, B., Koning, E., Ferrandon, A., De Vasconcelos, A. P., Cassel, J. C., & Nehlig, A. (2014). Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): Inclusion of Wistar rats as a second control. *Epilepsia*, 55(9), 1460–1468. <https://doi.org/10.1111/epi.12738>
- Martin, J. H. (John H. (2012). *Neuroanatomy : text and atlas*. McGraw-Hill.
- Martin, R. C., Griffith, H. R., Faught, E., Gilliam, F., Mackey, M., & Vogtle, L. (2005). Cognitive Functioning in Community Dwelling Older Adults with Chronic Partial Epilepsy. *Epilepsia*, 46(2), 298–303. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.02104.x>
- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. (2000). SYNAPTIC PLASTICITY AND MEMORY : An Evaluation of the Hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23, 649–711.
- Matys, T., Pawlak, R., Matys, E., Pavlides, C., McEwen, B. S., & Strickland, S. (2004). Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(46), 16345–16350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407355101>
- Mbebi, C., Rohn, T., Doyennette, M.-A., Chevessier, F., Jandrot-Perrus, M., Hantaï, D., & Verdière-Sahuqué, M. (2001). Thrombin Receptor Induction by Injury-Related Factors in Human Skeletal Muscle Cells.

- Experimental Cell Research*, 263(1), 77–87.
<https://doi.org/10.1006/EXCR.2000.5090>
- McCormick, D. A., & Contreras, D. (2001). On The Cellular and Network Bases of Epileptic Seizures. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 815–846. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.815>
- McHugh, S. B., Deacon, R. M. J., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2004). Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 118(1), 63–78. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.1.63>
- Moser, V C, McCormick, J. P., Creason, J. P., & MacPhail, R. C. (1988). Comparison of chlordimeform and carbaryl using a functional observational battery. *Fundamental and Applied Toxicology : Official Journal of the Society of Toxicology*, 11(2), 189–206.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146518>
- Moser, Virginia C. (2011a). Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1177/0192623310385255>
- Moser, Virginia C. (2011b). Functional Assays for Neurotoxicity Testing. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 36–45.
<https://doi.org/10.1177/0192623310385255>
- Mula, M., & Monaco, F. (2009). Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update. *Epileptic Disorders : International Epilepsy Journal with Videotape*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1684/epd.2009.0238>
- Muller, R. U., Stead, M., & Pach, J. (1996). The hippocampus as a cognitive graph. *Journal of General Physiology*, 107(6), 663–694.
<https://doi.org/10.1085/jgp.107.6.663>
- Nadler, J. J., Moy, S. S., Dold, G., Trang, D., Simmons, N., Perez, A., Young, N. B., Barbaro, R. P., Piven, J., Magnuson, T. R., & Crawley, J. N. (2004). Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes, Brain and Behavior*.

<https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x>

- Nagappan, G., & Lu, B. (2005). Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *TRENDS in Neurosciences*, 28(9), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.07.003>
- Nicoll, R. A., & Malenka, R. C. (1999). Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868, 515–525.
- Nishimura, M., Gu, X., & Swann, J. W. (2011). Seizures in early life suppress hippocampal dendrite growth while impairing spatial learning. *Neurobiology of Disease*, 44(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.07.002>
- Nugent, F. S., Penick, E. C., & Kauer, J. A. (2007). Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature*, 446(April). <https://doi.org/10.1038/nature05726>
- Otani, H., Yoshioka, K., Nishikawa, H., Inagaki, C., & Nakamura, T. (2011). Involvement of protein kinase C and RhoA in protease-activated receptor 1-mediated F-actin reorganization and cell growth in rat cardiomyocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 115(2), 135–143. <https://doi.org/10.1254/jphs.10197fp>
- Paoletti, P., & Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
- Pardoe, H., Pell, G. S., Abbott, D. F., Berg, A. T., & Jackson, G. D. (2008). Multi-site voxel-based morphometry: methods and a feasibility demonstration with childhood absence epilepsy. *NeuroImage*, 42(2), 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.007>
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A., & Sacktor, T. C. (2006). Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science*, 313, 1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1128657>

- Pawlak, R., Rao, B. S. S., Melchor, J. P., Chattarji, S., McEwen, B., & Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 18201–18206. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509232102>
- Pawlak, Robert, Magarinos, A. M., Melchor, J., McEwen, B., & Strickland, S. (2003). *Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior* CA. 6(2). <https://doi.org/10.1038/nn998>
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985a). *Validation of open "closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.* 14, 149–167.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985b). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pitka, A., Lukasiuk, K., Dudek, F. E., & Staley, K. J. (2015). Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5, 1–17.
- Pitkänen, A., & Lukasiuk, K. (2009). Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 14(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2008.09.023>
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F. E., & Staley, K. J. (2015a). Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(10), a022822. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022822>
- Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F. E., & Staley, K. J. (2015b). Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(10), a022822. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022822>
- Polascheck, N., Bankstahl, M., & Löscher, W. (2010). The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*, 224(1), 219–

233. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.014>
- Poppenk, J., Evensmoen, H. R., Moscovitch, M., & Nadel, L. (2013). Long-axis specialization of the human hippocampus. *Trends in Cognitive Sciences*, 17(5), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.03.005>
- Postnikova, T. Y., Zubareva, O. E., Kovalenko, A. A., Kim, K. K., Magazanik, L. G., & Zaitsev, A. V. (2017). Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors. *Biochemistry (Moscow)*, 82(3), 282–290. <https://doi.org/10.1134/S0006297917030063>
- Postnikova, Tatyana Y. (2019). Transient Switching of NMDA-Dependent Long-Term Synaptic Potentiation in CA3-CA1 Hippocampal Synapses to - mGluR 1 - Dependent Potentiation After Pentylentetrazole-Induced Acute Seizures in Young Rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-00647-3>
- Pulsipher, D. T., Seidenberg, M., Guidotti, L., Tuchscherer, V. N., Morton, J., Sheth, R. D., & Hermann, B. (2009). Thalamofrontal circuitry and executive dysfunction in recent-onset juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, 50(5), 1210–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01952.x>
- Racine, R., Okujava, V., & Chipashvili, S. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor Seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32, 295–299. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90178-2](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90178-2)
- Rice, A. C., Floyd, C. L., Lyeth, B. G., Hamm, R. J., & Delorenzo, R. J. (1998). Status Epilepticus Causes Long-Term NMDA Receptor-Dependent Behavioral Changes and Cognitive Deficits. *Epilepsia*, 39, 1148–1157.
- Rosahl, Spillane, Missler, Herz, Selig, Wolff, Hammer, Malenka, & Südhof. (1995). Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*, 375(6531), 488–493.

- Rosahl, T. W., Geppert, M., Spitlane, D., Herx, J., Hammer, R. E., Malenka, R. C., & Südhof, T. C. (1993). Short-Term Synaptic Plasticity Is Altered in Mice Lacking Synapsin I. *Cell*, 75, 661–670.
- Samson, A. L., & Medcalf, R. L. (2006a). Tissue-Type Plasminogen Activator: Minireview A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 50, 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.013>
- Samson, A. L., & Medcalf, R. L. (2006b). Tissue-Type Plasminogen Activator: A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity. *Neuron*, 50(5), 673–678. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.013>
- Semenikhina, M., Bogovyk, R., Fedoriuk, M., Nikolaienko, O., Alkury, L. T., Savotchenko, A., Krishtal, O., & Isaeva, E. (2019). Neuroscience Letters Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus. *Neuroscience Letters*, 692(October 2018), 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.058>
- Sharma, A. K., Reams, R. Y., Jordan, W. H., Miller, M. A., Thacker, H. L., & Snyder, P. W. (2007). Mesial Temporal Lobe Epilepsy: Pathogenesis, Induced Rodent Models and Lesions. *Toxicologic Pathology*, 35(7), 984–999. <https://doi.org/10.1080/01926230701748305>
- Shi, X., Wang, J., Lei, G., & Sun, R. (2007). *Long-term effects of recurrent seizures on learning, behavior and anxiety: an experimental study in rats*. 3(107).
- Soh, U. J., Dore, M. R., Chen, B., & Trejo, J. (2010). Signal transduction by protease-activated receptors. *British Journal of Pharmacology*, 160(2), 191–203. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00705.x>
- Stafstrom, C. E. (1998). Back to Basics: The Pathophysiology of Epileptic Seizures: A Primer For Pediatricians. *Pediatrics in Review*, 19(10), 342–351. <https://doi.org/10.1542/pir.19-10-342>

- Striggow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, a, Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J., Krug, M., Reymann, K. G., & Reiser, G. (2001). Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *The European Journal of Neuroscience*, 14(4), 595–608.
- Timofeev, I., Chauvette, S., & Soltani, S. (2014). Neocortical Focus: Experimental View. In *Modern Concepts of Focal Epileptic Networks* (1st ed., Vol. 114). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418693-4.00002-9>
- Traynelis, S. F., & Trejo, J. (2007). Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Hematology*, 14(3), 230–235. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3280dce568>
- Trepel, C., & Racine, R. J. (1998). *Long-term Potentiation in the Neocortex of the Adult , Freely Moving Rat*. 719–729.
- Tuchman, R., & Rapin, I. (2002). Review Epilepsy in autism. *The Lancet Neurology*, 1(October), 352–358.
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. (2004). HOMEOSTATIC PLASTICITY IN THE DEVELOPING NERVOUS SYSTEM. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 97–107. <https://doi.org/10.1038/nrn1327>
- Varela, J. A., Sen, K., Gibson, J., Fost, J., Abbott, L. F., & Nelson, S. B. (1997). A quantitative description of short-term plasticity at excitatory synapses in layer 2/3 of rat primary visual cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(20), 7926–7940. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315911>
- Warthen, D. M., Wiltgen, B. J., & Provencio, I. (2011). Light enhances learned fear. *PNAS*, 108(33), 13788–13793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103214108>
- Weber, B., Luders, E., Faber, J., Richter, S., Quesada, C. M., Urbach, H., Thompson, P. M., Toga, A. W., Elger, C. E., & Helmstaedter, C. (2007). Distinct regional atrophy in the corpus callosum of patients with temporal

- lobe epilepsy. *Brain : A Journal of Neurology*, 130(Pt 12), 3149–3154.
<https://doi.org/10.1093/brain/awm186>
- Weinstein, J. R., Lau, A. L., Brass, L. F., & Cunningham, D. D. (2002). Injury-Related Factors and Conditions Down-Regulate the Thrombin Receptor (PAR-1) in a Human Neuronal Cell Line. *Journal of Neurochemistry*, 71(3), 1034–1050. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71031034.x>
- Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). *Molecular Cloning of a Functional Thrombin Receptor Reveals a Novel Proteolytic Mechanism of Receptor Activation*. 64.
- Whitlock, J. R. (2006). Learning Induces Long-Term Potentiation Potentiation in the Hippocampus. *Science*, 313, 1093–1097.
<https://doi.org/10.1126/science.1128134>
- Zucker, R. S. (1989). Short-term synaptic plasticity. *Ann Rev Neurosci*, 12, 13–31.
- Zucker, R. S., & Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 355–405.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547>
- Матвієнко. (2005). ЕПІЛЕПТИЧНИЙ СТАТУС — НЕВІДКЛАДНА ТЕРАПІЯ. *Медицина Світу*, 8, 3–12.
- Савотченко, А. В. (2012). Роль ендогенної нейрамінідази у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів [Bogomoletz Institute of Physiology]. <file:///C:/Users/User/Downloads/fvm939e.pdf>
- Семеніхіна, М. О., Боговик, Р. І., Федорюк, М. П., Лунько, О. О., Савотченко, А. В., & Ісаєва, О. В. (2019). Селективний Антагоніст Протеазоактивованих Рецепторів 1 Нормалізує Рівень Емоційної Збудливості Щурів У Латентній Стадії Формування Скреневої Епілепсії. *Фізіологічний Журнал*, 65(3), 7–11.
- Семеніхіна, М. О., Боговик, Р. І., Федорюк, М. П., Стасишин, О. В., Савотченко, А. В., & Ісаєва, О. В. (2018). Фармакологічна блокада

протеазоактивованих рецепторів 1 не впливає на соціальну поведінку щурів після епілептичного статусу. *Fiziologichnyi Zhurnal*, 64(6), 17–22.

Яровая, Г.А., Блохина, Т.Б., Нешкова, Е. А. (2009). Рецепторы, активируемые протеиназами (PARs) – сигнальный путь, инициируемый ограниченным протеолизом. *Лабораторная Медицина*, 10, 23–34.