

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

Запухляк Ольга Сергіївна

УДК 59.085:611.813.14:612.825.3

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

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, академік НАН України **Кришталь Олег Олександрович**, Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, директор, зав. відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор **Жолос Олександр Вікторович**, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини» завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

кандидат біологічних наук, доцент **Кузнецов Ілля Павлович**, Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, доцент кафедри фізіології людини і тварин

Захист дисертації відбудеться «27» квітня 2021 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.0 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, Київ-24, вул. Богомольця, 4.

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

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

Автореферат розіслано «25» березня 2021 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Епілепсія є поширеним неврологічним розладом, що має тривалу історію дослідження, складні соціо-економічні наслідки та досі нез'ясовані механізми розвитку. Основною клінічною ознакою епілепсії є наявність неспровокованих та повторюваних періодів гіперсинхронної нейронної активності – епілептичних судом. Іктогенез (від лат. “*ictus*” – удар) – це сукупність динамічних змін, що спричиняє початок, розповсюдження і припинення судомного нападу. З'ясування механізмів іктогенезу є необхідним для розробки нових методів фармакотерапії епілепсії. Ця проблема є високоактуальною, зважаючи на незадовільну ефективність більшості сучасних протиепілептичних засобів.

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

Внаслідок унікальної анатомічної структури та циклічності основних синаптичних зв'язків, гіпокамп має високу схильність до генерації та розповсюдження гіперсинхронної нейронної активності. Навіть в умовах блокади синаптичної передачі гіпокампальні нейронні мережі здатні генерувати та підтримувати досить характерну ЕФА. Так відомо, що суперфузія зрізів гіпокампа штучною спинномозковою рідиною (шСМР) з низьким вмістом кальцію викликає спонтанну тривалу судомоподібну активність. Оскільки кальцій є необхідним для потенціалкерованого вивільнення нейротрансмітерів з пресинаптичної терміналі, ЕФА, що виникає в умовах суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим розчином класифікують як несинаптичну.

З'ясування механізмів генерації несинаптичної ЕФА в гіпокампі має як фундаментальне, так і практичне значення. З експериментів *in vivo* відомо, що під час тривалої судомної активності рівень позаклітинного кальцію локально може знизитися до 0.2 мМ, що є достатнім для блокування синаптичної передачі. Таким чином, не виключено, що генерація ЕФА за відсутності синаптичної передачі може відбуватися не лише в експериментальних умовах, але здатна реалізуватися і в умовах клініки, під час розвитку патологічних станів. Можна було чекати, що вивчення умов, за яких в зрізах гіпокампа виникає несинаптична ЕФА, дозволить отримати нові істотні дані щодо механізмів схильності нейронних мереж гіпокампа до судомної гіперсинхронізації активності.

В даній роботі повна блокада синаптичної передачі досягалась шляхом суперфузії зрізів гіпокампа шСМР з низьким вмістом кальцію або кадмійвмісним розчином (CdCl_2 15 мкМ); в таких умовах відбувається блокування функції потенціалкерованих кальцієвих каналів та істотне пригнічення вивільнення нейротрансмітерів. Умови часткової блокади синаптичної передачі досягались суперфузією зрізів гіпокампа шСМР, котра містила суміш антагоністів АМПА- НМДА- та ГАМК-рецепторів. На відміну від низькокальцієвої та кадмійвмісної шСМР, розчин зі вказаними антагоністами не блокує вивільнення нейротрансмітерів, тому ЕФА, що виникає в таких умовах, не обов'язково буде наслідком дії лише несинаптичних механізмів. Оскільки переважна більшість синаптичних зв'язків між зонами гіпокампа СА3 та СА1 є глутамат- або ГАМКергічними, розчин з сумішшю АМПА-, НМДА-, та ГАМК-антагоністів використовували для з'ясування додаткових механізмів синхронізації активності в гіпокампальній нейронній мережі, котрі не залежать від стану цих основних синаптичних систем. Також в роботі досліджено вплив антагоністів холінорецепторів на генерацію ЕФА в гіпокампі в умовах блокування глутамат- та ГАМКергічної синаптичної передачі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано відповідно загальному плану наукових досліджень у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012 – 2016; номер державної реєстрації – 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273), «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343).

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

Для досягнення мети дослідження були поставлені наступні *завдання:*

1. Зареєструвати епілептиформну активність в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа під час повної або часткової блокади синаптичної передачі та порівняти відповідні характеристики гіпокампограм, отриманих в таких умовах.
2. Порівняти рівні синхронізації епілептиформної активності в зонах СА3 та СА1 гіпокампа в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі.

3. Визначити умови, критично необхідні для синхронізації епілептиформної активності в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа під час блокування глутаматергічної та ГАМК-ергічної синаптичної передачі.
4. Визначити типи синаптичних рецепторів, що беруть участь у синхронізації активності зон гіпокампа СА3 та СА1 в умовах блокади глутаматергічної та ГАМК-ергічної синаптичної передачі.
5. Визначити роль рецепторів, що беруть участь у СА3–СА1-синхронізації під час селективного блокування синаптичної передачі, в генерації епілептиформної активності в *in vitro*-моделях епілепсії.

Об'єкт дослідження – епілептиформна активність в мережах гіпокампа СА3–СА1, не пов'язана з активацією глутамат- та ГАМК-ергічної провідностей.

Предмет дослідження – електрографічні кореляти епілептиформної активності та механізми її виникнення в зонах гіпокампа СА3 та СА1 під час повної або часткової блокади синаптичної передачі.

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

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

мекаміламін пригнічує ЕФА, індуковану антагоністом ГАМК бікукуліном; це вказує на істотну роль н-холінорецепторів в розвитку бікукулініндукованої гіперсинхронізації в гіпокампі.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Одержані результати свідчать, що активація нікотинових ацетилхолінових рецепторів сприяє синхронізації ЕФА в ділянках СА3 та СА1 гіпокампа, незалежно від стану основних синаптичних систем (АМПА- і НМДА-глутаматних рецепторів та ГАМК-рецепторів). Результати даної роботи вказують на потенційну роль нікотинових холінорецепторів як можливої фармакологічної мішені при розробці протиепілептичних засобів. Показано, що антагоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів мекаміламін (zareєстрований антигіпертензивний препарат) припиняє синхронізацію ЕФА в межах СА3 та СА1 в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа. Цей факт дає підстави для подальшого вивчення можливих протиепілептичних властивостей мекаміламіну. Одержані дані мають практичне значення для розробки нових засобів контролю та запобігання судомної активності в гіпокампі.

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

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

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

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається з 5 підрозділів, в яких наведено сучасні уявлення про етіологію та патогенез судомних станів, висвітлені відомості стосовно ролі

гіпокампа в генерації церебральної судомної активності, розглянуто методи експериментального дослідження ЕФА в свіжоізолюваних зрізах мозку щурів.

Матеріали та методи досліджень. В розділі обґрунтовано вибір об'єкту дослідження – свіжоізолюваних зрізів гіпокампа щурів – як адекватної дослідницької моделі. В експериментах використовували білих щурів лінії Вістар WAG/GSto, котрих утримували в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Всі експериментальні процедури було виконано згідно з міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин: Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV. Проведення всіх експериментальних досліджень було узгоджено з Комітетом з біоетики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України згідно з протоколом № 2/20 від 26.02.2020 року.

Приготування свіжоізолюваних зрізів гіпокампа. В експериментах використовували щурів віком 10–14 днів. Тварин анестезували та швидко декапітували. Вилучений мозок занурювали в розчин шСМР наступного складу (в мМ): NaCl 125, KCl 3.5, MgCl₂ 1.3, CaCl₂ 2.0, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 24, глюкоза 11; рН 7.3–7.4. Свіжоізолювані зрізи мозку нарізали вібротомом (NVSL, World Precision Instruments, США); товщина зрізів складала 0.5 мм. Перед початком електрофізіологічних вимірювань зрізи мозку інкубували не менше 90 хв в шСМР при температурі 22–24°C та постійній аерації розчину карбогеном (95% O₂/ 5% CO₂).

Позаклітинні електричні потенціали відводили від пірамідного шару ділянок CA3 та CA1 гіпокампа. Електричні сигнали посилювали за допомогою диференційного підсилювача M1800 (A-M Systems, США) та оцифровували аналогово-цифровим перетворювачем (NI PCI-6221; National Instruments, США) з частотою 10 кГц. Протягом всього часу реєстрації зрізи суперфузували шСМР (2–3 мл/хв) при постійній карбогенізації. Запис електрографічних корелятивів ЕФА виконували за допомогою програми WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, University of Strathclyde, Glasgow, Велика Британія).

Індукцію ЕФА забезпечували шляхом суперфузії зрізів мозку модифікованою шСМР наступного складу:

- 1) низькокальцієвий розчин (мМ) – NaCl 115, KCl 5.0, MgCl₂ 1.3, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 24, глюкоза 11;
- 2) кадмійвмісний розчин (мМ) – NaCl 115, KCl 5.0, MgCl₂ 1.3, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 24, глюкоза 11; 10 мкМ CdCl₂;
- 3) розчин з сумішшю антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів (мМ) – NaCl 100, KCl 5.0, CaCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 1.25, NaHCO₃ 24, глюкоза 11; антагоніст АМПА-

глутаматних рецепторів DNQX 10 мкМ (*6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione*); антагоніст НМДА-глутаматних рецепторів – МК-801 2.0 мкМ (*((5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate*); антагоніст ГАМК_A-рецепторів бікукулін 10 мкМ (*((6R)-6-[(5S)-6-methyl-7,8-dihydro-5H-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-yl]-6H-furo[3,4-g][1,3]benzodioxol-8-one*).

Корелятами епілептиформної активності вважали повторювані пароксизмальні події – транзйентні зміни позаклітинного потенціала тривалістю 20 мс або більше. Швидкі зміни потенціалу тривалістю 20–50 мс класифікували як епілептиформні спайки (рис. 1 А). Зміни потенціалу тривалістю 0.1–1.0 с класифікували як епілептиформні розряди або польові події (*field events*, рис. 1 Б).

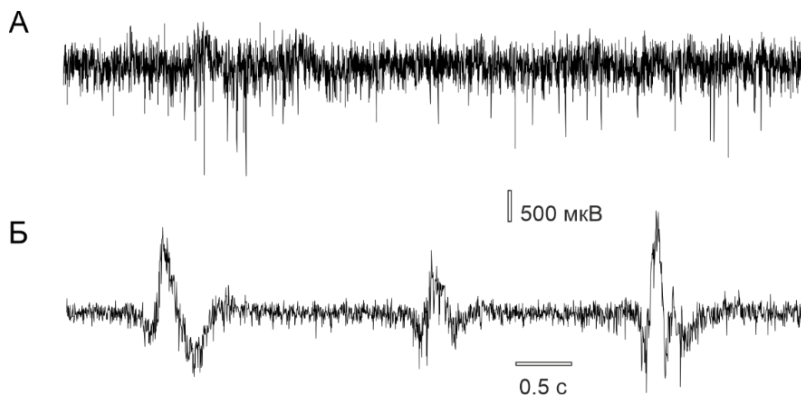


Рис. 1. Електрографічні кореляти ЕФА в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа. А) Популяційні спайки; Б) польові розряди.

Аналіз даних. Обробку та аналіз числових результатів проводили з використанням наступних програм: Clampfit (Axon Instruments, США), MiniAnalysis (Synaptosoft, version

6.0.7, США), Origin (OriginLab, version 7.0, США), GraphPad Prism 6.0 (Graph Pad Software, США), Minitab 17 (Minitab, LLC, США). Графічні дані та ілюстрації представляли за допомогою CorelDraw X4 (Corel Corporation, Канада). Для перевірки гіпотези щодо відповідності розподілу емпіричних даних нормальному закону застосовували критерій Шапіро-Уїлка. Для визначення статистичної вірогідності міжгрупових різниць було застосовано парний та непарний *t*-тест Ст'юдента, дисперсійний аналіз ANOVA, а також тест Колмогорова-Смирнова та парний тест Уїлкоксона. Числові результати представлені як середні значення \pm стандартне відхилення (s.d., середнє квадратичне).

Рівень синхронізації ЕФА в зонах СА1 та СА3 оцінювали за допомогою крос-кореляційного аналізу. Побудову функції крос-кореляції було застосовано для визначення рівня синхронізації ЕФА, відведеної двома електродами, котрі розташовувалися в зонах СА3 та СА1. Для крос-кореляційного аналізу брали сегменти одночасної реєстрації польових потенціалів в зонах СА3 та СА1 тривалістю 10–15 хвилин. Спочатку записи обробляли з використанням електронного фільтра Гауса (фільтра нижніх частот, 50 Гц). Далі за допомогою програм Clampfit або Minitab вираховували крос-кореляційну функцію для двох одночасних реєстрацій польових потенціалів у вказаних зонах гіпокампа. Для зменшення впливу рівня шуму на результати аналізу, крос-кореляційні функції було оброблено за допомогою згладжувача

LOWESS (*Locally Weighted Scatter plot Smoothing*). Максимум крос-кореляційної функції характеризував рівень синхронізації ЕФА між зонами СА3 та СА1. Результати представлені як середні значення максимумів крос-кореляції \pm стандартне відхилення (s.d.).

Результати досліджень.

1. Епілептиформна активність в гіпокампі в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах.

Суперфузія зрізів гіпокампа низькокальцієвим розчином призводила до появи ЕФА в ділянках СА1 та СА3 ($n = 31$, рис. 2). Несинаптична ЕФА в низькокальцієвому розчині розвивалась в зоні СА3 швидше, ніж така в СА1. Середнє значення латентного періоду розвитку ЕФА в СА1 складало в 21.08 ± 12.68 хв ($n = 31$), а в СА3 – 14.68 ± 9.68 хв ($n = 29$, $p = 0.03$). Під час суперфузії зрізів низькокальцієвим розчином електрографічним корелятом ЕФА були, переважно, популяційні спайки (рис. 2). Частота популяційних спайків в зоні СА1 не відрізнялась значуще від аналогічної частоти в СА3. Так у зоні СА1 середнє значення частоти популяційних спайків складало 1.48 ± 1.12 с⁻¹ ($n = 31$), а в зоні СА3 – 1.79 ± 1.40 с⁻¹ ($n = 17$, $p = 0.41$).

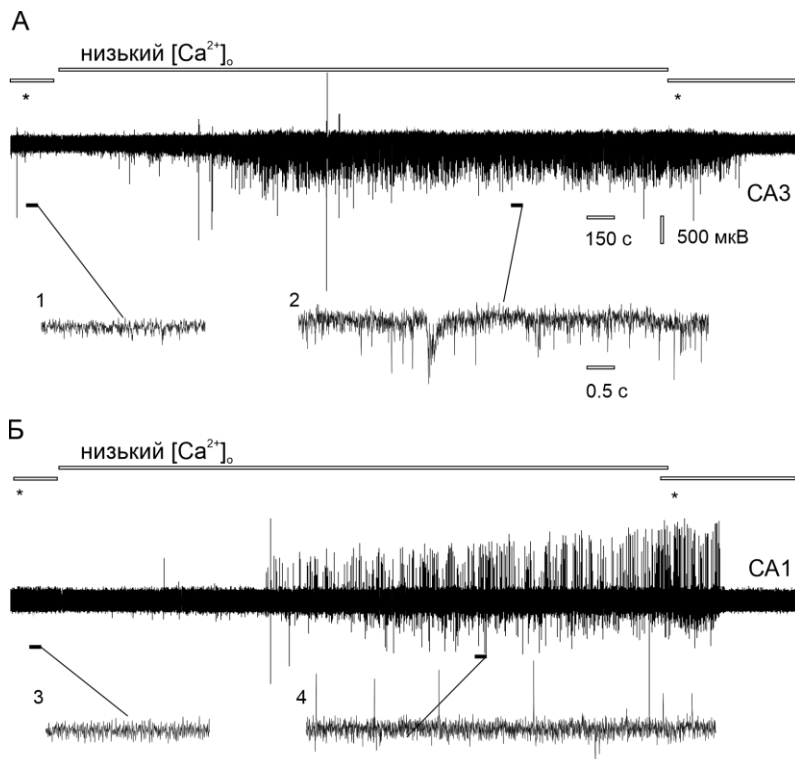


Рис. 2. Одночасна реєстрація польових потенціалів у зонах СА3 (А) та СА1 (Б) гіпокампа під час суперфузії зрізів контрольним розчином (*) та низькокальцієвим розчином. 1) Запис позаклітинного потенціалу в СА1 в контрольних умовах; 2) несинаптична ЕФА – популяційні спайки в СА3. 3) Відсутність ЕФА в СА1 під час суперфузії контрольним розчином; 4) несинаптична ЕФА – популяційні спайки в СА1.

Подібно до того, що спостерігалось в низькокальцієвому середовищі, під час суперфузії зрізів кадмійвмісним розчином основним проявом ЕФА була поява популяційних спайків (рис. 3). Латентний період розвитку ЕФА в кадмійвмісному розчині в зоні СА3 був 10.14 ± 5.13 хв ($n = 14$), а в СА1 – 15.66 ± 8.80 хв ($n = 15$, $p = 0.05$).

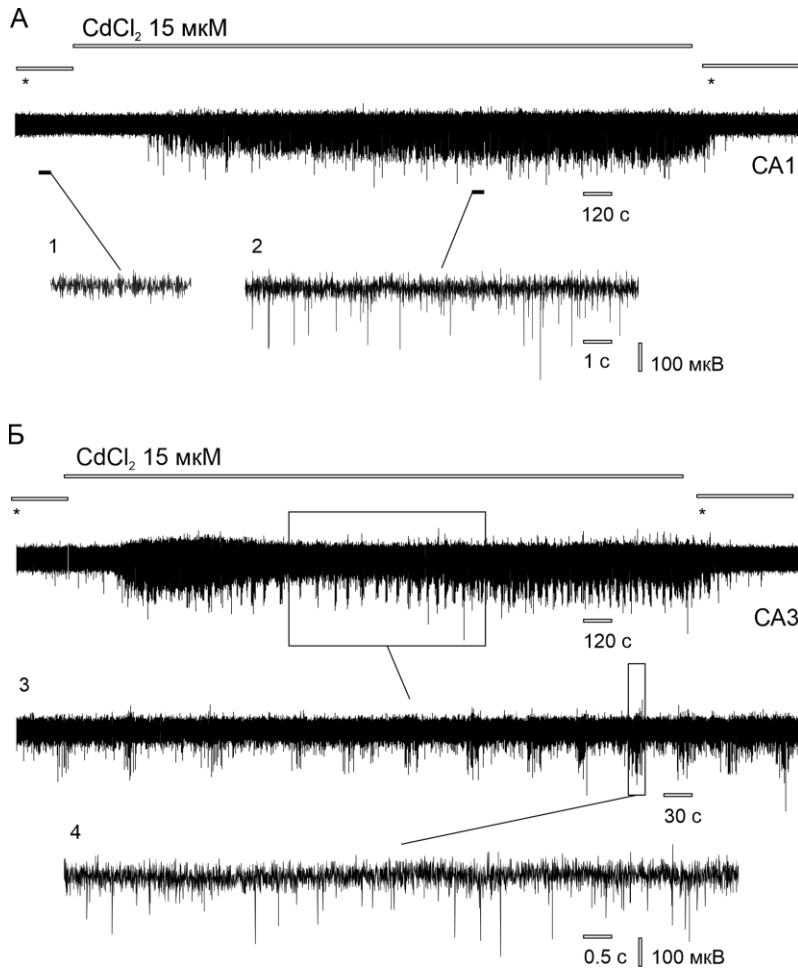


Рис. 3. Полюві потенціали в зонах СА1 (А) та СА3 (Б) під час суперфузії зрізів гіпокампа контрольним (*) та кадмійвмісним розчином. 1) Позаклітинний потенціал в контрольних умовах; 2) несинаптична ЕФА - популяційні спайки. 3) Повторювані сплески ЕФА; 4) популяційні спайки всередині сплеску.

В зоні СА1 середнє значення частоти популяційних спайків складало $0.68 \pm 0.6 \text{ c}^{-1}$ ($n = 13$); а в СА3 – $0.87 \pm 0.76 \text{ c}^{-1}$ ($n = 14, p = 0.47$). Порівняння частоти популяційних спайків в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчині показало, що в обох зонах гіпокампа цей показник в середньому є вищим в низькокальцієвому розчині порівняно з таким у кадмійвмісному

(рис. 4). Так в зоні СА1 середня частота спайків в низькокальцієвому розчині складала $1.48 \pm 1.22 \text{ c}^{-1}$ ($n = 34$), а в кадмійвмісному – $0.68 \pm 0.6 \text{ c}^{-1}$ ($n = 13, p = 0.02$; рис. 4). В зоні СА3 частота спайків в низькокальцієвому розчині складала в середньому $1.79 \pm 1.14 \text{ c}^{-1}$ ($n = 17$), а в кадмійвмісному – $0.87 \pm 0.76 \text{ c}^{-1}$ ($n = 13, p = 0.02$, рис. 4), тобто була втричі вищою.

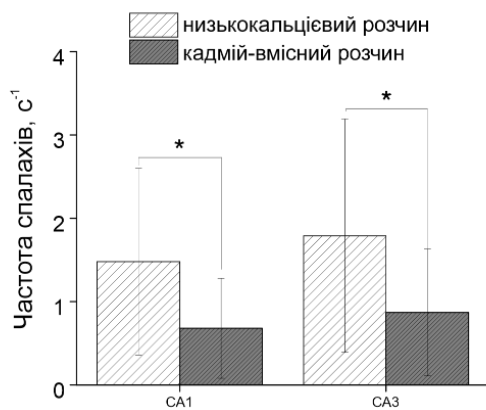


Рис. 4. Діаграма середніх частот популяційних спайків в ділянках СА1 та СА3 під час суперфузії зрізів гіпокампа низькокальцієвим та кадмійвмісним розчинами. При міжгруповому порівнянні $p = 0.02$ та $p = 0.01$ відповідно.

2. ЕФА гіпокампа індукована в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

Під час суперфузії зрізів гіпокампа шСМР, що вміщувала суміш антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів (DNQX 10 мкМ,

МК-801 2.0 мкМ, бікукулін 10 мкМ) ми реєстрували характерну ЕФА в зонах СА3 та СА1 гіпокампа ($n = 25$, рис. 5).

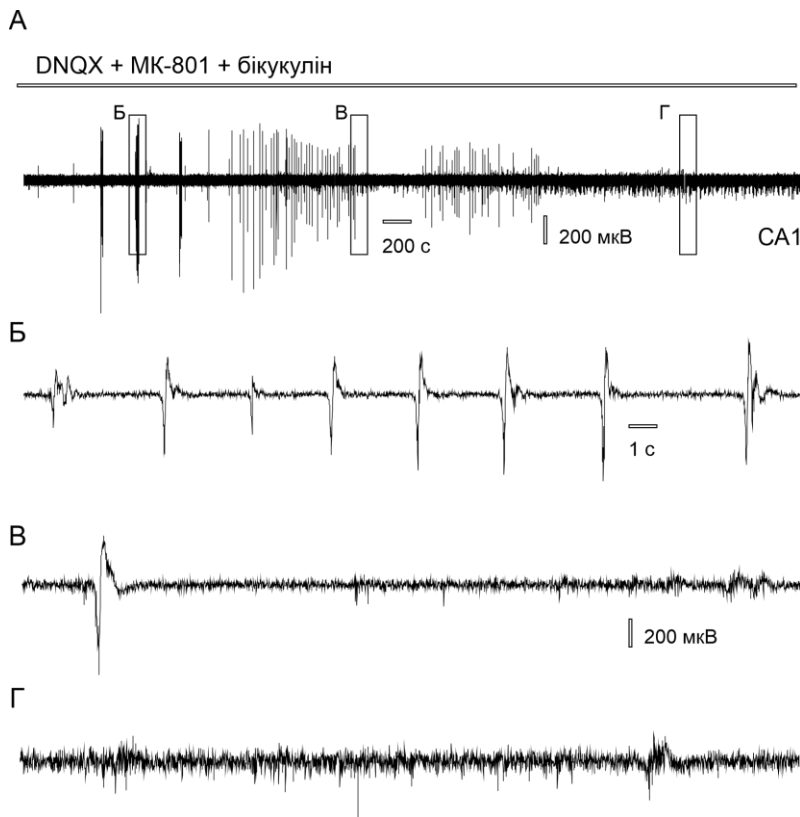


Рис. 5. Електрографічні прояви ЕФА під час часткової блокади синаптичної передачі. А) Польові потенціали в зоні СА1 під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами; Б) сплеск польових розрядів; В) польовий розряд та популяційні спайки; Г) популяційні спайки на тлі пригнічення польових розрядів.

Подібна ЕФА вміщувала електрографічні прояви двох типів, чітко відмінних один від одного. Перший тип ЕФА – популяційні спайки, електрографічно був досить подібний до аналогічних феноменів, зареєстрованих у низькокальцієвому та кадмійвмісному розчинах (рис. 5

Г). Проте, на відміну від того, що спостерігалось в «несинаптичних» умовах, де популяційні спайки були переважним типом ЕФА, в розчині з синаптичними антагоністами основним проявом такої активності були триваліші зміни потенціалу – *польові розряди* (рис. 5 Б, 6 В). Польові розряди являли собою зсуви позаклітинного потенціалу, середня тривалість яких становила 1.07 ± 0.34 с ($n = 100$, зареєстровані в 20 зрізах). Середня частота таких польових розрядів становила 0.04 ± 0.02 с⁻¹ ($n = 20$).

3. Синхронізація ЕФА в зонах СА3–СА1 в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

Основною відмінністю ЕФА, що виникала в умовах суперфузії зрізів розчином з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів була ступінь синхронізації такої активності, відведеної в ділянках СА3 та СА1 (рис. 6).

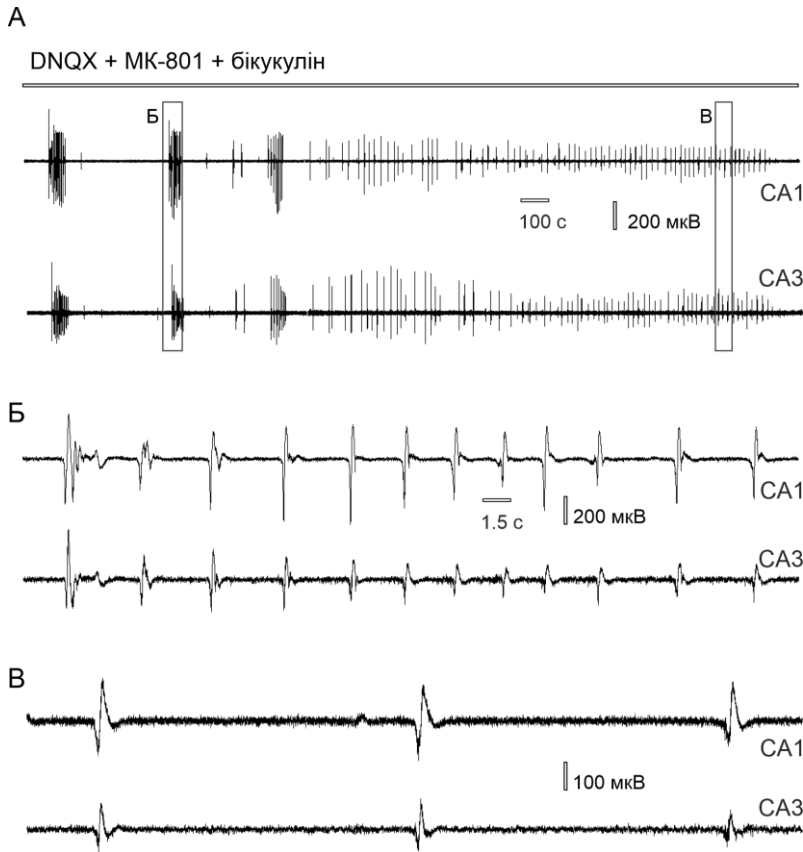


Рис. 6. ЕФА в гіпокампі в умовах часткової блокади синаптичної передачі. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів в ділянках CA1 та CA3 під час суперфузії шСМР з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами; Б) сплеск польових розрядів; В) окремі польові розряди, котрі виникають одночасно в двох зонах гіпокампа.

з таким у низькокальцієвому розчині – 0.05 ± 0.04 ($n = 12, p \leq 0.001$, рис. 7).

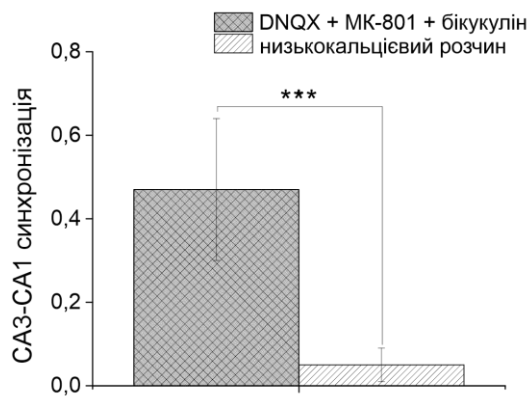


Рис. 7. Усереднені значення коефіцієнтів крос-кореляції проявів ЕФА в зонах CA3 та CA1 в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів та у низькокальцієвому розчині; * – $p < 0.001$.**

4. Вплив кадмію хлориду на епілептиформну активність індуковану в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

Після розвитку в ділянках CA3 та CA1 польових розрядів, що мали сталу амплітуду та частоту впродовж 10–15 хв реєстрації, до розчину шСМР було додано 15 мкМ кадмію хлориду (CdCl_2 , рис. 8). Це призводило до інтенсивного пригнічення польових розрядів у вказаних зонах гіпокампа (рис. 8 В, Г).

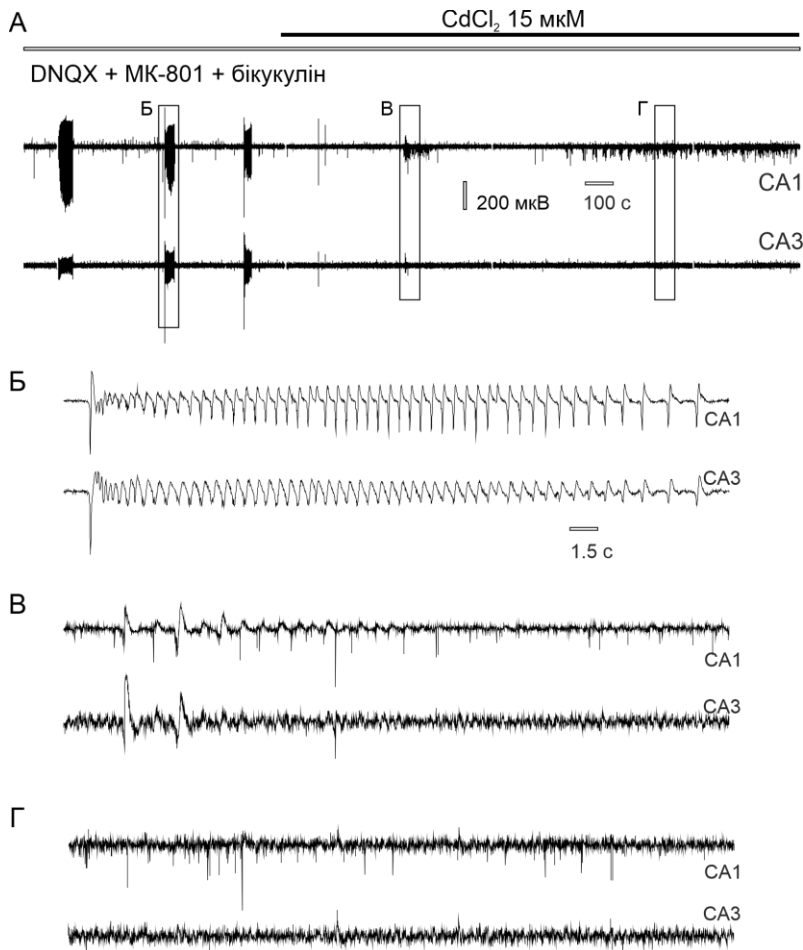


Рис. 8. Вплив кадмію хлориду на ЕФА в гіпокампі в умовах часткової блокади синаптичної передачі. А) Одночасна реєстрація польових потенціалів під час суперфузії шСМР з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами; Б) сплеск польових розрядів в СА3 та СА1; В) пригнічення польових розрядів у СА3–СА1 після аплікації 15 мкМ CdCl₂. Г) Несинаптична ЕФА (популяційні спайки).

Середнє значення тривалості суперфузії кадмійвмісним розчином до моменту пригнічення польових розрядів складало 4.09 ± 2.60 хв ($n = 12$). Після тривалої суперфузії кадмійвмісним розчином з сумішшю синаптичних антагоністів переважним корелятом ЕФА ставали популяційні спайки (рис. 8 Г).

Аплікація кадмію хлориду призводила до істотного пригнічення СА3–СА1-синхронізації ЕФА. Так під час суперфузії препаратів розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило 0.44 ± 0.14 , а після додавання CdCl₂– лише 0.06 ± 0.02 ($n = 22$, $p < 0.001$). Той факт, що кадмію хлорид пригнічує генерацію польових розрядів та СА3–СА1-синхронізацію в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів свідчить, що даний прояв ЕФА не є несинаптичним феноменом, а залежить від активності кальцієвих каналів та наявності якогось іншого виду синаптичної передачі.

5. Вплив механічного відокремлення ділянок зрізу гіпокампа на ЕФА, індуковану в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

Для того, щоб перевірити здатність окремих ділянок гіпокампальної формації до генерації польових розрядів в присутності антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів в наступних експериментах реєстрація ЕФА проводилась спочатку на інтактному зрізі гіпокампа. Потім скальпелем відокремлювали окремі ділянки гіпокампальної формації: зону СА3 від СА1, підставку гіпокампа від СА1, зубчасту звивину від зони СА3 (як показано на рис. 9 А). Відокремлення підставки гіпокампа від зони СА1 не впливало на генерацію польових розрядів в СА3 та СА1 ($n = 3$, рис. 9 В).

Відокремлення ж ділянки CA3 від зони CA1 призводило до припинення польових розрядів в CA1, але не в CA3 ($n = 10$, рис. 9 Г).

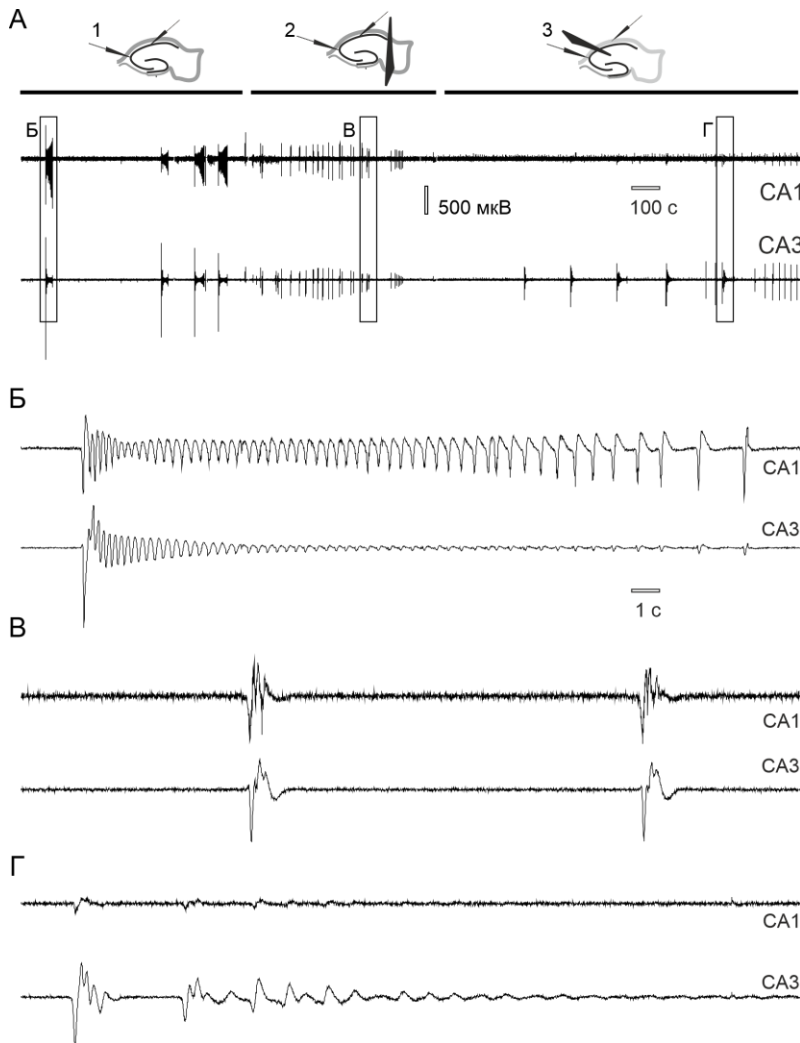


Рис. 9. Вплив механічного відокремлення ділянок зрізу гіпокампа на ЕФА, індуковану в шСМР з АМПА- НМДА- та ГАМК-антагоністами. А) Схематичне зображення розташування електродів в інтактному зрізі гіпокампа (1), після відокремлення підставки гіпокампа (2) та після розрізу між CA3 та CA1 (3) під час одночасної реєстрації польових потенціалів в CA3–CA1 в умовах суперфузії шСМР з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Б) сплеск польових розрядів в контрольних умовах. В) Польові розряди виникають в CA3 та CA1 після відокремлення підставки гіпокампа; Г) пригнічення польових розрядів в CA1, але не в CA3, після розрізу між вказаними зонами гіпокампа.

Відокремлення CA3 від CA1 зумовлювало зменшення CA3–CA1-синхронізації ЕФА. Так, під час суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило 0.51 ± 0.21 , а після відокремлення CA3 від CA1 – лише 0.13 ± 0.07 ($n = 10$, $p < 0.005$).

б. Вплив атропіну на ЕФА, індуковану в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

Атропін є блокатором м-холінорецепторів. В наступних експериментах ми дослідили вплив аплікації 10 мкМ атропіну на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами ($n = 6$). Аплікація атропіну мала вплив досить обмежений статистично невірідний на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА. Так, під час суперфузії зрізів розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-блокаторами середнє значення

коефіцієнта крос-кореляції становило 0.56 ± 0.15 , а після додавання атропіну – 0.38 ± 0.19 ($n = 6$, $p = 0.06$).

7. Вплив тубокурарину на ЕФА, індуковану в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів

Алкалоїд тубокурарин є ефективним антагоністом щодо нікотинових холінорецепторів. В наступних експериментах ми дослідили вплив блокування н-холінорецепторів на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК- антагоністами ($n = 6$). Аплікація 100 мкМ тубокурарину призводила до різкого послаблення СА3–СА1-синхронізації проявів ЕФА. Так, під час суперфузії зрізів розчином із вказаними вище антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило 0.55 ± 0.25 , а після додавання тубокурарину – 0.13 ± 0.05 ($n = 6$, $p = 0.04$, рис. 10).

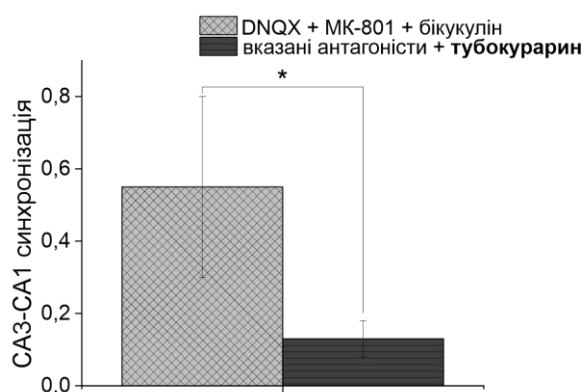


Рис. 10. Вплив аплікації тубокурарину на інтенсивність СА3–СА1-синхронізації ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.

8. Вплив метиллікаконітину та дигідро- β -еритроїдину на ЕФА, індуковану в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами.

В гіпокампі основними підтипами н-холінорецепторів є $\alpha 7$ -, $\alpha 4\beta 2$ - та $\alpha 3\beta 4$ -підтипи. Метиллікаконітин (MLA) є селективним антагоністом $\alpha 7$ -н-холінорецепторів. В наступних експериментах ми дослідили вплив MLA на синхронізацію ЕФА в розчині, котрий містив згадані вище антагоністи ($n = 5$). Аплікація 100 нМ MLA дещо зменшувала ступінь СА3–СА1-синхронізації ЕФА, але ефект не досягав рівня достовірності. Під час суперфузії розчином з синаптичними антагоністами середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило 0.56 ± 0.08 , а після додавання MLA – 0.31 ± 0.18 ($n = 5$, $p = 0.06$).

Дигідро- β -еритроїдин (Dh β E) є помірно селективним блокатором н-холінорецепторів $\alpha 4\beta 2$ -підтипу. В наступних експериментах ми перевірили вплив блокування $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів на синхронізацію ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Аплікація 10 мкМ Dh β E практично не впливала на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА. Так в умовах суперфузії розчином з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів середнє значення коефіцієнта крос-кореляції становило 0.48 ± 0.22 , а після додавання Dh β E – 0.43 ± 0.33 ($n = 4$, $p = 0.85$). Той факт, що аплікація селективних антагоністів $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не має істотного впливу на генерацію та СА3–СА1-синхронізацію ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та

ГАМК-антагоністами вказує на потенційну роль холінорецепторів інших підтипів (можливо, $\alpha 3\beta 4$ -підтипу) в синхронізації нервових мереж гіпокампа.

9. Вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

В наступних експериментах ми дослідили вплив неселективного антагоніста н-холінорецепторів мекаміламіну на ЕФА, індуковану в розчині зі згаданими вище синаптичними блокаторами (рис.11).

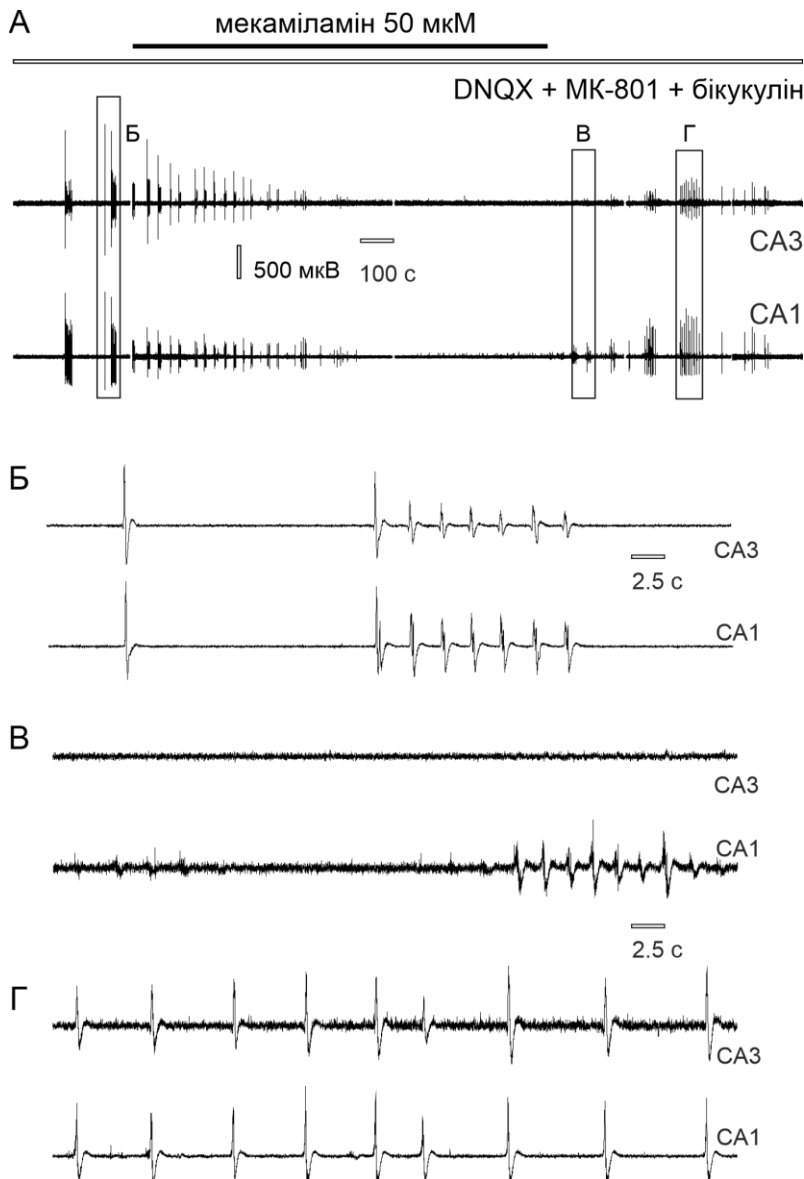


Рис. 11. Вплив аплікації мекаміламіну на ЕФА в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах СА3 та СА1 під час часткової блокади синаптичної передачі; Б) сплеск польових розрядів; В) пригнічення синхронізації активності в областях СА3 та СА1 під час аплікації мекаміламіну. Г) Відновлення польових розрядів після припинення аплікації мекаміламіну.

Аплікація 50 мкМ мекаміламіну призводила до істотного пригнічення генерації польових розрядів в СА3 та СА1 (рис. 11 В) та до вірогідного зменшення СА3–СА1-синхронізації ЕФА. В умовах суперфузії розчином з АМПА-, НМДА- та ГАМК-блокаторами середнє значення коефіцієнту крос-кореляції становило 0.45 ± 0.18 , а після додавання мекаміламіну – 0.10 ± 0.09 ($n = 12, p = 0.002$, рис. 12).

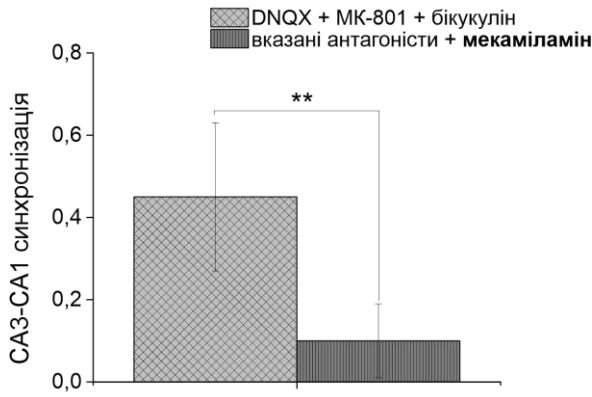


Рис. 12. Вплив мекаміламіну на рівень CA3–CA1-синхронізації ЕФА в розчині з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів.

10. Вплив антагоністів холінергічної передачі на бікукулініндуковану ЕФА в гіпокамні.

Було досліджено вплив аплікації мекаміламіну на частоту, амплітуду та CA3–CA1-синхронізацію ЕФА, індуковану шляхом суперфузії зрізів шСМР з антагоністом ГАМК_A-рецепторів бікукуліном (рис. 13). Додавання в розчин нікотинового антагоністу мекаміламіну призводило до зменшення амплітуди спайків в зонах гіпокампа CA3 та CA1.

рецепторів бікукуліном (рис. 13). Додавання в розчин нікотинового антагоністу мекаміламіну призводило до зменшення амплітуди спайків в зонах гіпокампа CA3 та CA1.

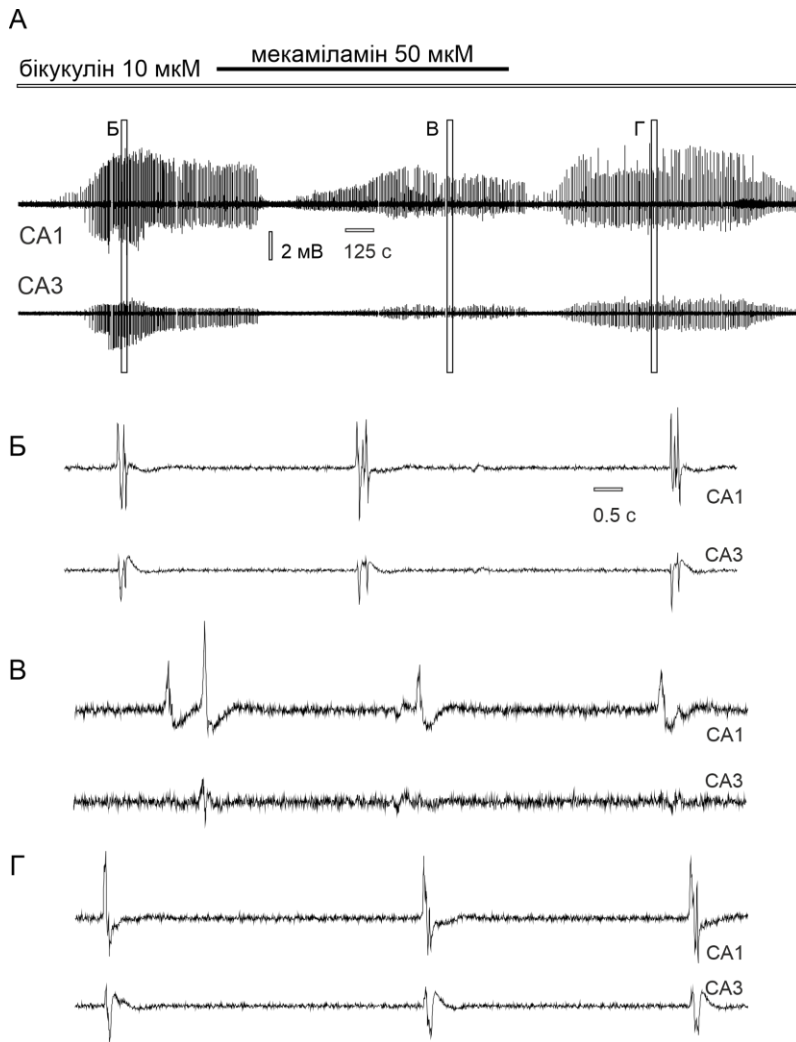


Рис. 13. Вплив мекаміламіну на ЕФА в зрізах гіпокампа в умовах аплікації бікукуліна. А) Одночасна реєстрація ЕФА в зонах CA3 та CA1: Б) епілептиформні явища індуковані бікукуліном. В) пригнічення ЕФА в зоні CA3 під час аплікації мекаміламіну; Г) відновлення ЕФА після припинення аплікації мекаміламіну.

В зоні CA3 середнє значення амплітуди епілептиформних спайків становило 2.04 ± 1.04 мВ, а після аплікації мекаміламіну – 1.61 ± 0.95 мВ ($n = 10, p = 0.002$). В зоні CA1 середнє значення даного параметра в контролі становило 3.45 ± 1.87 мВ, а після аплікації мекаміламіну – 2.19 ± 1.13 мВ ($n = 10, p = 0.003$). Аплікація мекаміламіну практично не впливала на CA3–CA1-синхронізацію ЕФА, індукованої аплікацією бікукуліна. Так, коефіцієнт крос-кореляції

бікукулініндукованої ЕФА в умовах наших експериментів становив 0.50 ± 0.20 , а після

додавання мекаміламіну – 0.57 ± 0.15 ($n = 10, p = 0.11$). Аплікація мекаміламіну також значуще не впливала на частоту бікукулініндукованих епілептиформних подій. Так, частота проявів ЕФА в контролі (для даних експериментів) становила $0.13 \pm 0.07 \text{ c}^{-1}$, а після аплікації мекаміламіну – $0.15 \pm 0.08 \text{ c}^{-1}$ ($n = 10, p = 0.30$).

Аплікація селективних антагоністів $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів (відповідно MLA та Dh β E) не впливала на амплітуду та частоту бікукулініндукованої ЕФА. Наведені результати свідчать про те, що підтипи $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не є критично необхідними в генерації та синхронізації ЕФА індукованої в розчині з антагоністом ГАМК-рецепторів бікукуліном, проте блокування функції н-холінорецепторів мекаміламіном призводить до зменшення амплітуди бікукулініндукованих епілептиформних подій, але не має істотного впливу на СА3–СА1-синхронізацію ЕФА.

12. Вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в низькомагнієвому та 4-амінопіридинвмісному розчині.

В наступних експериментах ми дослідили вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в умовах суперфузії зрізів 4-амінопіридином (4-АП) та низькомагнієвим розчином. Аплікація мекаміламіну не впливала на амплітуду ЕФА, індуковану 4-АП. Так в зоні СА3 амплітуда спайків в контролі становила $3.49 \pm 2.09 \text{ мВ}$, а після додавання в розчин 10 мкМ мекаміламіну – 2.93 ± 1.58 ($n = 5, p = 0.58$). В зоні СА1 відповідний показник у контролі становив 1.47 ± 0.45 , а після додавання мекаміламіну – $1.34 \pm 0.61 \text{ мВ}$ ($n = 5, p = 0.78$). Аплікація мекаміламіну також не змінювала істотно частоти 4-АП-індукованих спайків. Ця величина (частота епілептиформних спайків) в контролі становила в середньому $0.36 \pm 0.06 \text{ c}^{-1}$, а після додавання мекаміламіну – $0.33 \pm 0.07 \text{ c}^{-1}$ ($n = 5, p = 0.58$). Аплікація мекаміламіну також не впливала на ступінь СА3–СА1-синхронізації ЕФА. Протягом суперфузії зрізів розчином з 4-АП коефіцієнт кореляції активності в досліджуваних частинах гіпокампа становив 0.44 ± 0.17 , після аплікації мекаміламіну – 0.43 ± 0.2 ($n = 3, p = 1.0$).

Вплив мекаміламіну на ЕФА індуковану в шСМР з низьким вмістом магнію мав модуляційний характер. Аплікація мекаміламіну в низькомагнієвому розчині не впливала на тривалість сплесків ЕФА ($60.61 \pm 31.98 \text{ с}$ проти $70.24 \pm 46.65 \text{ с}$; $n = 10, p = 0.28$), та призводила до збільшення частоти всередині сплесків ЕФА ($3.39 \pm 1.40 \text{ c}^{-1}$ проти $3.97 \pm 0.99 \text{ c}^{-1}$; $n = 10, p = 0.02$). а також зумовлювала збільшення частоти епілептиформних розрядів: середній інтервал між такими розрядами становив у контролі $6.73 \pm 1.74 \text{ с}$ проти $4.31 \pm 0.54 \text{ с}$ при дії мекаміламіну, ($n = 10, p = 0.001$). Протилежним був ефект мекаміламіну щодо внутрішньорозрядної частоти в низькомагнієвому розчині ($8.20 \pm 1.34 \text{ c}^{-1}$ проти $3.18 \pm 1.26 \text{ c}^{-1}$; $n = 10, p < 0.001$). Рівень синхронізації ЕФА в зонах СА3 та СА1 під час аплікації мекаміламіну не змінювався (0.44 ± 0.17 проти 0.43 ± 0.20 ; $n = 10, p = 0.88$).

Отже, отримані результати свідчать, що вплив мекаміламіну на ЕФА в гіпокампі залежить від способу індукції цієї активності. Так, аплікація мекаміламіну призводила до зменшення амплітуди бікукулініндукованих епілептиформних спайків, але практично не впливала на 4-АП-індуковану ЕФА. Вплив мекаміламіну на ЕФА в низькомагнієвому розчині мав модуляційний характер. Відсутність впливу мекаміламіну на синхронізацію ЕФА в зонах СА3 та СА1, індукованої дією бікукуліна, 4-АП та низькомагнієвого розчину, вказує на значно меншу роль н-холінорецепторів в СА3–СА1-синхронізації ЕФА в умовах інтактності глутаматергічної та ГАМКергічної (тобто і збуджувальної, і гальмівної) синаптичної передачі.

Обговорення. В дисертаційній роботі досліджено ЕФА в свіжоізольованих зрізах гіпокампа щурів, генеровану в умовах повного або часткового блокування синаптичної передачі. Порівняння електрографічних корелятивів ЕФА в низькокальцієвому та кадмійвмісному розчині не виявило суттєвих відмінностей. Основним проявом гіперсинхронної активності нейронів в обох моделях були популяційні спайки – короткотривалі зсуви позаклітинного потенціала. Частота популяційних спайків була більшою в низькокальцієвому середовищі, ніж у кадмійвмісному позаклітинному розчині, причому як у СА3, так і в СА1. Відомо, що, окрім блокування синаптичної передачі, зниження концентрації позаклітинного кальцію істотно впливає на збудливість нейронних мембран. Така зміна (зменшення концентрації кальцію) веде до зменшення екранування поверхневого заряду, а також зменшує кальційактивовану калієву провідність. Ці два механізми, вірогідно, і пояснюють більші значення частоти популяційних спайків в низькокальцієвому розчині (порівняно з тим, що спостерігається в кадмійвмісному середовищі).

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

Епілептиформна активність в зрізах гіпокампа в умовах часткової блокади синаптичної передачі.

В даній роботі часткове блокування синаптичної передачі забезпечувалось шляхом суперфузії зрізів гіпокампа шСМР з додаванням антагоністів АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів. В попередніх дослідження дія позаклітинного середовища з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами розглядалася як альтернативний спосіб індукції ЕФА в несинаптичних умовах, оскільки переважна більшість синаптичних зв'язків у гіпокампі є глутаматергічними та ГАМКергічними. З іншої точки зору, відомо

що позаклітинний розчин з вказаними антагоністами не впливає на вивільнення нейротрансмітерів (на відміну від низькокальцієвої та кадмійвмісної шСМР). ЕФА, індукована в таких умовах, не обов'язково буде наслідком дії несинаптичних механізмів. В нашій роботі позаклітинне середовище з антагоністами АМПА-, НМДА- та ГАМК-рецепторів було обрано, щоб дослідити додаткові механізми синхронізації в гіпокампальній нейронній мережі, які, очевидно, були менш помітними в «класичних» моделях індукції ЕФА.

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

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

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

Сума згаданих фактів (значний рівень синхронізації польових розрядів у зонах СА3 та СА1, пригнічення цієї активності кадмієм та припинення польових розрядів в СА1 після відокремлення від СА3) вказує на наявність додаткового синаптичного механізму, що синхронізує активність вказаних двох ділянок гіпокампа та не пов'язаний з активацією АМПА-, НМДА-, та ГАМК-рецепторів.

Результати нашої роботи показали, що антагоністи нікотинінових ацетилхолінових рецепторів тубокурарин та мекаміламін припиняють СА3–СА1-синхронізацію ЕФА, генеровану в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністів. Додатково показано, що антагоністи $\alpha 7$ - та $\alpha 4$ -холінорецепторів не впливають на вказану синхронізацію.

Саме ці два підтипи холінорецепторів в гіпокампі є найбільш розповсюдженими. Одержані нами результати вказують на можливу помітну роль додаткового типу нікотинових рецепторів ($\alpha 3\beta 4$) в синхронізації ЕФА в ділянках СА3–СА1 гіпокампа; це може частково пояснити впливи мекаміламіну на гіпокампальну функцію та роль нікотинових холінорецепторів в епілептиформній синхронізації активності в цій церебральній структурі.

Ми також дослідили вплив мекаміламіну на ЕФА, індуковану в розчинах з бікукуліном, 4-АП та з низьким вмістом магнію. Аплікація мекаміламіну призводила до зменшення амплітуди ЕФА в розчині з бікукуліном, але не в розчині з 4-АП; вплив мекаміламіну на ЕФА в низькомагнієвому розчині мав різноспрямований характер; так, частота всередині епілептиформних розрядів зменшилась, а частота таких розрядів ЕФА збільшилась під дією мекаміламіну. Цей факт вказує на те, що в залежності від способу індукції ЕФА, н-холінорецептори задіяні різним чином у синхронізацію активності в гіпокампі.

Таким чином, наведені в дисертаційній роботі результати, очевидно, мають певний як фундаментальний, так і практичний інтерес, оскільки вони дозволяють поглибити сучасне розуміння механізмів розвитку ЕФА в гіпокампі та відкривають деякі перспективи у розробці сучасних методів лікування та контролю судомних станів.

ВИСНОВКИ

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

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

**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ,
в яких висвітлені основні результати роботи:**

1. **Zapukhliak O**, Kachanovska V, Isaeva E, Netsyk O, Isaev D. Surface charge impact in nonsynaptic model of epilepsy in rat hippocampus. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2016; 62(2): 35-40. doi: 10.15407/fz62.02.035. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).*
2. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Rasulova O, Isaev D. Modulation of the hippocampal propensity to non-synaptic epileptiform synchronization in low-calcium model of epilepsy. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2016; 62(6): 19–24. PMID: 29762967 *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).*
3. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Isaev D. Synchronization of epileptiform activity between CA1 and CA3 hippocampal fields under synaptic and non-synaptic conditions in rat brain slices. *Medical Science of Ukraine*. 2020; 16(1): 3–7. doi.org/10.32345/2664-4738.1.2020.01 *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).*
4. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Isaev D. Nonsynaptic epileptiform activity in CA3-CA1 regions of the hippocampus in low-Ca²⁺ and Cd²⁺-containing milieu. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2020; 66(2-3): 21–26. doi: 10.15407/fz66.2-3.021. *(Особистий внесок здобувача: статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).*
5. **Zapukhliak O**, Isaev D. Mecamylamine modulates epileptiform discharges in low-Mg²⁺ model of epilepsy. *Fiziolohichnyi zhurnal*. 2021; 67(1): 11–15. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, графічне представлення результатів).*
6. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Romanov A, Maximyuk O, Oz M, Holmes GL, Krishtal O, Isaev D. Mecamylamine inhibits seizure-like activity in CA1-CA3 hippocampus through antagonism to nicotinic receptors. *PLoS One*. 2021; 16(3):e0240074. doi: 10.1371/journal.pone.0240074. PMID: 33711021. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментів, статистична обробка та графічне представлення результатів, оформлення статті).*

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. Romanov A, **Zapukhliak O**, Isaeva E, Krishtal O. Effect of acid-sensing ion channels inhibition in the low magnesium model of epilepsy in the rat hippocampus. VI Міжнародний конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, Україна 2014.
2. **Zapukhliak O**, Netsyk O, Romanov A, Krishtal O, Isaev D. Blockade of ASIC channels leads to inhibition of nonsynaptic seizures in rat hippocampus. VI Міжнародний конгрес Українського товариства нейронаук, Київ, Україна 2014.
3. Netsyk O, **Zapukhliak O**, Romanov A, Isaeva E, Krishtal O, Isaev D. Synchronization of epileptiform activity between CA1 and CA3 rat hippocampus in nonsynaptic models of

epilepsy. Proceedings of the Physiological Society. The Queen Elizabeth II Conference Centre, London, UK, 2014.

АНОТАЦІЯ

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

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

В дисертаційній роботі досліджено характеристики епілептиформної активності в свіжоізолюваних зрізах гіпокампа щурів, що генерується в умовах повного або часткового блокування синаптичної передачі. Повна блокада синаптичної передачі досягалась шляхом суперфузії зрізів гіпокампа розчином штучної спинномозкової рідини із низьким вмістом кальцію або кадмійвмісним розчином. Часткова блокада синаптичної передачі досягалась шляхом суперфузії зрізів гіпокампа розчином з сумішшю АМПА-, НМДА- та ГАМК- антагоністів. Вперше показано високий рівень синхронізації епілептиформної активності між ділянками СА3 та СА1 гіпокампа під час часткового блокування синаптичної передачі; під час повної блокади синаптичної передачі синхронізації між зонами СА3–СА1 не відбувається. Результати роботи вказують на додатковий механізм синхронізації зон СА3–СА1 гіпокампа, котрий не залежить від стану АМПА-, НМДА- та ГАМК-провідностей. Встановлено, що аплікація неспецифічного нікотинового антагоністу мекаміламіну пригнічує епілептиформну активність в гіпокампі, а селективні антагоністи $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не мають статистично вірогідного впливу, вказуючи на можливу роль $\alpha 3\beta 4$ -підтипу н-холінорецепторів в синхронізації активності нейронних мереж гіпокампа. Отримані результати свідчать, що активація н-холінорецепторів сприяє синхронізації епілептиформної активності ділянок СА3 та СА1 гіпокампа, незалежно від стану основних синаптичних систем: АМПА- та НМДА-глутаматних рецепторів та ГАМК-рецепторів.

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

АННОТАЦИЯ

Запухляк О.С. Эпилептиформная активность гиппокампа крыс в условиях полной или частичной блокады синаптической передачи. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – «Физиология человека и животных». – Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2021.

В диссертационной работе исследованы характеристики эпилептиформной активности в свежеизолированных срезах гиппокампа крыс в условиях полной или частичной блокады синаптической передачи. Полная блокада синаптической передачи достигалась путем суперфузии срезов гиппокампа раствором искусственной спинномозговой жидкости с низким содержанием кальция или кадмийсодержащим раствором. Частичная блокада синаптической передачи достигалась путем перфузии срезов мозга раствором с антагонистами АМПА-, НМДА- и ГАМК-рецепторов. Впервые показано высокий уровень синхронизации эпилептиформной активности между участками СА3 и СА1 гиппокампа при частичной блокаде синаптической передачи; при полной блокаде синаптической передачи синхронизация между зонами СА3–СА1 не происходит. Результаты работы указывают на дополнительный механизм синхронизации зон СА3–СА1 гиппокампа в растворе с антагонистами АМПА-, НМДА- и ГАМК-рецепторов. Установлено, что аппликация неспецифического никотинового антагониста мекамиламина подавляет эпилептиформную активность, а селективные антагонисты $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -н-холинорецепторов не имеют статистически значимого влияния, указывая на возможную роль $\alpha 3\beta 4$ -подтипа н-холинорецепторов в синхронизации активности гиппокампа. Полученные результаты указывают, что активация н-холинорецепторов способствует синхронизации эпилептиформной активности участков СА3 и СА1 гиппокампа, независимо от состояния основных синаптических систем: АМПА- и НМДА-глутаматных рецепторов и ГАМК-рецепторов.

SUMMARY

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

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

The dissertation work is devoted to the investigation of the epileptiform activity in the hippocampal rat brain slices under conditions of complete and partial blockade of synaptic transmission. Due to its unique anatomical structure, the hippocampus has a high propensity to reverberate excitation and generate seizure activity. Even during the blockade of synaptic transmission, the hippocampal network is able to generate and maintain synchronized bursting. The aim of this study was to investigate the characteristics of spontaneous epileptiform activity in CA3–CA1 hippocampus during the complete and partial blockade of synaptic transmission and to determine conditions necessary for its induction. Next experimental methods were used: preparation of acute rat brain slices; induction of the epileptiform activity by perfusion of brain

slices with a modified artificial cerebrospinal fluid (aCSF): recording of extracellular electrical potentials in the hippocampal slices. Complete blockade of synaptic transmission was achieved by perfusion of brain slices with low- Ca^{2+} or cadmium-containing aCSF. Because neurotransmitter release from presynaptic terminal is a calcium-dependent process, a decrease in the extracellular calcium concentration (≤ 0.4 mmol) or blockade of calcium channels by cadmium are sufficient conditions to block active synaptic transmission. In present work, a cadmium-containing aCSF was chosen to investigate nonsynaptic epileptiform activity in the presence of calcium in extracellular milieu. Partial blockade of synaptic transmission was achieved by perfusion of hippocampal slices with aCSF containing antagonists of AMPA-, NMDA- and GABA-receptors. Compared with low-calcium and cadmium-containing aCSF, this synaptic-blockers-containing aCSF does not prevent the release of neurotransmitters, which is why this solution was chosen to study hippocampal hypersynchronization that does not depend on glutamatergic and GABA-ergic transmission. Hippocampal epileptiform activity under conditions of complete and partial blockade of synaptic transmission has distinct patterns. Under low-calcium or cadmium-containing conditions epileptiform activity manifests as fast population spikes, while in presence of AMPA-, NMDA- and GABA-antagonists – it is field discharges. Field discharges – are slow and rhythmic shifts of extracellular potential, which were recorded only during partial blockade with AMPA-, NMDA- and GABA-antagonists, while population spikes were recorded under both complete and partial blockade of synaptic transmission. Level of synchronization of epileptiform activity between CA3 and CA1 zones under nonsynaptic conditions was also compared. Obtained results show that during partial blockade of synaptic transmission level of CA3–CA1-synchronization was higher than under conditions of complete blockade. This suggests an additional mechanism of neuronal synchronization in the synaptic-antagonists-aCSF. Application of cadmium blocked CA3–CA1-synchronization of field discharges, indicating on its dependence on the activation of calcium channels and thus the synaptic origin of field discharges. After mechanical cut was made between CA3 and CA1, field discharges disappeared in CA1, but not in CA3. Results show that the CA3 region is capable of generating and transmitting synchronous activity in CA1 independently of glutamatergic and GABAergic transmission. The effect of cholinergic antagonists on the CA3–CA1-synchronization of epileptiform activity in aCSF with AMPA-, NMDA- and GABA-receptor antagonists was also investigated. Application of muscarinic antagonist atropine has no significant effect on CA3–CA1-synchronization of epileptiform activity in synaptic blockers aCSF, while application of nonselective nicotinic antagonists mecamylamine and tubocurarine blocked generation of epileptiform activity and its CA3–CA1-synchronization. These data indicate that activation of nicotinic acetylcholine receptors promotes synchronization of neuronal activity between CA3 and CA1 hippocampus, independently from glutamate AMPA- and NMDA-receptors and GABA-receptors. We found that antagonists of $\alpha 7$ - and $\alpha 4\beta 2$ -receptors – MLA and Dh β E did not prevent CA3–CA1-synchronization, but mecamylamine did. The ineffectiveness of - and $\alpha 4\beta 2$ - antagonists in terminating CA3–CA1-synchronization indicates on a possible role of the $\alpha 3\beta 2$ -nicotinic receptors in CA3–CA1-synchronization in the hippocampus.

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

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

4-АП – 4-амінопіридин

АМПА – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

ГАМК – гамма-аміномасляна кислота

ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр

ЕФА – епілептиформна активність

ЕЕГ – електроенцефалограма

ЕК – енторинальна кора

ЗЗ – зубчаста звивина

МПЕЛ – Міжнародна протиепілептична ліга

НМДА – N-метил-D-аспартат

СА1-3 – cornu ammonis

шСМР – штучна спинномозкова рідина