

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

**РОМАНОВ Артур Костянтинович**

УДК 612.82:576.54:577.3

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

03.00.02 – Біофізика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

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

**Науковий керівник:**

Академік НАН України  
Кришталь Олег Олександрович  
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,  
завідувач фізико-хімічної біології клітинних мембран

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор  
**Жолос Олександр Вікторович**  
ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Тараса Шевченка,  
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики.

Кандидат фіз-мат.наук, професор  
**Каспиржний Антон Володимирович**  
ПЗВО Дніпровський Інститут медицини та громадського здоров'я, доцент,  
кафедра клінічних дисциплін.

Захист відбудеться « 19 » січня 2021 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та на сайті:  
[http://biph.kiev.ua/en/Specialized\\_Scientific\\_Council](http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council).

Автореферат розісланий « 11 » грудня 2020 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої  
вченої ради , к.б.н.

Любанова О.П.

## **ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

### **Актуальність проблеми**

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

Наразі актуальним є дослідження протон-чутливих іонних каналів (ASIC), а саме їх підтипу 1a (ASIC1a), в якості такої мішені. Розуміння ролі цих каналів у фізіологічних та патологічних процесах, що супроводжують перебіг епілепсії, буде слугувати важливим джерелом можливостей для створення інноваційних антиепілептичних препаратів. Літературні джерела демонструють, що перебіг великої кількості неврологічних захворювань супроводжується закисненням зовнішньоклітинного середовища, що в свою чергу призводить до активації ASIC каналів (Xiong et al., 2008). Було показано участь ASIC каналів у патогенезі багатьох неврологічних розладів. Наприклад, в експериментальній моделі аутоімунного енцефаломієліту було продемонстровано зниження рівня аксональної дегенерації у мишей, нокаутних за геном ASIC1a (Vergo et al., 2011). При цьому саме ASIC1a забезпечують сприйняття ушкоджуючих стимулів. Схожий ефект було продемонстровано у моделі гострого болю: фармакологічна блокада ASIC1a амilorидом мала нейропротекторний ефект, захищаючи як астроцити, так і власне нейрони. На основі цього було запропоновано ідею використовувати блокатори ASIC1a для нейро- та мієлопротекції при розсіяному склерозі. Наявні дані вказують на зв'язок між розвитком нейродегенеративних захворювань та епілепсією, зокрема у 10-22% людей з хворобою Альцгеймера спостерігаються епілептичні напади (Bhalla et al., 2011). Було зроблено висновок, що ASIC1a відіграють роль у процесах аксональної нейродегенерації та є перспективною мішенню для розробки фармакологічних засобів для лікування неврологічних захворювань загалом та епілепсії зокрема, але в той же час безпосередня роль ASIC1a у їх патогенезі залишається значною мірою невивченою.

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

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт: «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011 – 2013; номер державної реєстрації – 0110U004750), «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012 – 2016; номер державної реєстрації – 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273).

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

#### **Завдання дослідження**

1. Визначити експериментальні параметри швидкості перфузії та карбогенізації зрізів для досягнення оптимальних умов при дослідженні протон-чутливих каналів.
2. Дослідити ймовірність та характеристики поширення епілептиформної активності у вентральному та дорзальному відділах гіпокампа.
3. З'ясувати ефект фармакологічної блокади ASIC1a на характеристики епілептиформної активності в умовах низько-магнієвої та 4-амінопіридинової моделей індукції епілептиформної активності.
4. Встановити ефект блокування ASIC1a на процес генерації потенціалів дії в пірамідних нейронах гіпокампа.
5. Визначити роль ASIC1a у процесах спонтанної збуджувальної та гальмівної синаптичної активності.

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

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

#### **Наукова новизна**

В роботі вперше досліджено вплив блокування ASIC каналів на роботу гіпокампальних мереж в умовах експериментальних моделей викликані епілептиформної активності з використанням новітнього блокатора ASIC1a каналів сполуки 2-охо-2H-chromene-3-carboxamidine derivative (5b). У роботі вперше було продемонстровано, що вилучення ASIC1a каналів з каскаду синаптичної провідності не має впливу на збуджувальну синаптичну активність, але значно підвищує частотні характеристики гальмівної активності. Вперше продемонстровано, що обумовлене блокуванням ASIC1a зміщення балансу між гальмуванням та збудженням призводить до зменшення загальної збудливості та має протиепілептичний ефект.

#### **Теоретичне та практичне значення роботи**

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

Практична цінність роботи полягає у встановленні впливу ASIC каналів на генерацію спонтанної синаптичної активності у пірамідних нейронах гіпокампа. Цей факт має обов'язково враховуватися при розробці нових стратегій коригування патологічних процесів, пов'язаних зі змінами рівня

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

### **Особистий внесок здобувача**

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

### **Апробація результатів дисертації**

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

### **Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 10 друкованих робіт: 5 статей у міжнародних наукових журналах та 5 тез доповідей на наукових конференціях.

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків та списку використаних джерел (212 найменувань). Робота викладена на 134 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 32 рисунками.

## **Основний зміст роботи**

В розділі **Матеріали та методи дослідження** описані методичні підходи, використані при виконанні роботи. В даній роботі для експериментів використовували щурів лінії Вістар. Усі експериментальні протоколи виконували із дотриманням 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 No 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 р). У дослідженні використовували щурів від 10-ї до 21-ї доби від народження.

**Електрофізіологічні експерименти.** Свіжоізолювані зрізи гіпокампа отримували за методикою, описаною раніше (Ievglevskyi et al., 2016; Vlasiuk et al., 2017). Зрізи перфузували у розчині штучної спинномозкової рідини, яка мала наступний склад (ммоль/л) NaCl 125, KCl 3.5, CaCl<sub>2</sub> 2.0, MgSO<sub>4</sub> 1.3, NaHCO<sub>3</sub> 24, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, глюкоза 11.

У дослідженнях з відведення зовнішноклітинних потенціалів використовували зрізи товщиною 400-500 мкм, а при відведенні потенціалів від клітини – 350 мкм для покращення проникності світла крізь зріз.

Позаклітинне відведення потенціалів здійснювали з використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму A-M Systems 1700 (Sequim, WA, USA) на базі стереоскопічного мікроскопу МБС-10 закріпленого на металевому каркасі з двома трьохосьовими мікроманіпуляторами. Для експериментів з відведення струму та потенціалів від цілої клітини використовувався patch-clamp підсилювач PC-501A (Warner instrument corp., США; смугопропускання 0.1 Гц - 1 кГц; коефіцієнт підсилення 100). Діаметр реєструючого мікроелектрода складав 1-2 мкм, опір при заповненні розчином - 3-5 мОм. Рівень рН розчину у електроді був на рівні 7.3-7.4, а осмолярність - 290-310 мОсм. Обробку отриманих під час дослідів даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Clampfit software 11.0.3 (The Axon™ pCLAMP™ Software Suite). Пошук і аналіз епілептиформних подій здійснювали залежно від типу даних і конфігурації, у якій здійснювали запис електрофізіологічної активності. При автоматичному аналізі, який здійснювали підбором протоколу пошуку подій, отримані результати перевіряли на наявність артефактів і хибно позитивних подій. Епілептоформні явища при відведенні польового потенціалу, спонтанні збуджувальні та гальмівні потенціали у режимі фіксації потенціалу аналізували за частотою, міжінтервальною частотою, амплітудою, та за типом явищ (клонічні, тонічні).

**Статистична обробка результатів дослідження.** Для визначення нормальності розподілу використовували тест Колмогорова-Смірнова. Відповідно до нього, розподіл усіх даних узгоджувався із нормальним. Міжгрупові порівняння здійснювали за допомогою двовибіркового парного або непарного t-тестів Стюдента. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез було встановлено на рівні  $p \leq 0.05$ .

### **Результати дослідження та їх обговорення**

*Визначення параметрів перфузування та оксигенації для дослідження епілептиформної активності у пірамідному шарі нейронів гіпокампа.*

Гострі зрізи гіпокампа є найбільш поширеним інструментом для вивчення епілептиформної активності (ЕА) *in vitro*. Із використанням 4-амінопіридинової (4-АП) моделі епілепсії ми вивчали вплив оксигенації на модуляцію епілептиформних явищ під час експерименту з використанням методу позаклітинного відведення потенціалів.

З літературних джерел відомо, що швидкість перфузії у експериментальній камері може модифікувати характер та параметри відповіді клітин. Тому важливою частиною роботи, що передує проведенню дослідження, є визначення оптимальних експериментальних умов, що будуть найкраще відповідати фізіологічним показникам. Нами було виявлено, що зміна швидкості перфузії у діапазоні від 1 до 5 мл/хв модифікує частотні та амплітудні характеристики індукованої ЕА.

Ми продемонстрували позитивну кореляцію між потужністю ЕА, індукованої 4-АП, і вмістом кисню. При потоку рідини через електрофізіологічну камеру зі швидкістю 1, 2 та 5 мл\хв було зафіксовано середню потужність ЕА на рівні  $97.1 \pm 17.2$  мкВ,  $104.8 \pm 23.7$  мкВ та  $156.1 \pm 28.1$  мкВ ( $n = 10$ , рис. 1.)

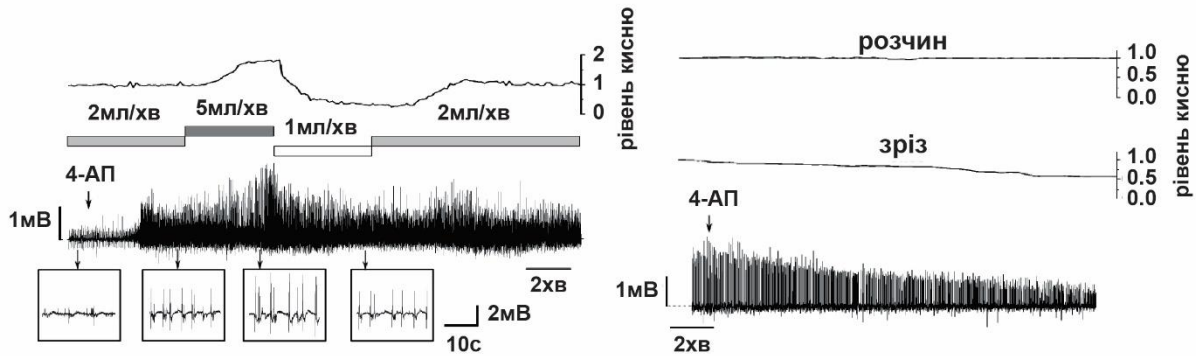


Рис. 1. Вплив зміни швидкості перфузії на викликану 4-АП ЕА у СА1 зоні гіпокампа та результати вимірювання рівня оксигенації за сталих умов у зовнішньому розчині 100-150 мкм над поверхнею та на глибині 100 мкм всередині зрізу. На рисунку зліва зображено приклад активності у залежності від швидкості потоку. Зверху позначена крива кисню, яка фіксувалася електродом розміщеним у середині зрізу на глибині 150 мкм від поверхні.

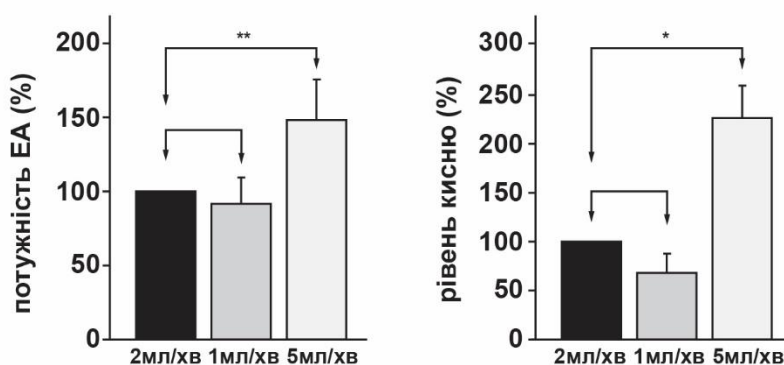


Рис 2. Середній рівень епілептиформної активності та рівні оксигенації залежно від швидкості потоку розчину. Дані нормовані відносно контролю. Дані представлені як середнє  $\pm$  похибка середнього.  $**p < 0.001$ ,  $*p < 0.05$ .

Отримані дані показують, що нормобаричний гіпероксигенований розчин штучної спинномозгової рідини (ACSF) (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> за умови нормального

атмосферному тиску) в умовах швидкості потоку 2 мл/хв забезпечує постійний рівень насичення розчину киснем та підтримує сталий рівень оксигенації у зрізі на глибині 100-150 мкм (рис. 2, 3). Ці результати узгоджуються із попередніми дослідженнями профілю кисню в тканинах зрізу мозку при різних швидкостях перфузії і концентрації кисню під час досліду (Kann et al., 2011; Mulkey et al., 2001).

Ми припускаємо, що вираженість фармакологічно спричиненої ЕА *in vitro* визначається багатьма складовими, які залежать від умов проведення досліду, до яких можна віднести насиченість розчину киснем, швидкість потоку рідини через електрофізіологічну камеру і положення електрода у зрізі.

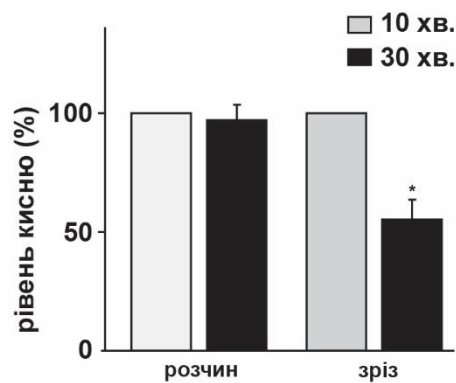


Рис. 3. Вміст кисню у зовнішньо-клітинному розчині та всередині зрізу через 10 та 30 хв після початку ЕА, індукованої додаванням 4-АП до базового розчину ACSF (значення нормовані відносно контролю).

#### Дослідження епілептиформних подій, генерованих у гіпокампі

Скронева епілепсія (СЕ) – найпоширеніший тип епілепсії у дорослих та дітей, основний епілептогенний фокус якої часто зосереджується в гіпокампі. (Di Maio, 2014; T'eliez-Zenteno & Hern'andez-Ronquillo, 2012)

Одним з шляхів лікування фармакологічно-резистентної епілепсії є видалення структури або частини структури, у якій зосереджений такий фокус. Хірургічне видалення гіпокампа призводить до зменшення або повного припинення епілептичних нападів (McNamara, 1994).

Тому розуміння механізмів генерації та поширення епілептоформної активності у гіпокампі має ключове значення для пошуку нових протиепілептичних препаратів.



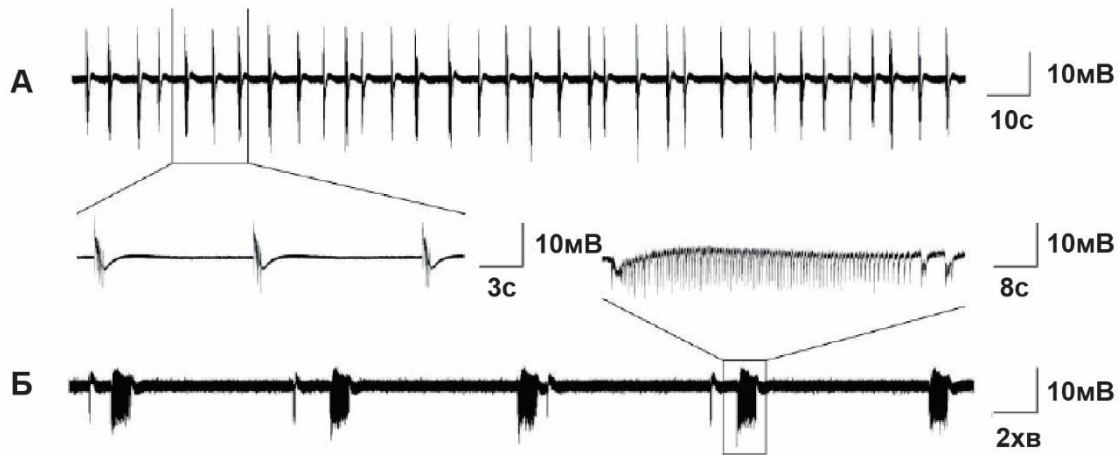


Рис. 4. Репрезентативний запис ЕА, індукованої розчином з низьким вмістом  $Mg^{2+}$  в зрізах вентрального та дорзального гіпокампа. Іктальні події у зрізі вентрального гіпокампа (А) з окремо винесеною частиною запису у розширеному масштабі. Інтеріктальні події, отриманий з зрізу дорзального гіпокампа (Б).

У більшості досліджень, пов'язаних з дослідженням епілепсії та епілептоформних явищ, гіпокамп розглядають як цілісну однорідну структуру, але наразі літературні дані вказують на те, що окремі частини гіпокампа відрізняються як гістологічно, так і функціонально (Barkus et al., 2010; Fanselow & Dong, 2010; C Papatheodoropoulos & Kostopoulos, 2000).

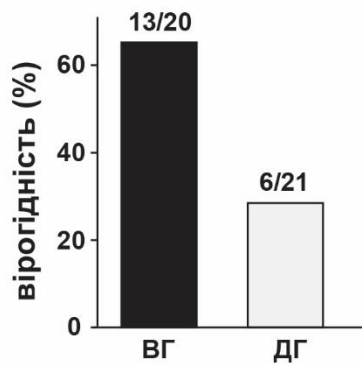


Рис. 5. Вірогідність виникнення ЕА у зрізах вентральної (ВГ) і дорзальної (ДГ) частин гіпокампа.

Відомо, що зрізи з вентральної частини гіпокампа (ВГ) чутливіші до аномальної синхронізації, а зрізи, отримані з дорзальної частини гіпокампа (ДГ) стійкіші до генерації викликаних епілептоформних явищ (Fanselow & Dong, 2010; Geiger et al., 2006; Isaeva et al., 2016; C. Papatheodoropoulos et al., 2005; Costas Papatheodoropoulos et al., 2002).

Така різниця між ВГ і ДГ може бути частково пояснена різницею експресії глутаматних рецепторів у різних частинах даної структури (Pandis et al., 2006). Також відомо, що мозок молодих тварин більш схильний до генерації епілептиформних явищ та розвитку епілептичних нападів у порівнянні з мозком дорослих. Для перевірки різниці характеристик викликаної ЕА в ВГ та ДГ використовували зрізи гіпокампа молодих щурів віком від 12 до 14 днів. Ефект досліджували з використанням базового розчину ACSF, з якого вилучався  $MgCl^{2+}$  (низько-магнієва модель епілептиформної активності), що за літературними даними підвищує збудливість нервових мереж та надає можливість спостерігати ЕА у досліджуваних ділянках мозку. (Fujiwara-Tsukamoto et al., 2006). Польові потенціали ЕА, отримані з пірамідного шару СА1 зони гіпокампа, були використані для порівняння спонтанної епілептиформної активності у ДГ та ВГ. Нами було отримано два патерни ЕА: іктальні (рис. 5. Б) та інтеріктальні (рис. 5. А). Інтеріктальні події мали спонтанний характер зі зміною частоти протягом усього часу перфузування зрізів розчином з низьким вмістом  $Mg^{2+}$ . Іктальні події, в свою чергу, характеризувалися однаковою частотою епілептиформних явищ та часом між їх появою. Аналіз отриманих даних позаклітинного відведення потенціалів від СА1 зони гіпокампа показав, що 65% зрізів ВГ (n=20) генерували ЕА в умовах перфузування розчину з низьким вмістом  $Mg^{2+}$ , а зрізи ДГ (n=21) - 28%. Водночас, аналіз частоти ЕА показав, що іктальні явища мали частоту від 4 до 10 Гц, а сплески активності фіксувалися кожні 2-8 хвилин без істотної різниці між зрізами ДГ та ВГ. У свою чергу інтеріктальні події фіксувалися з частотою від 0.01 до 0.09 Гц в обох типах зрізів.

Отримані дані свідчать про те, що ВГ генерує іктальні епілептиформні явища більшої частоти (90%) порівняно з ДГ (50%). Ми не знайшли значущої різниці у частоті інтеріктальних явищ між ДГ (66%) та ВГ (60%).

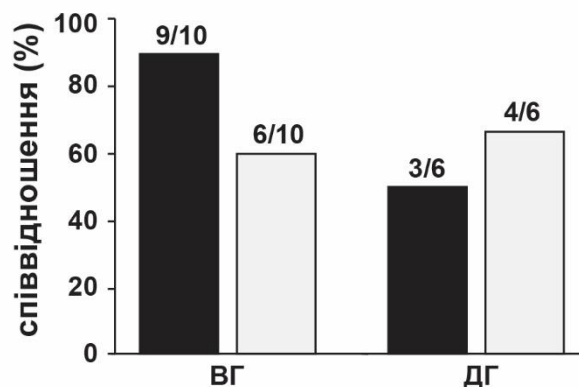


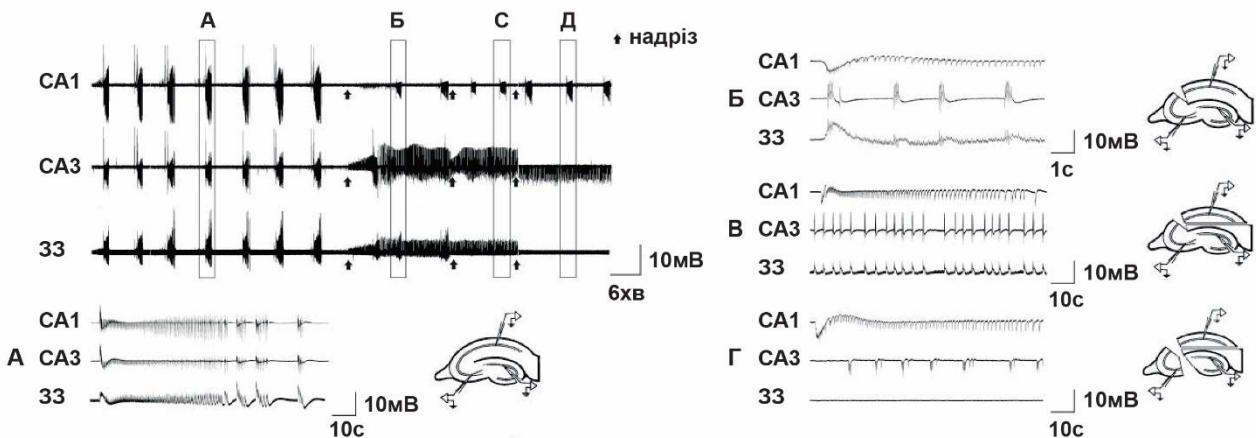
Рис. 6. Співвідношення ймовірності виникнення іктальних (чорний) та інтеріктальних (сірий) патернів у дослідях з дорзальними та вентральними зрізами гіпокампа.

Отримані дані свідчать про те, що ВГ є більш вразливим до генерації епілептоформних явищ порівняно з ДГ. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, проведеними на дорослих тваринах (Isaeva et al., 2016). Також

ВГ має більш високі показники індукції іктальних явищ порівняно з ДГ (рис. 6). Ця різниця може бути частково пояснена різницею у співвідношенні субодиниць NR2A і NR2B НМДА рецепторів у цих частинах гіпокампа (Pandis et al., 2006). У ДГ переважає NR2A субодиниця, яка, за літературними даними, відповідає за генерацію довготривалої потенціації (ДП) та відіграє центральну роль при консолідації пам'яті гіпокампом. В той же час, у неонатальний період переважає NR2B субодиниця. Відомо, що у незрілому мозку співвідношення субодиниць НМДА рецепторів збільшується у порівнянні з дорослими щурами (Monyer et al., 1994). Ми вважаємо, що ця різниця в експресії НМДА рецепторів може хоча б частково пояснити збільшену вірогідність виклику епілептоформних явищ у гіпокампі молодих тварин. До інших факторів можна віднести підвищену експресію АМРА-рецепторів і недостатній розвиток гальмівної синаптичної системи.

*Дослідження генерації іктальних та інтеріктальних явищ у СА3, СА1 та DG зонах вентральної частини гіпокампа*

В інтактних зрізах, занурених у базовий розчин з низьким вмістом  $Mg^{2+}$ , іктальні події спостерігалися одночасно в СА1 та СА3 зонах. Однак, нами було показано, що розрізання провідних шляхів, які зв'язують передачу сигналу від СА3 до СА1 ділянок, призводило до того, що ці зони продукують різні патерни активності у кожній з них.



*Рис. 7. Ефект перерізання провідних шляхів у ВГ на поширення ЕА. Зверху показано приклад позаклітинного відведення ЕА з зон СА1, СА3 та зубчастої звивини, стрілками позначено час, коли робився надріз. (А) Репрезентативний запис активності, індукованої вилученням  $MgCl_2$ . (В) Перерізання колатералей Шаффера у зоні СА2. (С) Відокремлення зони СА1 шляхом горизонтального розрізу від першого місця надрізу. (Г) Відокремлення зубчастої звивини.*

Зважаючи на отримані дані, можна зробити висновок, що іктальні події починаються у зоні СА1 та поширюється на СА3 та зубчасту звивину (33), тоді як інтеріктальні беруть свій початок у зоні СА3 і переходять в DG (рис. 7).

Схожий результат був продемонстрований на щурах віком 22-32 дні (Lewis et al., 1990; Vlasiuk et al., 2017). Водночас, механізми генерації епілептиформної активності в різних зонах гіпокампа молодих щурів залишаються не до кінця визначеними та потребують подальших досліджень.

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

Роль протон-чутливих іонних каналів в генерації та припиненні епілептичних нападів наразі суперечлива.

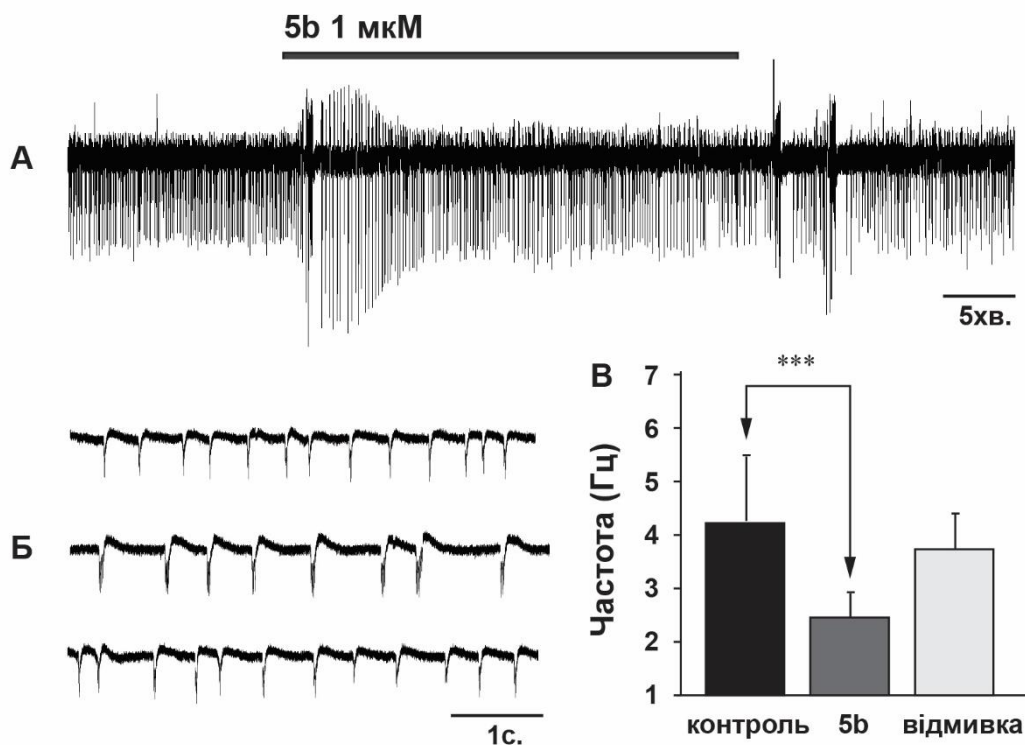


Рис. 8. Репрезентативний запис ЕА, індукованої розчином з низьким вмістом  $Mg^{2+}$  в СА1 зоні гіпокампа, при дії сполуки 5b (А), винесені фрагменти запису у у контролі, при дії 5b та поверненні до базового розчину ACSF (Б), показано різницю частотних характеристик епілептиформної активності (В).

Деякі дослідження вказують на те, що продукування судом може здійснюватися завдяки інтенсивному файрингу нейронів, що в свою чергу призводить до підкислення міжклітинного середовища і, як наслідок, активації ASIC каналів (Lipka & Bülow, 2003). У дослідях зі зрізами мозку мишей, нокаутуваних за геном ASIC1a, було продемонстровано знижену чутливість до ЕА, індукованої вилученням магнію з базового розчину ACSF.

Для визначення ролі ASIC в генерації епілептиформних явищ у гіпокампі *in vitro* використовували модель з вилученням  $Mg^{2+}$  з базового розчину ACSF та 4-амінопіридинової (4-АП) моделі індукції ЕА. У дослідях використовували горизонтальні зрізи мозку щурів (10-12 днів з дати народження). Видалення

$Mg^{2+}$  призводило до появи ЕА у СА1 зоні гіпокампа через 20-40 хв після заміни базового розчину. Після 30 хв запису ЕА у випадку, якщо частотні та амплітудні характеристики активності залишалися сталими, до розчину додавався блокатор ASIC каналів 5b у концентрації 1мМ.

Унаслідок дії блокатора нами було зафіксовано достовірне зниження як частотних, так і амплітудних характеристик ЕА ( $2.18 \pm 0.3$  Гц під дією блокатора,  $4.12 \pm 1.1$  Гц у контрольній частині,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ , рис. 8.). Після 20-40 хв запису ЕА система подачі розчину перемикалась на проепілептичний розчин без додавання блокатора 5b для запису «відмивки» протягом 30 хв.

*Блокування ASIC в умовах 4-АП моделі індукції епілептиформної активності*

У випадку 4-АП моделі індукції ЕА, електрографічні кореляти ЕА спостерігали через 3-5 хв після додавання блокатора ASIC до базового розчину ACSF. Після додавання блокатора ASIC каналів, як і у експериментах з низькомагнієвою моделлю індукції ЕА, ми отримали достовірне зниження як частотних, так і амплітудних характеристик ЕА ( $3.14 \pm 0.5$  Гц під дією блокатора,  $5.42 \pm 0.8$  Гц у контрольній частині,  $p < 0.001$ ,  $n = 9$ , рис. 9).

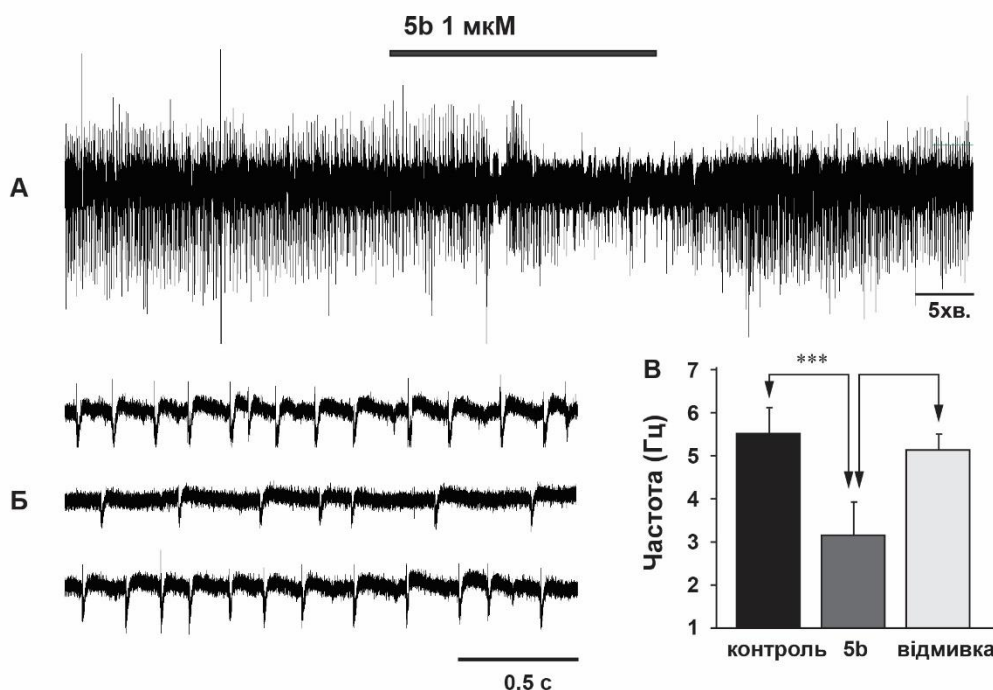


Рис. 9. Репрезентативний запис ЕА, індукованої додаванням 4-АП до розчину ACSF, в СА1 зоні гіпокампа. Зверху наведено частину запису у розширеному масштабі (А), наведено приклади відповідної активності у контролі, при додаванні 5b та після повернення до базового розчину ACSF (Б), показано різницю частотних характеристик епілептиформної активності (В).

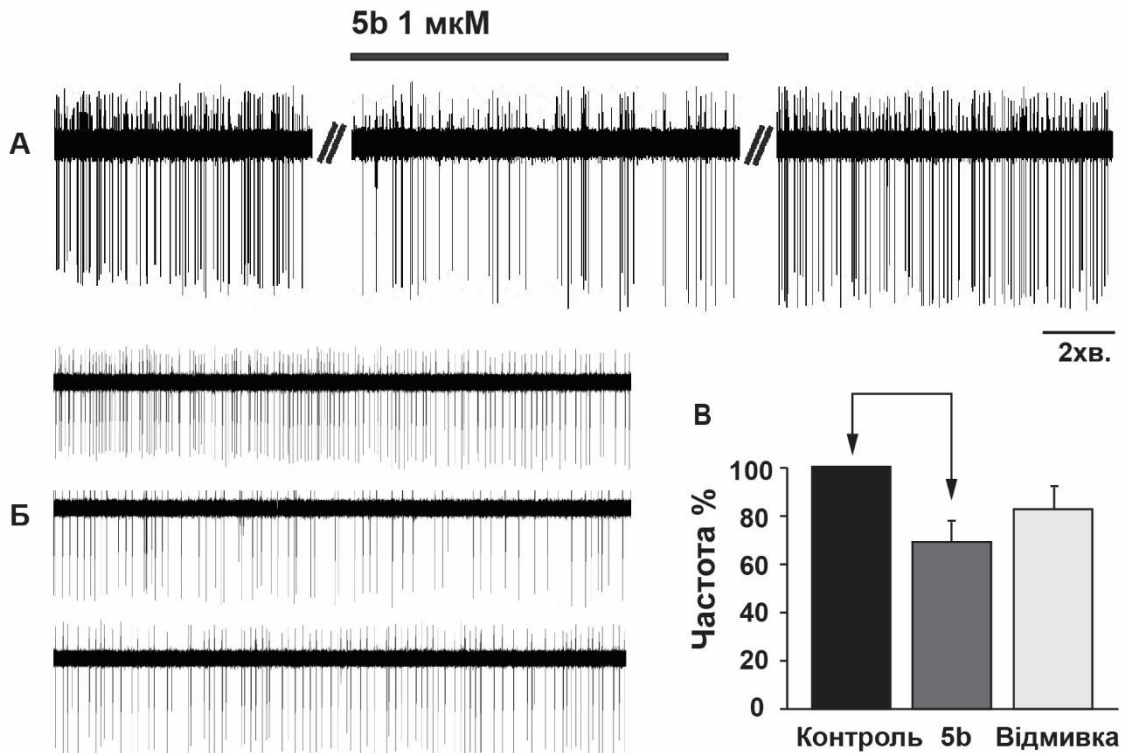
У деяких випадках після додавання блокатора ми спостерігали часткову зміну патерну ЕА у дослідях з 4-АП індукованими епілептоформними

нападами: після вилучення блокатора EA частково поверталася до початкового стану.

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

Для дослідження ролі ASIC у генерації потенціалів дії ми використовували метод фіксації мембранного струму у конфігурації «cell attached». Для проведення цієї серії експериментів клітини обиралися випадковим чином з пірамідного шару зони CA1 гіпокампа. Після отримання сталого контакту між клітиною та мікроелектодом, запис здійснювався у режимі реєстрації потенціалу з нульовою підтримкою.

Ефект блокади ASIC каналів перевіряли після отримання сталої частоти генерації потенціалів дії нейронів протягом 20 хв. Було виявлено, що внаслідок блокування роботи ASIC каналів, частота генерації потенціалів дії знижувалася до  $68 \pm 11\%$  від контрольного рівня ( $n = 11$ ,  $P < 0.05$ , рис. 10).

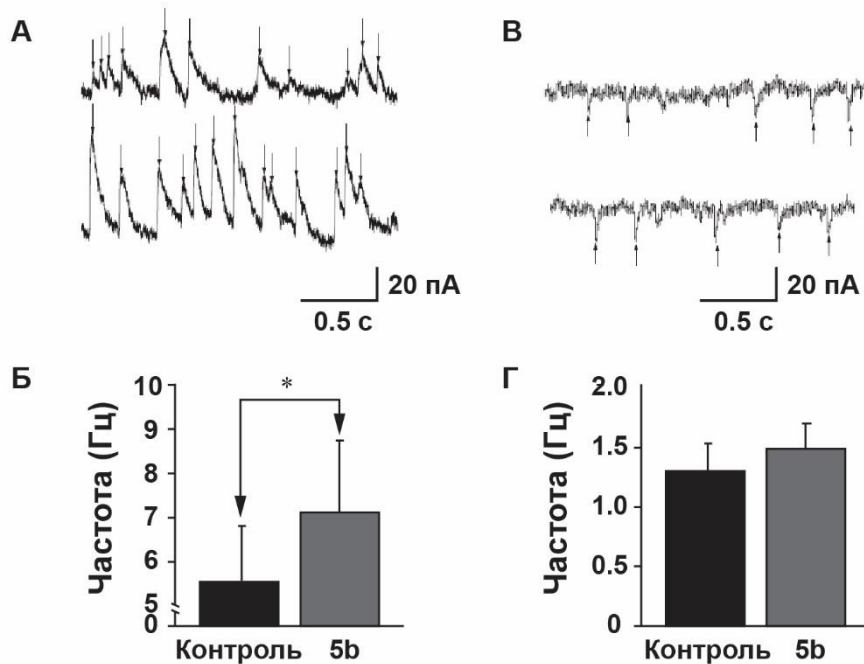


*Рис. 10. Вплив блокатора протон чутливих іонних каналів 5b на генерацію потенціалів дії у пірамідних нейронах гіпокампа зони CA1. Репрезентативний запис (A). Знизу наведено приклади запису у розширеному масштабі у контролі, при додаванні 5b та після повернення до базового розчину ACSF (B). Частота виникнення потенціалів дії (C).*

При зміні зовнішньо-клітинного розчину на розчин без вмісту блокатора, частота генерації потенціалів дії нейронів частково підвищувалась, але не поверталася до контрольного рівня.

*Визначення ролі ASIC у генерації спонтанної збуджуючої та гальмівної синаптичної активності нейронів гіпокампа*

Виходячи з отриманих результатів, наступним кроком нашого дослідження була спроба з'ясувати безпосередні механізми впливу ASIC каналів на ЕА. У наступних експериментах ми використовували методику фіксацію струму та потенціалу у конфігурації щільного контакту між скляним електродом і цілою клітиною у зоні CA1 гіпокампа.



*Рис. 11. Ефект блокування ASIC на збуджувальну (B, Г) та гальмівну (A, Б) постсинаптичну активність нейронів гіпокампа. Верхня крива - запис до аплікації блокатора, знизу на фоні його дії. Одиначна активність позначена стрілкою. \*  $P < 0.05$ .*

Після встановлення контакту між клітиною та підсилювачем до розчину ACSF додавався блокатор ASIC у концентрації 1мМ. Фармакологічна блокада ASIC *in vitro* не призводила до зміни частоти генерації спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (сЗПС, рис. 11). Частота генерації сЗПС складала  $1.45 \pm 0.25$  Гц в контрольних умовах ( $n = 4$ ) та  $1.50 \pm 0.29$  Гц з додаванням блокатора ( $n = 4$ ).

Протилежний вищенаведеному результат спостерігався у випадку вимірювання частотних характеристик гальмівної постсинаптичної активності. Блокування ASIC значною мірою підвищувало частоту гальмівних постсинаптичних струмів (ГПС) пірамідних нейронів гіпокампа. Під дією блокатора частота ГПС підвищувалась з  $5.6 \pm 1.3$  Гц. до  $7.2 \pm 1.6$  Гц ( $n = 9$ ,  $p < 0.05$ , рис. 11). Також блокада ASIC не впливала на амплітудну характеристику спостережених явищ. Для того, щоб підтвердити ефект

підвищення частоти ГПС саме внаслідок блокади ASIC каналів, а не часткового блокування НМДА-рецепторів, ми провели додаткові досліді з додаванням 10 мкМ D-(2)-2-amino-5-phosphopentanoic acid (D-APV), антагоніста НМДА-рецепторів перед аплікацією блокатора ASIC (рис. 14).

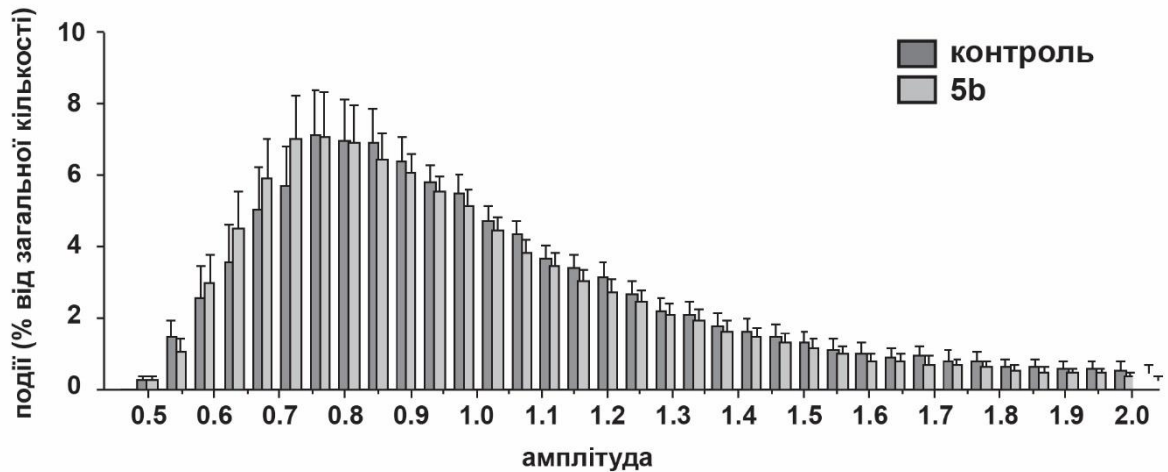


Рис. 12. Вплив блокади ASIC1a на усереднений розподіл амплітуд ГПС. У колонках представлено середні амплітуди, нормалізовані щодо контролю.

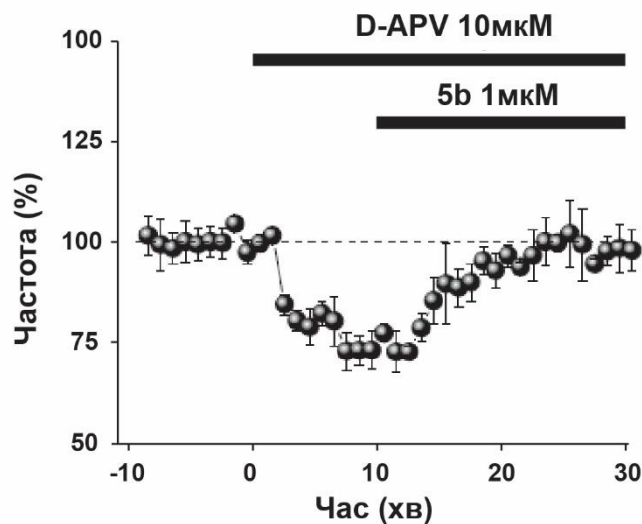


Рис. 13. Вплив блокади ASIC1a на частоту виникнення ГПС після блокування НМДА-рецепторів. Дані нормовані відносно контролю. Зверху позначено момент аплікації блокаторів.

Отримані результати свідчать про те, що блокування НМДА-рецепторів знижувало базову частоту ГПС до 81.5% від контрольного рівня ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ).



Однак додавання блокатора ASIC підвищувало частоту до  $95 \pm 8\%$  від базового рівня, що вимірювався до аплікації блокатора НМДА-рецепторів. Це свідчить про те, що ефект підвищення частоти ГПС не є НМДА-залежним.

### Висновки

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

1. Показано позитивну лінійну кореляцію між потужністю індукованої 4-амінопіридином епілептиформної активності, вмістом кисню і швидкістю перфузії зрізів. Отримані результати дають змогу стверджувати, що спосіб постачання кисню до тканин зрізів мозку може модулювати *in vitro* нейронну мережеву збудливість.

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

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

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

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

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙ РОБІТ

### В яких опубліковані основні результати роботи:

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

### Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. M. Semenikhina, **A. Romanov**, M. Fedoriuk, M. Stefanenko, D. Isaev, O Isaeva, O. Maximyuk, and O. Krishtal Regulation of spontaneous synaptic activity in the lateral amygdala by acid-sensing ion channels, 100 Years of microglia symposium, Lausanne, Switzerland, 2019
2. M. Semenikhina, **A. Romanov**, M. Fedoriuk, M. Stefanenko, D. Isaev, O. Maximyuk, and O. Krishtal Acid-sensing ion channels regulate spontaneous activity in the amygdala. VIII annual meeting of Ukrainian Biophysical Society, Kiyv, Ukraine, 2019
3. Netsyk O., Zapukhliak O., **Romanov A.**, Isaeva E., Krishtal O., Isaev D Synchronization of epileptiform activity between CA1 and CA3 rat hippocampus in nonsynaptic models of epilepsy. The Queen Elizabeth II Conference Centre, London, UK Physiology 2014
4. **Romanov A.**, Kondratskaya E., Isaev D., Krishtal O ASIC currents in mouse amygdala neurons Міжнародна наукова конференція, «Механізми функціонування фізіологічних систем» Львівський Національний Університет імені Івава Франка, Львів, 15 – 17 жовтня 2014 р.
5. **Romanov A**, Zapukhliak O., Isaeva E, Krishtal O. Effect of acid-sensing ion channels inhibition in the low magnesium model of epilepsy in the rat hippocampus. VI Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience, Kiev, June 4-8, 2014

## АНОТАЦІЯ

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

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

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

В роботі вперше досліджено вплив блокування ASIC каналів у *in-vitro* моделях епілептиформної активності з використанням новітнього селективного блокатора ASIC1a каналів 5b. У роботі визначено оптимальні умови перфузування та карбогенізації зрізів мозку, що є критично важливим для проведення достовірних досліджень. Показано, що зміна швидкості перфузії та рівня оксигенації зрізів модифікує потужність викликаної епілептиформної активності. Вперше показано функціональні відмінності розвитку епілептиформної активності в вентральній та дорзальній частинах гіпокампа. У роботі вперше продемонстровано, що блокада ASIC1a в умовах низько-магнієвої та 4-АП моделей індукції епілептиформної активності призводить до зниження частотних характеристик епілептиформної активності та знижує частоту спонтанної генерації потенціалів дії у гіпокампі. Також було досліджено можливі механізми, які опосередковують вищезазначені зміни. У роботі вперше було продемонстровано, що вилучення ASIC каналів з каскаду синаптичної провідності не має впливу на збуджуючу синаптичну активність, в той же час достовірно підвищуючи частотні характеристики гальмівної активності, таким чином зміщення балансу між гальмуванням та збудженням внаслідок блокади ASIC1a призводить до зменшення загальної збудливості та має протиепілептичний ефект.

Підсумовуючи отримані результати, можна сказати, що дана робота підтверджує ідею пресинаптичного впливу ASIC каналів на ймовірність активації ГАМК рецепторів, з огляду на те, що блокада ASIC1a не впливає на амплітудні характеристики збуджуючих постсинаптичних струмів. Використовуючи новітній селективний блокатор ASIC1a, у роботі продемонстровано роль цих каналів у регуляції гальмівної синаптичної активності у ЦНС та їх важливість як мішені для майбутніх протиепілептичних препаратів.

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

## АННОТАЦИЯ

**Романов А.К. Роль протон-чувствительных ионных каналов в модуляции активности нейронных сетей гиппокампа крыс в норме и в условиях патологической синхронизации.** – Рукопись

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

Диссертация посвящена исследованию роли протон-чувствительных ионных каналов (ASIC) в модуляции нейронных сетей гиппокампа крыс в физиологических условиях и в условиях вызванной эпилептиформной активности сетей гиппокампа.

Изучение роли ASIC1a каналов в модуляции эпилептиформной активности позволяет понять механизмы развития и распространенияпадений в структурах гиппокампа как одного из главных фокусов эпилептической активности. Это исследование дает более глубокое понимание клеточных механизмов работы ASIC каналов во время эпилептических припадков, подтверждая их роль в системе синаптической проводимости.

Практическая ценность работы заключается в установлении влияния ASIC каналов на генерацию спонтанной синаптической активности в пирамидных нейронах гиппокампа. Этот факт должен обязательно учитываться при разработке новых стратегий и приемов в работе с патологическими процессами, которые связаны с изменениями уровня внеклеточного pH. Также, установление роли ASIC в проэпилептических системах может быть использовано в разработке противоэпилептических препаратов.

В работе впервые исследовано влияние блокады ASIC каналов в *in vitro* моделях вызванной эпилептиформной активности с использованием новейшего селективного блокатора ASIC1a каналов 5b. В работе определены оптимальные условия перфузии и карбогенизации срезов мозга, что является критически важным для проведения достоверных исследований. Показано, что изменение скорости перфузии и уровня оксигенации срезов модифицирует мощность вызванной эпилептиформной активности.

Впервые показаны функциональные отличия развития эпилептиформной активности в вентральной и дорзальной частях гиппокампа. В работе впервые показано, что блокада ASIC1a в условиях низко-магниевой и 4-аминопиридиновой моделей индукции эпилептиформной активности приводит к снижению частотных характеристик эпилептиформной активности и снижает частоту спонтанной генерации потенциалов действия в гиппокампе.

Также были исследованы возможные механизмы, которые опосредствуют вышеназванные изменения.

В работе впервые было продемонстрировано, что изъятие ASIC каналов из каскада синаптической проводимости не влияет на возбуждающую синаптическую активность, в то же время достоверно повышая частотные характеристики тормозной активности, таким образом смещение баланса между

торможением и возбуждением в результате блокады ASIC1a приводит к уменьшению общей возбудимости и имеет противоэпилептический эффект.

Суммируя полученные результаты, можно сказать, что данная работа подтверждает идею пресинаптического влияния ASIC каналов на вероятность активации ГАМК рецепторов, учитывая то, что блокада ASIC1a не влияет на амплитудные характеристики возбуждающих постсинаптических токов. Используя новейший селективный блокатор ASIC1a, в работе продемонстрирована роль этих каналов в регуляции тормозной синаптической активности в ЦНС и их важность как мишени для создания противоэпилептических препаратов.

**Ключевые слова:** гиппокамп, эпилептиформная активность, протон-чувствительные ионные каналы, ASIC, спонтанная тормозная активность, спонтанная возбуждающая активность, синаптическая проводимость

### SUMMARY

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

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

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

We studied for the first time the effect of ASIC channel blocking in epileptic models of the hippocampus using the latest selective ASIC1a channel blocker 5b. We determine the optimal conditions for perfusion and the carbogenization of the brain slices, which is critical for reliable research. Here we show that perfusion rate and the level of slices' oxygenation modifies the power of the induced epileptiform activity. For the first time, we show functional differences in the development of epileptiform activity in the ventral and dorsal parts of the hippocampus. We studied that ASIC1a blockade using low-magnesium and 4-ap models of epileptiform activity induction leads to a decrease in the frequency characteristics of epileptiform activity and reduces the frequency of spontaneous generation of action potentials in the hippocampus. Possible mechanisms that mediate the above changes also have been investigated.

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

Summarizing the results, we can say that this work confirms the idea of the presynaptic effect of ASIC channels on the probability of activation of GABA receptors, given that the blockade of ASIC1a does not affect the amplitude characteristics of excitatory postsynaptic currents. Using the latest selective ASIC1a blocker, we

demonstrate the role of these channels in the regulation of inhibitory synaptic activity in the central nervous system and their importance as targets for future antiepileptic drugs.

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

### СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

<b>ACSF</b>	–	штучна спинно-мозкова рідина
<b>ASIC</b>	–	протон-чутливі іонні канали
<b>ASIC1a</b>	–	1a субодиниця протон-чутливих іонних каналів
<b>AMPA</b>	–	$\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
<b>ГАМК</b>	–	$\gamma$ -аміномасляна кислота
<b>НМДА</b>	–	N-метил-D-аспартат
<b>ЦНС</b>	–	центральна нервова система
<b>ПД</b>	–	потенціал дії
<b>4-АП</b>	–	4-амінопіридин
<b>ЕА</b>	–	епілептиформна активність
<b>ЦНС</b>	–	центральна нервова система
<b>ВГ</b>	–	вентральна частина гіпокампа
<b>ДГ</b>	–	дорзальна частина гіпокампа
<b>сЗПС</b>	–	спонтанний збуджуючий постсинаптичний потенціал
<b>ГПС</b>	–	гальмівні постсинаптичні струми
<b>D-APV</b>	–	D-(2)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid
<b>ЗПСП</b>	–	збуджуючий постсинаптичний потенціал