

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

Кваліфікаційна наукова праця на
правах рукопису

БОГОВИК РУСЛАН ІГОРОВИЧ

УДК 616.8-009.24:616.8:616.831:599.23

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.02 – біофізика

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Боговик Р.І.

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

Київ 2020

АНОТАЦІЯ

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

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

В дисертаційній роботі викладені результати досліджень з визначення впливу протеазаактивованих рецепторів типу 1 (ПАР1) на зміни локальних потенціалів у гіпокампі під час розвитку епілептичного статусу (ЕС) та на поведінкові реакції під час латентного і хронічного періоду розвитку епілепсії у дорослих щурів.

Запис електрофізіологічних сигналів з експериментальних тварин які вільно рухаються, є важливим підходом до вивчення фізіологічних параметрів (наприклад, артеріального тиску, серцебиття, температури тіла, мозкової активності) у відносно природних умовах. Бездротові, так звані телеметричні системи запису, максимально зручні для експериментальної тварини, в багатьох аспектах мають більше переваг порівняно зі класичними дротовими пристроями запису (Lapray et al., 2008). Нами була розроблена чотирьох-канальна бездротова система для реєстрації електрофізіологічних потенціалів. Вона побудована на базі новітніх електронних компонентів, які дозволяють використовувати технологію цифрової бездротової передачі даних з наднизьким енергоспоживанням. Система має чотири канали з гнучкими коефіцієнтом підсилення та частотою дискретизації. Час автономної роботи в режимі безперервної передачі даних складає приблизно 12 годин. Так, за допомогою цієї системи, ми досліджували зміни локальних потенціалів у нюховій цибулині під час розвитку ЕС, разом з синхронною реєстрацією локальних потенціалів гіпокампа та мигдалеподібного тіла у літій-пілокарпінової моделі епілепсії.

Існують докази того, що цілісність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) порушується в різних ділянках мозку під час розвитку епілепсії (van Vliet et al.,

2007). Порушення ГЕБ було виявлено у гіпокампі, корі, таламусі, мигдалеподібному тілі та нюховій цибулині протягом різних періодів епілептогенезу. Роль нюхової цибулини у розвиток ЕС залишається не достатньо вивченою. В даній роботі ми досліджували зміни локальних потенціалів у нюховій цибулині, гіпокампі та мигдалеподібному тілі під час розвитку ЕС у літій – пілокарпіновій моделі. Так, після введення пілокарпіну потужність тета-ритму зростала у гіпокампі та мигдалеподібному тілі, а у нюховій цибулині, навпроти, зменшувалась. Також відбулися зміни у бета-ритмі гіпокампа та мигдалеподібному тілі, та у гамма-ритмі нюхової цибулини та мигдалеподібного тіла. Ми виявили, що інтеріктальні спалахи нейрональної активності, які співвідносять з початком нападу, у нюховій цибулині з'являлися на 25 ± 7 секунд раніше ніж у гіпокампі та мигдалеподібному тілі. Ці данні можуть свідчити про можливу тригерну роль нюхової цибулини у розвитку епілептичного статусу.

Найбільш поширений тип рефрактерної епілепсії, скронева епілепсія, яка впливає на церебральні нейронні мережі, включаючи гіпокамп та кілька анатомічно пов'язаних областей. Епілептичні сплески електричної активності мозку є ознакою підвищеної збудливості та гіперсинхронності нейронних мереж (Ge et al., 2013). Аномально синхронізована діяльність нейронної мережі гіпокампа має вирішальне значення для виникнення нападів та розвитку епілепсії. У цьому дослідженні ми використовували мікроелектроди для реєстрації локальних потенціалів в гіпокампі *in vivo* у дорослих щурів під час розвитку епілептичного статусу. Останні дослідження вказують на те, що протеазаактивовані рецептори першого типу (ПАР1), представники сімейства рецепторів, спряжених із G-білками, що активуються протеазами, у тому числі тромбіном, можуть мати важливу роль у розвитку набутої епілепсії (D. Isaev et al., 2015) . Ми досліджували зміни локальних потенціалів гіпокампу щурів під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії за умов пригнічення функції ПАР1. Блокування ПАР1 призводило до зменшення потужності тета- та гамма-ритму під час транзитної фази становлення

епілептичного статусу, але не впливало на зміни потужності ритмів під час латентної фази, що свідчить про зменшення гіперсинхронізованості нейронних мереж напередодні становлення ЕС.

ПАР1 є найпоширенішими тромбіновими рецепторами ЦНС, що експресуються в нейронах і гліальних клітинах гіпокампа, корі головного мозку, стріатумі, мигдалику, базальних гангліях тощо (Striggow *et al.*, 2001). Саме ці відділи є найвразливішими ділянками мозку при скроневій епілепсії, та саме вони відповідають за обробку психоемоційних реакцій, соціальну та особистісну поведінку тощо. Ми досліджували ефект блокування ПАР1 на поведінкові реакції щурів з епілептичним статусом. Для цього проведені дослідження локомоторної активності тварин, рівня тривожності та емоційно-обумовленої пам'яті. Блокування ПАР1 перед становленням епілептичного статусу, нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у латентний період розвитку епілепсії, та призводить до покращення цих показників у хронічний період. Таким чином в роботі продемонстровано не тільки залученість нюхової цибулини у розвитку ЕС, а і вплив ПАР1 на локальні потенціали гіпокампа під час розвитку епілептичного статусу та залучення цих рецепторів у регуляцію тривожної поведінки епілептичних щурів. Доповнено інформацію щодо ключової ролі ПАР1-залежної сигналізації у формуванні пам'яті, обумовленої страхом, у дорослих щурів.

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

Bogovuk R.I. The role of protease-activated receptors of the first type in the modulation of the activity of rat hippocampal neurons - Manuscript.

The dissertation on a scientific degree of the candidate of biological sciences for specialty 03.00.02 - biophysics. - Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the determination of the influence of protease - activated receptors of type 1 (PAR1) on the changes of local potentials in the hippocampus during the development of status epilepticus and on behavioral reactions during the latent and chronic period of epilepsy development in adult rats. The study shows changes in local potentials in the olfactory bulb during the development of status epilepticus (SE), together with the simultaneous registration of local potentials of the hippocampus and amygdala. Recording electrophysiological signals from freely moving experimental animals is an important approach to studying physiological parameters (blood pressure, heart rate, body temperature, brain activity) under relatively natural conditions. Wireless, so-called telemetry recording systems, which are most convenient for the experimental animal, in many aspects have more advantages than conventional wired recording devices (Lapray et al., 2008). We have developed a four-channel wireless system for recording electrophysiological potentials. It is built on the basis of the latest electronic components that allow the use of digital wireless data technology with ultra-low power consumption. The system has four channels with flexible gain and sampling rate. The battery life in continuous data transfer mode is approximately 12 hours. Using this system, we have found that the interictal spikes of neuronal activity, which correspond to the onset of the seizure, appeared earlier in the olfactory bulb.

The integrity of the BBB is disrupted in different parts of the brain during the development of epilepsy (van Vliet et al., 2007). BBB disruption have been found in the hippocampus, cortex, thalamus, amygdala, and olfactory bulb during various periods of epileptogenesis. The role of the olfactory bulb in the development of SE remains insufficiently studied. Thus, after the injection of pilocarpine, the power of theta rhythm increased in the hippocampus and amygdala, and in the olfactory bulb, on the contrary, decreased. There were also changes in the beta rhythm of the hippocampus and amygdala, and in the gamma rhythm of the olfactory bulb and amygdala. We found that the interictal spikes of neuronal activity associated with the onset of the SE occurred 25 ± 7 seconds earlier in the olfactory bulb than in the

hippocampus and amygdala. These data may indicate a possible trigger role of the olfactory bulb in the development of status epilepticus.

The most common type of refractory epilepsy is temporal lobe epilepsy, which affects the cerebral neural networks, including the hippocampus and several anatomically related areas. Epileptic spikes of electrical activity of the brain are a sign of increased excitability and hypersynchrony of neural networks (Ge et al., 2013). Abnormally synchronized activity of the neural network of the hippocampus is crucial for seizures and the development of epilepsy. In this study, we used microelectrodes to record local potentials in the hippocampus in vivo in adult rats during the development of SE. Recent studies suggest that protease-activated receptors 1 (PAR1), members of the subfamily of related G protein-coupled receptors, that activated by thrombin, may play an important role in the development of acquired epilepsy (D. Isaev et al., 2015). The changes in the local potentials in the rat hippocampus during the development of status epilepticus in the lithium-pilocarpine model of epilepsy in conditions of inhibit function of PAR1 were also studied. Blocking of PAR1 reduced the power of theta and gamma rhythms during the transit phase of status epilepticus, but did not affect the changes in rhythm power during the latent phase, indicating a decrease in the hypersynchronization of neural networks before SE formation.

PAR1 is the most common CNS thrombin receptor, expressed in neurons and glial cells of the hippocampus, cerebral cortex, striatum, tonsil, basal ganglia, etc. (Strigrow et al., 2001). These structures are the most vulnerable parts of the brain in temporal lobe epilepsy, and they are responsible for processing psycho-emotional reactions, social and personal behavior. The effect of PAR1 blockade on the behavioral responses of rats with status epilepticus was also determined. Locomotor activity of animals, the levels of anxiety and emotional memory were studied. Thus, it was determined that the blocking PAR1 before the formation of status epilepticus, normalized the level of anxiety and emotional memory in the latent period, and

blocking after SE led to the improvement in these indicators in the chronic period of epilepsy. Thus, the study demonstrates not only the involvement of the olfactory bulb in the development of EC, but also the effect of PAR1 inhibition on the local potentials of the hippocampus during the development of status epilepticus and the involvement of these receptors in regulating the anxiety behavior of epileptic rats. The key role of PAR1-dependent signaling in the formation of fear-induced memory in adult rats has been demonstrated.

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні результати роботи:

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

Патенти:

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

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

1. Natarov, R., Dyka, Z., **Bogovyk, R.**, Fedoriuk, M., Isaev, D., Sudakov, O., Maksymyuk, O., Krishtal, O. and Langendörfer, P., 2020, June. Artefacts in EEG Signals Epileptic Seizure Prediction using Edge Devices. In 2020 9th Mediterranean Conference on Embedded Computing (MECO) (pp. 1-3). IEEE. DOI: [10.1109/MECO49872.2020.9134076](https://doi.org/10.1109/MECO49872.2020.9134076).
2. **Bogovyk R.**, Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 after status epilepticus modulates emotionally driven behavioral responses of epileptic rat. VII International Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, Ukraine, June 7 – 11, 2017.
3. Savotchenko A., **Bogovyk R.**, Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Isaeva E. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. Barcelona Young Neuroscientists Symposium, Barcelona, Spain, June 15-16, 2017.

4. E. Isaeva, M. Semenikhina, **R. Bogovyk**, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, Lina T. AlKury, A. Savotchenko, O. Krishtal. Protease-activated receptor 1 inhibition rescues impaired synaptic plasticity and anxiety-related behavior but does not affect spatial learning deficit in juvenile rat after status epilepticus. SfN meeting, Chicago, USA, 2019.
5. M. Semenikhina, **R. Bogovyk**, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 restores hippocampal synaptic plasticity and converts behaviour deficits in a model of temporal lobe epilepsy, 35th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine Rare diseases: From mechanisms to therapy and beyond, Cologne, Germany, 2019.
6. M. Semenikhina, **R. Bogovyk**, M. Fedoriuk, O. Nikolaienko, A. Savotchenko, E. Isaeva Inhibition of PAR1 restores hippocampal synaptic plasticity and affects emotionally-modulated behavior in rat at lithium-pilocarpine model of status epilepticus, 20-й з'їзд Українського фізіологічного товариства, Київ, Україна, 2019.
7. Semenikhina M., **Bogovyk R.**, Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Isaeva E. Inhibition of par1 affects on emotionally-modulated behaviour and synaptic plasticity in rat at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, Україна, 2018.
8. Semenikhina M., **Bogovyk R.**, Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus, Oxford autumn school in neuroscience, Oxford, UK, 2018.
9. **Р.І. Боговик**, М.П. Федорюк Зміни ритмів гіпокампу, амігдали та нюхової цибулини під час розвитку епілептичного статусу у щурів при літій – пілокараїновій моделі епілепсії. XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2020», Житомир, Україна, 2020.

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

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ	11
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ.....	14
ВСТУП.....	15
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	21
1.1 ЕПІЛЕПСІЯ.....	21
1.1.1 <i>Методи діагностики епілепсії.....</i>	<i>24</i>
1.1.2 <i>Методи лікування епілепсії.....</i>	<i>27</i>
1.1.3 <i>Скронева епілепсія</i>	<i>29</i>
1.2 ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНИЙ БАР'ЄР ТА ЙОГО РОЛЬ У РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПСІЇ 32	
1.2.1 <i>Структурні та функціональні порушення ГЕБ в умовах епілепсії.....</i>	<i>33</i>
1.3 ТРОМБІН ТА РЕЦЕПТОР ДО НЬОГО ПАР1	37
1.3.1 <i>Тромбін та його функції.....</i>	<i>37</i>
1.3.2 <i>Характеристика ПАР 1 рецептора.....</i>	<i>39</i>
1.4 ТРОМБІН ТА ПАР1 У ЦНС.....	42
1.5 РОЛЬ ТРОМБІНУ ТА ПАР1 РЕЦЕПТОРА У РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПСІЇ.....	44
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	46
2.1 ТВАРИННІ МОДЕЛІ ЕПІЛЕПСІЇ.....	46
2.1.1 <i>Літій - пілокарпінова модель.....</i>	<i>49</i>
2.2 ПОВЕДІНКОВІ ТЕСТИ.....	52
2.2.1 <i>Тест «відкрите поле».....</i>	<i>53</i>
2.2.2 <i>Тест «хрестоподібний припіднятий лабіринт».....</i>	<i>54</i>
2.2.3 <i>Тест на дослідження обумовленого страху.....</i>	<i>56</i>
2.3 ПРОЦЕДУРА ІМПЛАНТАЦІЇ ЕЛЕКТРОДІВ	58
2.3.1 <i>Метод анестезування щурів.....</i>	<i>58</i>
2.3.2 <i>Доопераційні маніпуляції.....</i>	<i>58</i>
2.3.3 <i>Імплантація електродів.....</i>	<i>59</i>

2.4	ЛОКАЛЬНІ ПОТЕНЦІАЛИ ТА ЇХ РЕЄСТРАЦІЯ.....	61
2.4.1	<i>Тета-ритм.....</i>	62
2.4.2	<i>Гамма-ритм</i>	62
2.4.3	<i>Взаємодія між різними ритмами гіпокампа.....</i>	63
2.4.4	<i>Реєстрація локальних потенціалів.....</i>	64
2.5	МЕТОДИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ	65
3	РЕЗУЛЬТАТИ.....	66
3.1	РОЗРОБКА БЕЗДРОТОВОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ РЕЄСТРАЦІЇ ЕЛЕКТРИЧНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У ЩУРІВ	66
3.1.1	<i>Блок-схема пристрою та технічне завдання.....</i>	69
3.1.2	<i>Принципова схема та основні блоки.....</i>	70
3.1.3	<i>Розробка прототипу.....</i>	74
3.2	ЗМІНИ ЛОКАЛЬНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ ГІПОКАМПА, МИГДАЛЕПОДІБНОГО ТІЛА ТА НЮХОВОЇ ЦИБУЛИНИ ПІД ЧАС РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ	76
3.3	ЕФЕКТ БЛОКУВАННЯ ПАР1 НА РОЗВИТОК ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ ПРИ ЛІТІЙ-ПІЛОКАРПІНОВІЙ МОДЕЛІ ЕПІЛЕПСІЇ.	81
3.3.1	<i>Ефект літію на базову активність гіпокампу в контролі та за умов блокування ПАР1.....</i>	81
3.3.2	<i>Ефект блокування ПАР1 на розвиток епілептичного статусу у літій- пілокарпіновій моделі епілепсії</i>	88
3.4	ВПЛИВ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ БЛОКАДИ ПАР1 НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ	95
3.5	ВПЛИВ ЕС ТА ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ БЛОКАДИ ПАР1 РЕЦЕПТОРІВ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ У ЛАТЕНТНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПСІЇ.....	98
3.5.1	<i>Зміни рівня тривожності та локомоторної активності в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у латентний період</i>	99
3.5.2	<i>Зміни рівня обумовленого страху в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у латентний період.....</i>	101
3.6	ВПЛИВ ЕС ТА ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ БЛОКАДИ ПАР1 РЕЦЕПТОРІВ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ У ХРОНІЧНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПСІЇ.....	103

3.6.1	<i>Вплив блокування ПАР1 на кількість спонтанних повторювальних нападів у хронічний період</i>	104
3.6.2	<i>Зміни рівня тривожності та локомоторної активності в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у хронічний період</i>	104
3.6.3	<i>Зміни рівня обумовленого страху в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у хронічний період</i>	107
4	ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	109
4.1	РОЗРОБКА БЕЗДРОТОВОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ РЕЄСТРАЦІЇ ЕЛЕКТРИЧНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У ЩУРІВ	109
4.2	ЗМІНИ ЛОКАЛЬНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ НЮХОВОЇ ЦИБУЛИНИ, ГІПОКАМПА ТА МИГДАЛЕПОДІБНОГО ТІЛА ПІД ЧАС РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ	110
4.3	ЕФЕКТ БЛОКУВАННЯ ПАР1 НА РОЗВИТОК ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ ПРИ ЛІТІЙ-ПІЛОКАРПІНОВІЙ МОДЕЛІ ЕПІЛЕПСІЇ	111
4.4	ВПЛИВ ЕС ТА ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ БЛОКАДИ ПАР1 РЕЦЕПТОРІВ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ ЩУРІВ У ХРОНІЧНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПСІЇ	113
5	ВИСНОВКИ	115
6	СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	116

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

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

АЕП – анти-епілептичні препарати

ГАМК – γ -аміномасляна кислота

ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр

НМДА – N-метил-D-аспартат

ЕС – епілептичний статус

ПАР – протеазаактивований рецептор

ЦНС – центральна нервова система

ЕЕГ – електроенцефалограма

СПН – спонтанні повторювальні напади

G-білок – Гуаніннуклеотид зв'язуючий білок.

ВСТУП

Епілепсія – це хронічне неврологічне захворювання, при якому спостерігаються повторювані епілептичні напади. Під терміном «епілептичний напад» розуміють раптову зміну в поведінці у зв'язку з короткочасною зміною у електричній активності мозку. Напад виникає у результаті порушення балансу між збуджувальними та гальмівними процесами у мозку. Зазвичай головний мозок генерує електричні сигнали певної частоти та ритми, які є коливальними хвилями нейронної активності. Ці ритми відображають синхронну активність великої кількості нейронів. Під час нападу нормальна електрична активність мозку порушується за рахунок надмірної гіпер-синхронізованої нейронної активності, що впливає на свідомість, рухи та сенсорні відчуття. Усі епілептичні напади поділяють на три категорії: фокальні (локальні), генералізовані та неklasифіковані епілептичні напади.

Приблизно 6 із 10 дорослих з фокальним типом епілепсії мають скроневу епілепсію. Медіальна скронева епілепсія є основним типом такої епілепсії (приблизно 80% всіх скроневих нападів), вона характеризується залученням медіальних або внутрішніх структур скроневої долі (Hannah Klein, 2019). Напад зазвичай починається у гіпокампі або мигдалині та поширюється на сусідні зони. Процес епілептогенезу включає в себе три стадії: 1) первинне провокуюче ушкодження, 2) латентний (без нападів) період, та 3) розвиток скроневої епілепсії, який виявляється як спонтанні повторювані напади (СПН), які можуть проявлятися або ж ні протягом усього життя.

Третя стадія характеризується хронічною гіперзбудливістю та гіперсинхронністю. Вона проявляється у вигляді повторюваних неспровокованих фокальних нападів з вторинною генералізацією (або і без такої) і асоціюється зі змінами в нейронних мережах (синаптична реорганізація) та змінами на клітинному рівні (запалення, нейродегенерація у CA1 та CA3 зонах, астрогліоз) (Nirwan *et al.*, 2018).

Фактори, що призводять до розвитку епілепсії можуть бути як генетичними, так і набутими. Порушення може проявлятися на будь-якому рівні функціонування мозку: від атипової роботи певних рецепторів або каналів (генетично обумовлені) до тканинних пошкоджень мозку у результаті травми чи інсульту (набуті). Все більше останніх досліджень вказують на те, що у розвитку епілепсії та супутніх їй психоневрологічних патологій, суттєву роль відіграє порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ).

Актуальність

Сучасне розуміння молекулярних механізмів, залучених до розвитку епілептичного статусу внаслідок порушення гематоенцефалічного бар'єру, досі залишається не повним. Встановлено, що дисфункція ГЕБ провокує ранні запальні процеси, що може приводити до розвитку епілептичного статусу. Також, у результаті порушення ГЕБ, до мозку можуть потрапляти різні компоненти крові, які здатні впливати на збудливість нейронів та постіктальну реконструкцію нейронних мереж. В якості потенційних чинників розвитку епілептогенезу наразі розглядаються серинові протеази, такі як тромбін. Так, було показано що тромбін впливає на процеси пластичності та збудливості нейронних мереж шляхом активації протеазаактивованого рецептора першого типу (ПАР1) і впливу на потенціал-керовані натрієві канали та НМДА рецептори. Активація ПАР1 у астроцитах може збільшувати синхронізацію нейронної активності. Таким чином, активація ПАР1 може призводити до значного підвищення збудливості нейронних мереж, що може бути внеском у розвиток епілептичного статусу при різних травмах та патологіях. Останні дослідження свідчать, що системне інгібування ПАР1 рецептора може мати протиепілептогенний ефект. Тим не менш, внесок ПАР1 рецептора у розвиток епілептичного статусу залишається не до кінця встановленим.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу фізики-хімічної біології клітинних мембран Інституту

фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012 – 2016; номер державної реєстрації – 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273).

Мета дослідження

Мета даної роботи полягала у визначенні змін локальних потенціалів нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалини під час розвитку епілептичного статусу та у визначенні впливу протеазаактивованих рецепторів типу 1 на зміни локальних потенціалів гіпокампа під час розвитку епілептичного статусу і на поведінкові реакції у латентному та хронічному періодах розвитку епілепсії дорослих щурів.

Завдання дослідження

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Розробити прототип багатоканальної бездротової системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів головного мозку щурів.
2. Оцінити зміни амплітудних та частотних характеристик локальних потенціалів гіпокампа, мигдалеподібного тіла та нюхової цибулини під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.
3. Провести аналіз змін локальних потенціалів гіпокампа щурів під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії за умов пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів першого типу (ПАР1).
4. Визначити вплив епілептичного статусу на поведінкові реакції дорослих щурів у латентний та хронічний періоди епілептогенезу за умов інгібування ПАР1.

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

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

Наукова новизна одержаних результатів

У роботі було вперше досліджено зміни локальних потенціалів у нюховій цибулині, гіпокампі та мигдалині під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Дуже цікавим виявилось те, що інтеріктальні спалахи нейрональної активності з'являються раніше у нюховій цибулині ніж в гіпокампі та мигдалині. Також було показано що зміни потужності локальних потенціалів під час розвитку епілептичного статусу значно більші у нюховій цибулині в порівнянні з іншими ділянками. Отримані дані вказують на можливу роль нюхової цибулини у розвитку епілептичного статусу. Окрім внеску в загальне розуміння кінетики змін різних ритмів при розвитку епілептичного статусу в різних ділянках головного мозку, дана робота вперше показує вплив фармакологічної блокади протеазаактивованих рецепторів першого типу на потужності тета- та гамма-ритму під час транзитної фази становлення епілептичного статусу.

Вперше продемонстровано, що фармакологічна блокада протеазаактивованих рецепторів першого типу нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів

Результати, отримані в роботі, мають в основному фундаментальне значення, оскільки розширюють наявні уявлення щодо залучення ПАР1 у механізми розвитку епілептичного статусу та супутніх поведінкових розладів. А саме: показано роль ПАР1 у розвитку епілептичного статусу, та вплив блокування цих рецепторів на поведінкові реакції у латентний та хронічний

періоди розвитку епілепсії. Також в роботі представлені докази залучення нюхової цибулини у розвиток епілептичного статусу.

Практична цінність даної роботи полягає у розробці прототипу багатоканальної бездротової системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів головного мозку щурів. Його використання для одночасних записів електричної активності від різних ділянок мозку, що надає можливість робити більш детальне дослідження розвитку епілептичного статусу. Доведена доцільність використання ПАР1 у якості терапевтичної мішені при розвитку набутої епілепсії.

Особистий внесок здобувача

Здобувачем сформульовані задачі дослідження, разом із співавторами сплановані та реалізовані експериментальні протоколи. Розроблено друковану плату бездротової системи реєстрації, операції по вживленню електродів. Аналіз, статистична обробка та узагальнення результатів проведені автором самостійно. Поведінкові експерименти та оформлення публікацій були проведені разом зі співавтором опублікованих робіт аспірантом Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Семеніхіною М.О. Проведення електрофізіологічних тестів та розробка прототипу бездротової системи реєстрації потенціалів проводилося у тісній співпраці зі молодшим науковим співробітником Інституту ім. О.О.Богомольця НАН України, Федорюком М.П.

Мета дослідження, планування робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника д.б.н., проф., академіка Кришталія О.О., а також д.б.н. Ісаєвої О.В.

Апробація результатів дисертації

Результати дослідження були представлені на з'їзді Європейської федерації нейронаук (Чикаго, 2019), 35-му симпозіумі Ернста Кленка з молекулярної медицини (Кельн, 2019), регіональному з'їзді Європейської федерації нейронаук (Белград, 2019), 20-му з'їзді Українського фізіологічного

товариства (Київ, 2019), VII з'їзді Українського біофізичного товариства, (Київ, 2018), Оксфордській школі нейронаук (Оксфорд, 2018), міжнародному форумі «Україна майбутнього (Бердянськ, 2018), міжнародному симпозіумі «Фізіологія гладеньких м'язів, біофізика та фармакологія» (Київ, 2018), міжнародній конференції «Наукова активність як шлях формування майбутнього фахівця» (Суми, 2018), VII Конгресі Українського товариства нейронаук (Київ, 2017), 8-а Міжнародна конференція з кібер-фізичних систем та інтернет-речей «CPS & IoT'2020» (Будва, 2020), XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2020» (Житомир, 2020), 9-ій середземноморській конференції з вбудованих систем «MECO'2020» (Будва, 2020).

Публікації

Результати роботи ввійшли у 16 наукових працях, з яких 2 статті у фахових наукових журналах, у тому числі одна стаття у науковому виданні, віднесеному до другого квартилю відповідно до класифікаціях SCImago Journal and Country Rank, 1 патенти та 12 тез доповідей на конференціях і з'їздах.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів досліджень, обговорення результатів, висновків та списку використаних джерел з 197 найменувань. Робота містить 1 таблицю, 47 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 140 сторінок.

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Епілепсія

Епілепсія - це хронічне захворювання, основною відмінною рисою якого є спонтанні повторювані напади. Цей діагноз ставиться у випадку, якщо у людини спостерігали щонайменше два випадки неспровокованих нападів, які не були викликані медичними умовами різного роду, наприклад низьким рівнем цукру в крові.

Епілепсію вважають одним з найпоширеніших неврологічних розладів. Згідно з (Hauser, 1994) щорічно діагностують приблизно 50 нових випадків захворювання епілепсією на кожних 100,000 людей. Близько 1% населення світу страждає від епілепсії, і приблизно третя частина всіх хворих має напади які погано, або зовсім, не можливо контролювати ліками або різного роду терапією. До 75% перших епілептичних випадків реєструються протягом дитинства, що свідчить про вищу сприйнятливність дитячого мозку до розвитку нападів (Stafstrom and Carmant, 2015).

Епілепсію слід розглядати як розлад широкого спектру, адже вона проявляється не лише спонтанними періодичними нападами. Для пацієнтів та їх сімей, основним моральним та фізіологічним навантаженням є супутні поведінкові та психіатричні розлади, такі як депресія, тривожність, труднощі в навчанні, синдром порушення активності та уваги, інтелектуальна інвалідність та аутизм. Ці розлади, які раніше вважали наслідком нападів або побічними ефектами ліків, зараз розглядають як невід'ємну частину захворювання, що іноді передують нападам і являють собою прояв розладу нейронних мереж (Brooks-Kayal *et al.*, 2013). Навіть одиничний напад може вплинути на розвиток нейронних структур, через модифікацію експресії рецепторів та порушення процесів клітинної смерті, призводячи до когнітивних та поведінкових розладів (Cormejo *et al.*, 2007). Розуміння патофізіологічних зв'язків між супутніми розладами та епілепсією може мати важливий вплив на життя людей з

епілепсією, та повинно стати одним із пріоритетних напрямків у подальших дослідженнях цієї патології (Stafstrom and Carmant, 2015).

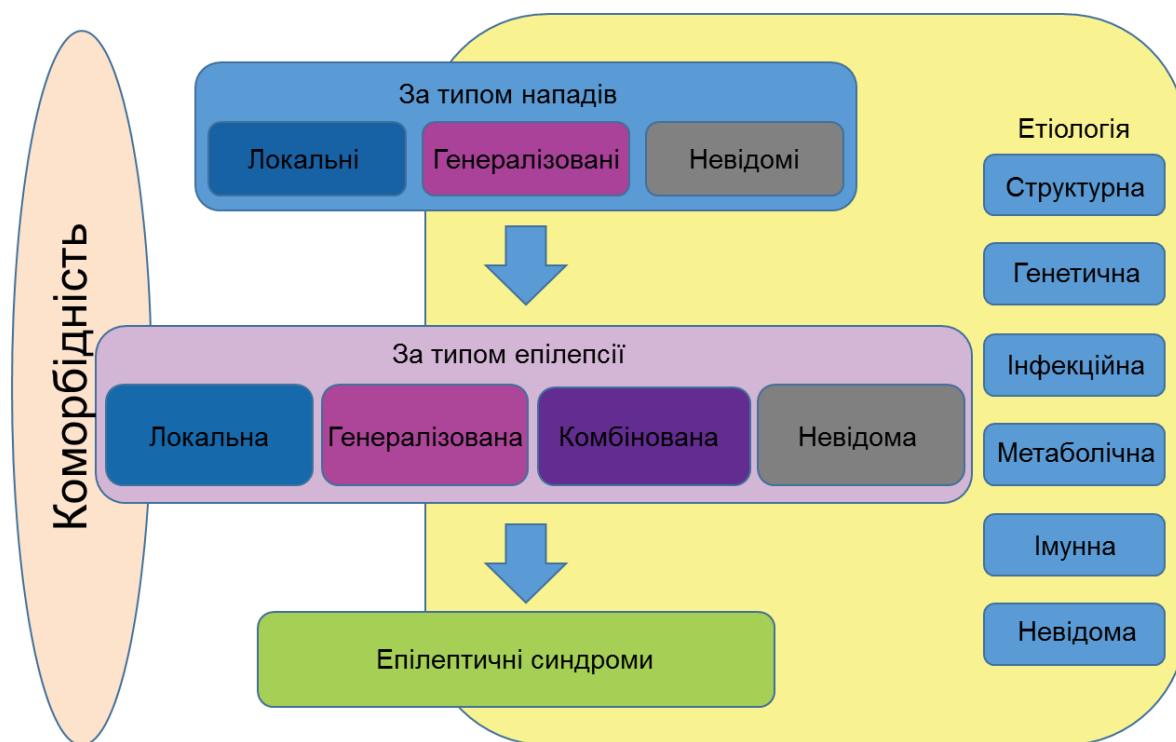


Рис. 1 - Схема класифікації епілептичних синдромів (Scheffer et al., 2017)

Всі випадки епілепсії класифікуються за типом нападу, причинними факторами, характером епілептичних синдромів, а також за особливостями клінічних проявів. На Рис. 1 наведена приблизна схема груп показників за якими встановлюється той чи інший тип синдрому. З кожним роком схема класифікації змінюється згідно з новими дослідженнями причин, розвитку та лікуванні епілепсії. Головною метою діагностичного тестування у пацієнтів з епілепсією є визначення локалізації нападу та, у випадках стійкої до ліків епілепсії, підбір доцільного типу оперативного втручання з найбільшою ефективністю контролю нападів і найменшою інвазивністю. Для цього використовуються наступні методи: електроенцефалографія (ЕЕГ), магнітно-резонансна томографія головного мозку, нейропсихологічна оцінка за допомогою тестів, позитронно-емісійна томографія, однофотонна емісійна комп'ютерна томографія,

магнітоенцефалографія та інтракраніальна електроенцефалографія, функціональна магнітно-резонансна томографія (Karasin and Karasin, 2017).

Загалом напад можна пояснити зміною балансу між збудженням та гальмуванням у мозку (Rho *et al.*, 2010). Цей дисбаланс може бути викликаний змінами на різних рівнях організації мозку - від генів та внутрішньоклітинних сигнальних каскадів до функціонування розгалужених нейронних мереж. Фактори, які впливають на зміни балансу між збудженням та гальмуванням, можуть бути як генетичними, так і набутими. Генетичні патології, що призводять до появи епілепсії, також можуть проявлятися на різних рівнях: клітинному (наприклад, кортикальна дисплазія), молекулярному (порушення функціонування ГАМК-рецепторів) тощо. Гострий церебральний інсульт може впливати на функціонування нейронних мереж, наприклад, обумовлюючи структурні зміни гіпокампа внаслідок тривалого фебрильного нападу або травми голови. Мозок, що розвивається, з різних фізіологічних причин також дуже схильний до нападів (Berkovic, 2015). Було показано, що на ранніх життєвих етапах нейромедіатор ГАМК може виконувати функцію збудження, а не гальмування (Ben-Ari, 2002; Pitkänen *et al.*, 2015). Навіть у мозку, що розвивається нормально, синаптичні функції, які відповідають за збудливість, розвиваються раніше за гальмівні, призводячи до збільшення ризику виникнення генералізованих нападів. Ці дані пояснюють більшу сприйнятливність молодого мозку до нападів. Однак, напади у мозку, що розвивається, спричиняють менше структурних пошкоджень, ніж у мозку дорослих (Holmes and Ben-Ari, 1998).

Нові дослідження у галузі генетики епілептичних синдромів вказують на те, що чинниками ризику виникнення епілепсії можуть бути моногенні та полігенні мутації. Більшість видів епілепсії мають складну генетичну основу з мультигенними дефектами, що ведуть до зміни потенціалу на мембрані нейронів, через що і розвивається або надмірне збудження, або не достатнє гальмування, що і стає причиною розвитку епілептичного статусу (Stafstrom and Carmant, 2015).

1.1.1 Методи діагностики епілепсії

Історія хвороби та неврологічне обстеження є основою діагностики нападів та епілепсії, тоді як лабораторні методи слугують як допоміжні тести. Різні особливості історії хвороби такі, як клінічний контекст, в якому відбуваються напади, наявність та характер передчуття перед нападом, деталі самого нападу та стан після нападу, грають важливу роль у визначенні наявності та характеру синдрому епілепсії, що дозволяє обрати необхідний курс лікування та визначити прогноз.

Неврологічне обстеження оцінює осередкові ознаки, які можуть ідентифікувати або локалізувати церебральну патологію. Наприклад, підвищений тонус з одного боку тіла може вказувати на патологію в контрлатеральній півкулі, наприклад кортикальну дисплазію. Загальне фізичне обстеження також є важливим для визначення наявності у пацієнта епілептичного синдрому. Наприклад, деякі ураження шкіри можуть вказувати на розлади, при яких поширена епілепсія, наприклад, туберкульозний склероз або нейрофіброматоз (Stafstrom and Carmant, 2015).

Одним з найрозповсюджених методів діагностики епілепсії є ЕЕГ, яка дозволяє виявляти аномальну електричну активність, таку як вогнищеві (фокальні) спалахи або хвилі (характерні для фокальної епілепсії) або дифузні двосторонні шиповидні хвилі (характерні для генералізованої епілепсії). Зазвичай для діагностики проводять запис ЕЕГ при різних станах, таких як неспання, сонливість та сон, оскільки поширеність епілептиформних відхилень може різнитися в різних станах свідомості (Stafstrom and Carmant, 2015). Також, під час ЕЕГ для підвищення епілептиформної активності проводяться активаційні процедури, такі як гіпервентиляція та світлова стимуляція. Гіпервентиляція пацієнта протягом 3 хв може приводити до появи нападів. Це пов'язано з ефектом алкалозу (Schuchmann *et al.*, 2006). Світлова стимуляція може викликати пароксизмальну епілептиформну активність або навіть

генералізований напад у людей, схильних до генералізованої епілепсії (Verrotti *et al.*, 2012).

Для того, щоб підвищити успішність діагностування та диференціювати епілептичний напад від неепілептичного явища часто проводять одночасний моніторинг ЕЕГ активності та поведінки пацієнта. Такий відео-ЕЕГ моніторинг може тривати від декількох годин до декількох днів, та є «золотим» діагностичним стандартом в епілептології для підтвердження наявності нападів, виявлення їх локалізації, диференціювання синдромів епілепсії та для вибору або оптимізації терапевтичних підходів (Kobulashvili *et al.*, 2018). Коли якісна оцінка ЕЕГ поєднується із спостереженням семіології нападів та повідомленнями пацієнта про вогнищеві напади або іншим досвідом, пов'язаним із судомою, це дозволяє зв'язати якісні характеристики ЕЕГ із поведінковими та психічними станами. Оцінка психічних станів при відео-ЕЕГ моніторингу зазвичай обмежується перііктальним тестуванням когнітивних функцій, яке може інформувати лікаря про локалізацію судом (Höller *et al.*, 2019). Постійний моніторинг ЕЕГ може дозволяти передбачити епілептичні напади. Проблема прогнозування епілептичних нападів зараз широко вивчається. Незважаючи на успіх підходів у цій галузі (Baumgartner and Koren, 2018), це все ще є проблемою, так як фізіологічні механізми епілепсії не повністю відомі. Основні підходи до прогнозування епілептичних нападів включають різні алгоритми машинного навчання із кластеризацією даних та подальшою класифікацією.

З розвитком нових технологій медичної візуалізації все більше методів використовують для діагностики епілепсії (Kim *et al.*, 2010). Комп'ютерна томографія (КТ) та магнітно-резонансна томографія (МРТ) є важливими доповненнями до клінічного обстеження та ЕЕГ при оцінці стану людини з судомою. Ці методи особливо чутливі при ураженнях центральної нервової системи (ЦНС). МРТ краще виявляє аномалію у пацієнта з фокальними нападами, ненормальними неврологічними симптомами або фокальними розрядами на ЕЕГ. Для цієї діагностики МРТ більш чутливий, ніж КТ, і тому він

є кращим, особливо для виявлення кортикальних новоутворень або гіпокампального склерозу. Кількісний, тривимірний аналіз МРТ знімків скроневих ділянок за допомогою новітніх алгоритмів машинного навчання дозволяє виявити асиметрії, які важко помітити неозброєним оком. Функціональна МРТ (fMRI) використовує залежність рівня кисню в крові (BOLD) від активності нейронів для відображення міжіктальної або іктальної епілептиформної активності. Магнітно-резонансна (МР) спектроскопія вимірює концентрацію різних метаболітів у різних областях мозку і може використовуватись для локалізації нападів. Позитронно-емісійна томографія (ПЕТ) відображає регіональне використання глюкози в мозку з асиметріями, що виявляє області міжіктальної або іктальної аномалії. Однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (SPECT) порівнює місцеві невідповідності кровотоку, ця інформація, є найбільш корисною при реєстрації під час нападів. У свою чергу, КТ цінна в гострих умовах для виявлення крововиливу, кальцифікації або пухлин (Stafstrom and Carmant, 2015). Ці вдосконалені способи використовуються в основному в центрах епілепсії для більш детальних досліджень напередодні хірургічного втручання (Kay and Szaflarski, 2014).

Іноді напади та епілептичні синдроми спроможні викликати різні метаболічні порушення. Тип нападів та синдрому визначає ступінь метаболічних порушень (Pearl, 2009). Наприклад, у пацієнтів з синдромом Леннокса-Гастаута спостерігається порушення обміну речовин або дегенеративні відхилення, в порівнянні з пацієнтами, які мають прості часткові напади. При порушеннях обміну речовин напади, як правило, супроводжуються іншими порушеннями, такими як незрозуміла блювота або кома. При нападах у новонароджених слід обов'язково проводити повне метаболічне обстеження, наприклад, аналіз крові на мітохондріальні хвороби або проаналізувати спинномозкову рідину на дефекти транспортерів глюкози (синдром дефіциту GLUT1) (Pearson *et al.*, 2013).

Останнім часом завдяки появі досліджень, що розкривають генетичні основи епілепсії, клінічне генетичне тестування займає все більш вагомий роль у

клініці (Olson and Poduri, 2014). На даний момент доступне тестування декількох окремих генів, а також комплексних генетичних порушень (Vezzani *et al.*, 2015). Базовий аналіз може бути виконаний для визначення хромосомних аномалій, особливо у пацієнтів з дисморфічними ознаками. Якщо є підозра на специфічний синдром, можна замовити панель епілепсії обраних генів (наприклад, SCN1A для синдрому Дравета). У випадках коли генетичне підґрунтя є дуже вірогідним, але стандартні панелі генетичних досліджень не дають результату, лікар може провести повне секвенування екзома пацієнта та його батьків, особливо при епілептичних енцефалопатіях невідомої етіології (Olson and Poduri, 2014).

1.1.2 Методи лікування епілепсії

Фармакологічна терапія є «першою лінією» в лікуванні епілепсії і включає в себе більше ніж 20 анти-епілептичних препаратів (АЕП) за допомогою яких можна успішно лікувати до 70% людей, що живуть з епілепсією (Stafstrom and Carmant, 2015). Препарати, які використовуються для лікування епілепсії, працюють за рахунок зниження загальної електричної активності мозку через різні механізми, такі як: зменшення деполяризації нейронів через блокаду натрієвих або кальцієвих каналів; інгібування збудження, яке опосередковане нейромедіатором глутаматом, або сприяння гальмуванню, яке опосередковане ГАМК (Vui *et al.*, 2015). Ефективність цих препаратів істотно залежить від етіології хвороби. Пацієнти з невизначеною етіологією, швидше за все, піддаються фармакологічному контролю, особливо якщо вони мають звичайні анамнез розвитку та неврологічне обстеження.

Рішення невролога щодо початку лікування тим чи іншим препаратом ґрунтується на типі нападів, віці, інших медичних станах та потенційному профілі побічних ефектів. Часто використовують ліки широкого спектру дії коли клінічна картина нападів остаточно з'ясована. В останні роки великої популярності як терапія «першої лінії» набув Леветирацетам через свою ефективність, легке титрування та добре відомий профіль побічних ефектів.

Раніше першим вибором при осередкових нападах був карбамазепін, тоді як при генералізованих нападах - вальпроєва кислота (Stafstrom and Carmant, 2015).

Загалом препарати спочатку призначають у низьких дозах, щоб уникнути побічних ефектів. Підвищення дози можна проводити через рівні проміжки часу, якщо це необхідно. Мета лікування - контролювати напади за допомогою найменшої дози. Коли перший препарат не дає результату, більшість лікарів-клініцистів додають другий препарат, пізніше вирішуючи, чи слід відмінити початковий препарат. Успішним вважається терапевтичний ефект протягом 2 місяців при оптимальній дозі. Через лікарські взаємодії комбінована терапія має високу токсичність; однак деякі комбінації показують особливу ефективність, наприклад, ламотригін та вальпроєва кислота для генералізованих нападів.

Через свої механізми дії усі анти-епілептичні препарати мають побічні ефекти з боку ЦНС. Наприклад, поширеним побічним ефектом майже всіх АЕП є сонливість. Ламотригін досить добре переноситься, але вимагає дуже ретельного підбору дози. Деякі лікарі розглядають можливість припинення прийому ліків, якщо напади не повторюються протягом не менш ніж 2 попередніх років. Якщо медикаментозним лікуванням не вдається контролювати напади, інші варіанти включають дієтотерапію (кетогенну дієту), операцію (лесіонектомія, гемісферотомія) та хірургічну паліативну терапію епілепсії (стимуляційна терапія, каллосотомія).

Зміна способу життя також є важливим аспектом в управлінні епілепсією. Оптимізація сну, дотримання лікування та зменшення стресу можуть значно покращити результат при лікуванні епілепсії. Також важливими є заходи з профілактики щодо зменшення причин симптоматичної епілепсії, таких як травма голови, перинатальна травма та інфекції мозку.

У більшості випадків лікування відкладається до появи другого нападу. Загальний ризик рецидиву після одного нападу коливається в межах від 27% до 71%. Мета-аналіз виявив, що середній показник повторного ризику становив 40% у перспективних дослідженнях порівняно з 52% у ретроспективних

дослідженнях (Berg and Shinnar, 1991). З цих рецидивів 80% трапляються протягом перших 2 років від початкового нападу. Оскільки медикаментозне лікування може спричинити значні побічні ефекти, переваги для лікування стають зрозумілішими після другого спонтанного нападу, коли ризик рецидиву протягом 1 року подвоюється (Shinnar *et al.*, 1996). Близько 70% дітей досягають періоду ремісії після принаймні 2 років без нападів. Після цього можна розглянути питання про припинення прийому ліків, особливо якщо не виявлено основної етіології, і дитина розвивається добре. З них у 20% - 25% напади повторюються або після відміни ліків (50%), або через деякий час мимовільно (Sillanpää and Schmidt, 2009). З усіх пацієнтів 37% матимуть легко контрольовані напади від початку, у 25% будуть рефрактерні напади від початку, а у 38% - змінні рецидиви. Пацієнти з невизначеною етіологією мають кращий результат, ніж пацієнти зі структурною, метаболічною або генетичною етіологією. Частота рецидивів після відміни АЕП становить від 12% до 66% (середнє значення 34%), а відновлення лікування для отримання подальшої ремісії є успішним у 80% випадків, без значних відмінностей між віковими групами. Однак, до настання другої ремісії може пройти багато років, тоді як у 19% повторне введення ліків, як і раніше, не було успішним у контролі нападів (Chadwick *et al.*, 1996). У 25% тих, хто припиняє лікування, продовжує розвиватися важко виліковна епілепсія. Факторами ризику для подальшого безуспішного лікування є симптоматична фокальна епілепсія та когнітивний дефіцит (Schmidt and Löscher, 2005). Загалом, не дивлячись на сучасний «арсенал» методів, яким володіє наука та медицина для лікування епілепсії, пошук та дослідження нових методів лікування, механізмів розвитку та лікарських речовин залишається актуальним.

1.1.3 Скронева епілепсія

Скронева епілепсія є однією з найпоширеніших форм фокальної епілепсії. Приблизно 6 із 10 людей з фокальним типом епілепсії мають скроневу епілепсію.

За місцем початку та розповсюдження нападу, виділяють два типи скроневої епілепсії:

- медіальна скронева епілепсія (приблизно 80% всіх скроневих нападів), виділяється при залученні медіальних або внутрішніх структур скроневої долі. Напад зазвичай починається у гіпокампі та розповсюджується на сусідні зони;
- неокортикальна або бічна скронева епілепсія, виділяється при залученні зовнішніх частин скроневої долі (Hannah Klein, 2019).

Синдром медіального скроневого склерозу - це приклад структурного ураження (рубцювання гіпокампа), при якому напади дуже часто не піддаються контролю, а єдиним виходом залишається оперативне втручання (Thom *et al.*, 2010; Bernhardt *et al.*, 2013). Напади починаються у медіальній скроневої області та проявляються судомою кінцівок і загальним тонічним напруженням, зміною чутливості, погіршенням пам'яті та поведінковими девіаціями. Дуже часто напади розповсюджуються на сусідні ділянки, та стають складно керованими. Після того, як медикаментозна терапія не приносить результатів, призначають оперативне втручання. Широкі лабораторні дослідження проводились для виявлення механізмів походження та розповсюдження нападів, за якими було виявлено, що порушення ГАМК-ергічного гальмування, збільшення синаптичної збудливості за рахунок проростання аксонів та функціональні зміни іонних каналів відіграють важливу роль у патофізіологічних процесах розвитку скроневої епілепсії (Liu *et al.*, 1995; Buckmaster, 2004; Dudek and Sutula, 2007; Joshi *et al.*, 2013).

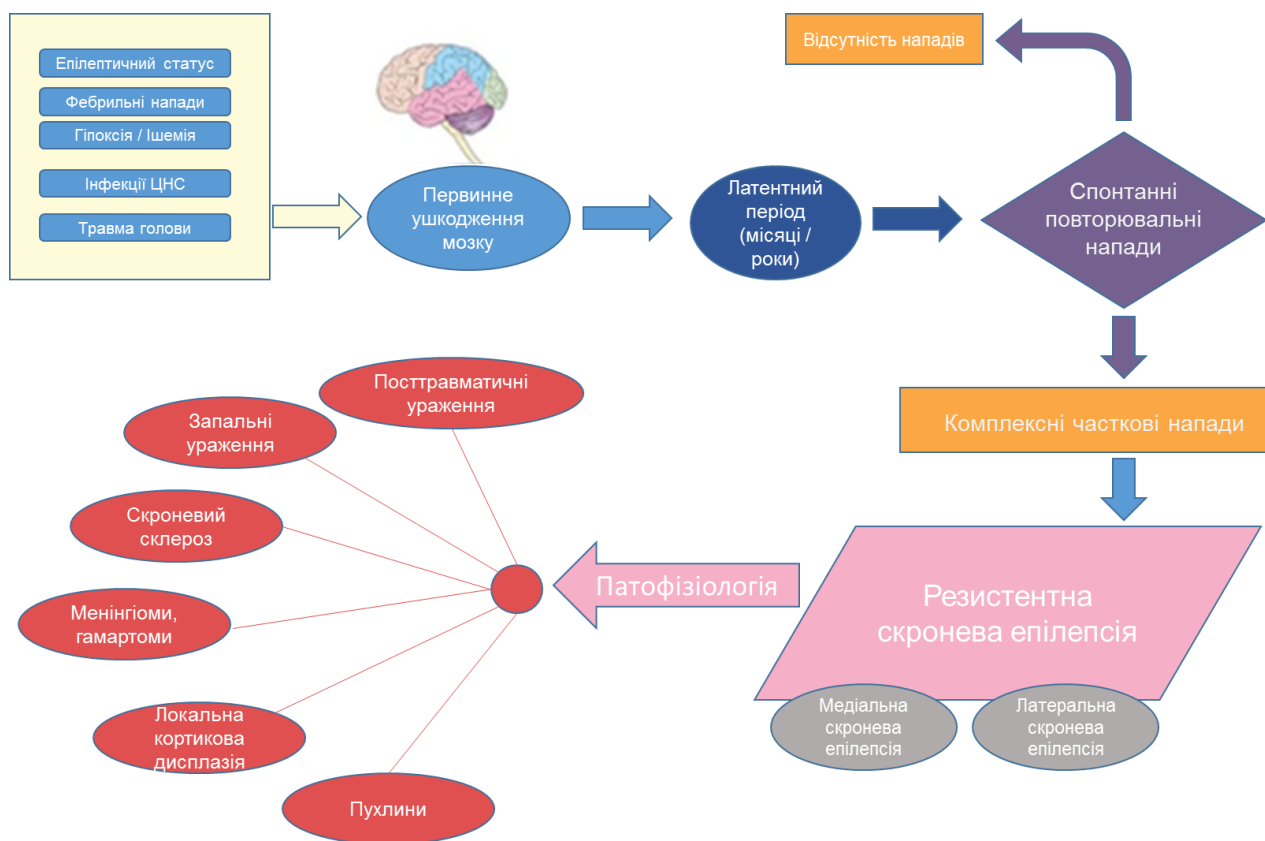


Рис. 2 - Етапи розвитку скроневої епілепсії. Зі змінами за (Nirwan et al., 2018).

Такі фактори як епілептичний статус, фібрильні напади, інфекції центральної нервової системи, гіпоксія та травма голови можуть призводити до мозкового інсульту, за яким настає латентний період без нападів, який переходить у хронічну фазу з спонтанними повторювальними нападами (Рис.2).

Процес епілептогенезу включає в себе три стадії: 1) первина провокуюча травма, 2) латентний (без нападів) період, та 3) розвиток скроневої епілепсії, який виявляється у виді спонтанних повторюваних нападів (СПН), які можуть з'явитися, а можуть і ні, протягом усього життя (Williamson et al., 1993; Sutula, 2004). Третя стадія характеризується як хронічна гіперзбудливість та гіперсинхронність. Це проявляється як повторювані неспровоковані фокальні напади з, вторинною генералізацією або без неї (Cavazos et al., 2004), і асоціюється зі змінами в нейронних мережах (синаптична реорганізація) та змінами на клітинному рівні (запалення, нейродегенерація у CA1 та CA3 зонах, астроцитоз (Chebib and Johnston, 1999; Goldberg and Coulter, 2013).

1.2 Гематоенцефалічний бар'єр та його роль у розвитку епілепсії

Епілепсію раніше вважали передусім захворюванням нейронів, викликаним дисфункцією іонних каналів. Однак фокус сучасних досліджень було змінено на розуміння та контроль інших механізмів, що беруть участь у патогенезі та розвитку захворювання, включаючи нейродегенерацію, нейрогенез, гліоз, запалення та порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) (Friedman A. and Heinemann U., 2012). Ці процеси впливають один на одного, і іноді незрозуміло, який з них є початковим фактором, а який результатом. Їх розуміння важливе для визначення нових терапевтичних цілей та біомаркерів, які могли б допомогти індивідуалізувати лікування, та розробити нові стратегії доставки ліків (Han *et al.*, 2017). Ще у 70-х роках висловлювали припущення що напади можуть пошкоджувати гематоенцефалічний бар'єр та викликати порушення у транспортуванні або дифузії певних хімічних речовин між кров'ю та тканиною мозку (Jasper, 1970). По суті, порушення проникності ГЕБ, як правило, пов'язано з потраплянням різних компонентів крові до ЦНС (Friedman A. and Heinemann U., 2012; van Vliet *et al.*, 2015). Підвищена проникність ГЕБ при епілепсії спостерігається локально, та часто перекривається з епілептогенною тканиною мозку. Події, що призводять до розладу ГЕБ, різноманітні і зазвичай складаються з важкого, гострого або хронічного пошкодження мозку (Friedman A. and Heinemann U., 2012; Pitkänen *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017). Так, епілептичний статус (ЕС) - стан, який характеризується постійними епілептичними нападами, - пов'язують з різкими патологічними судинними реакціями, які призводять до зменшення енергозабезпечення клітин та погіршення метаболізму, що сприяє пошкодженню клітин, зокрема клітин ГЕБ (Friedman, 2011). Але також було показано, що порушення ГЕБ у гризунів призводить до розвитку непровокованих нападів, подібно до пацієнтів, у яких ГЕБ був тимчасово відкритий для лікування лімфоми мозку (Marchi *et al.*, 2007a).

Такі дані підкреслюють двосторонній зв'язок між порушеннями ГЕБ та епілептогенезом.

Знання про функцію ГЕБ у розвитку епілепсії були здобуті за допомогою тваринних моделей (наприклад, літій-пілокарпінової та каїнатної моделі скроневої епілепсії), а також за допомогою медичної візуалізації на людях, як при епілепсії, так і при інших порушеннях мозку. Додатковим джерелом унікальної інформації про епілепсію, є тканини мозку людини, отримані від пацієнтів з резистентною формою епілепсії, через нейрохірургічні операції, спрямовані на резекцію епілептогенної тканини мозку. Оскільки епілепсія скроневої частки, яка зазвичай виникає в медіальних структурах, є найпоширенішою формою лікарсько-стійкої епілепсії у дорослих і дуже добре реагує на хірургічне лікування, багато досліджень на людях були зосереджені саме на гіпокампі, основній епілептогенній структурі в скроневої частці. Дослідження на тваринах в основному зосереджувались і на гіпокампі, як на паралельному захворюванні відносно людини, так і тому, що хронічна епілепсія з вогнищами у гіпокампі легко відтворюється на тваринних моделях з тривалим хімічно-індукованим епілептичним статусом (Han *et al.*, 2017).

1.2.1 Структурні та функціональні порушення ГЕБ в умовах епілепсії

Церебральний кровоток і функція ГЕБ підтримуються нервово-судинною одиницею, що складається з капілярних ендотеліальних клітин мозку, перицитів, астроцитів та нейронів. Основний структурний бар'єр знаходиться в ендотеліальних клітинах, які мають безперервні щільні з'єднання, відсутність просвітів та характеризуються низькою піноцитозною активністю. Таким чином, парацелюлярне переміщення через ендотеліальні клітини головного мозку є незначним, особливо в порівнянні з іншими проникливими бар'єрами, такими як верхня частина тонкої кишки (Sugano *et al.*, 2010).

Щільні контакти містять комплекси трансмембранних білків, включаючи окклюдин та клаудини, молекули зчеплення та агдезії, а також деякі

цитоплазматичні білки zonula occludens (ZO; TJP1) (Obermeier *et al.*, 2013). Було виявлено що експресія деяких з цих білків змінюється при епілептичних станах. Рівень матричної РНК (мРНК) клаудіну-8 (CLDN8) поступово знижувався у гіпокампі щурів з нападами (Lamas *et al.*, 2002), а білки ZO-1 та клаудин-5 знижувались *in vitro* у результаті каїнатного моделювання епілептоформних подій (Morin-Brureau *et al.*, 2011). Також, (Rigau *et al.*, 2007) спостерігали нерегулярне та розривне імуофлуоресцентне фарбування ZO-1 у мікросудинах пацієнтів із скроневою епілепсією та у щурів з літій-пілокарпіновою моделлю епілепсії. У щурів зниження ZO-1 супроводжувалося витоком IgG (імуноглобуліни класу G). Ці зміни були очевидними на початку та після ЕС, а також під час латентного та хронічного періодів розвитку епілепсії. Окрім так званого «структурного бар'єру», якій складається з ендотеліальних клітин, відділяють ще «метаболічний бар'єр», який утворюється ферментами, що здатні метаболізувати ендогенні сполуки та ксенобіотики, та може додатково обмежувати передачу через ГЕБ малих молекул, включаючи анти-епілептичні препарати (АЕП) (Han *et al.*, 2017). Кілька ферментів цитохрому P450 (CYP) та інших ферментів, які беруть участь у метаболізмі АЕП, були виявлені у ГЕБ гризунів та людини, більшість з яких були виявлені на рівні мРНК. Крім того, ферментативну активність Cyp450, епоксид гідролази та UDP-глюкуроносілтрансферази (UGT) виявляли в мікросудинах, виділених з головного мозку щурів (Gherssi-Egea *et al.*, 1994).

Нещодавно проведене дослідження оцінило транскриптом метаболізуючих ферментів у мікросудинах мозку людини, виділених у чотирьох пацієнтів з епілепсією та трьох з олігодендрогліомою, а також протеом додаткових п'яти пацієнтів з епілепсією (Shawahna *et al.*, 2011). Рівні транскрипції метаболізуючих ферментів у зразках кори, отриманих у пацієнтів з епілепсією та олігодендрогліомою, були аналогічні рівням у контрольних зразках. Автори припустили, що на схему експресії ферментів у мозку цих пацієнтів по суті не впливає стан хворого або медикаментозна терапія. На

відміну від цього, в іншому дослідженні у зразках мозку та в первинних ендотеліальних клітинах головного мозку людини, отриманих від пацієнтів із стійкою до медикаментів епілепсією, було виявлено збільшений судинний рівень білка CYP3A4 та відповідної мРНК разом із підвищеним метаболізмом карбамазепіну (Ghosh *et al.*, 2010).

Також було показано, що ензим UGT1A4 (UDP-glucuronosyltransferase 1-4), який у звичайному стані не виявляється протеомічними методами у ГЕБ людини, надмірно експресується в ендотеліальних клітинах головного мозку у пацієнтів з резистентною до ліків епілепсією порівняно з контрольними мікросудинними ендотеліальними клітинами мозку людини. Підвищена експресія була пов'язана зі збільшеним метаболізмом ламотригіну (Ghosh *et al.*, 2013). Такі зміни в активності ферментів потенційно можуть бути причетні до стійкості до АЕП, продукування токсичних метаболітів або інших біохімічних процесів в епілептогенному мозку. Однак, їх фактичний вплив на церебральний розподіл АЕП ще не з'ясовано.

Причинно-наслідкові зв'язки між епілепсією та порушенням ГЕБ залишаються ключовим питанням. Поки що доказів того, що пошкодження ГЕБ є прямим наслідком нападів і навпаки, недостатньо.

За допомогою фарбування пероксидазами було показано, що у щурів, в яких викликали напади за допомогою електричного розряду, порушення ГЕБ було пропорційне кількості викликаних нападів (Petito *et al.*, 1977). Ці дані говорять про причинно-наслідковий зв'язок між кількістю нападів та порушенням ГЕБ. Marchi *et al.*, 2007b) вимірювали проникність ГЕБ та інтенсивність запальних процесів *in vivo* на початку індукованого пілокарпіном ЕС. Через тридцять хвилин після ін'єкції пілокарпіну спостерігалось збільшення маркерів запалення та проникності ГЕБ, що дозволяє припустити, що частина епілептогенних ефектів пілокарпіну пов'язана з порушенням ГЕБ. В іншому дослідженні вивчали тканину мозку щурів, які зазнавали електричної стимуляції для індукції нападів та хронічної епілепсії, а також тканини мозку людей з

епілепсією (van Vliet *et al.*, 2007). У людей імуногістохімічний аналіз показав наявність альбуміну в гіпокампі після перенесеного епілептичного нападу. Схожа картина спостерігалась і у щурів в гострому, латентному та хронічному періодах розвитку епілепсії та була залежною від кількості нападів. Разом ці та інші дослідження говорять про те, що порушення ГЕБ супроводжує гострі напади, а також хронічну епілепсію, незалежно від методу їх індукції в різних тваринних моделях епілепсії. Зазвичай порушення ГЕБ внаслідок експериментального пошкодження мозку є двофазним. Проникність ГЕБ досягає максимуму протягом декількох годин, потім вона знижується, і настає затримка до початку другої фази, яка може тривати від декількох днів до тижнів після травми (Friedman, 2011).

Взаємозв'язок між нападами та проникливістю ГЕБ є двобічним. Так, у щурів пошкодження ГЕБ за допомогою манітолу призвело до розвитку ЕЕГ активності, яка відповідала епілептичним нападам та яка зберігалася протягом декількох годин після введення манітолу (Fieschi *et al.*, 1980). Напади також спостерігалися у великої частки пацієнтів, які зазнали порушення ГЕБ у наслідок хіміотерапевтичного лікування новоутворень головного мозку, хоча спочатку припускали що причина у контрастній речовині (Neuwelt *et al.*, 1983). Також було показано, що гостре пошкодження ГЕБ призводить до нападів як у людей, так і у свиней з моделлю гострого пошкодження ГЕБ (Marchi *et al.*, 2007a). Однак механізми та сигнальні шляхи, які залученні до розвитку епілепсії у наслідок порушення ГЕБ, залишаються не до кінця вивченими.

Білкові компоненти крові, такі як тромбін або альбумін, у нормі не здатні проникати через ГЕБ та зазвичай присутні у мозку в дуже незначних концентраціях (Breuer *et al.*, 2017; Pardridge, 2012). Однією з теорій, що пояснює розвиток епілепсії у наслідок травми мозку, є проникнення цих компонентів до мозкового міжклітинного простору у наслідок підвищеної проникності ГЕБ. Зараз є суттєві докази того, що окрім своєї ключової ролі в згортанні, тромбін бере участь у багатьох механізмах, важливих для нормальної роботи мозку та під

час патологічних станів, що включають аномальну синхронізацію нейронів, нейродегенерацію та запалення (Luo *et al.*, 2007; Ben Shimon *et al.*, 2015).

1.3 Тромбін та рецептор до нього PAR1

1.3.1 Тромбін та його функції

Гемостаз - це фундаментальний біологічний процес, завдяки якому клітинні, а також білкові компоненти в крові утворюють згусток для зупинки кровотечі з травмованих судин (Jana Kalz *et al.*, 2013). Він складається з каскаду молекулярних подій, що призводять до активації тромбіну, який каталізує перетворення фібриногену у фібрин, з якого утворюється згусток (Siller-Matula *et al.*, 2011). Тромбін - це серинова протеаза, яка активується ферментативним розщепленням двох протромбінових ділянок за допомогою активованого фактора X (FXa). Активність FXa посилюється шляхом зв'язування з активованим фактором V (FVa), який утворює протромбіназний комплекс з FXa (Furie and Furie, 2007).

Людський протромбін, або фактор II, складається з 622 амінокислот, його вага становить 72 кДа і має 4 домени: N-кінцевий γ -карбоксихлутаматний домен, домен серинової протеази та ще два домени, що за формою нагадують вісімку. Після активації ензим (тромбін) складається лише з N-кінцевого домену та домену серинової протеази, який складається з двох поліпептидних ланцюгів А (36 амінокислотних залишків) та В (259 амінокислотних залишків), що ковалентно поєднані дисульфідним зв'язком (Рис 3). Активний сайт містить дві петлі, що його оточують, - 60-петля та γ -петля. Окрім активного сайту, тромбін має два електропозитивних екзосайта: аніон-зв'язуючий екзосайт I та II. Таку назву вони мають завдяки високій афінності до негативно заряджених лігандів (Earl W. Davie and John D. Kulman, 2006; Chahal *et al.*, 2015).

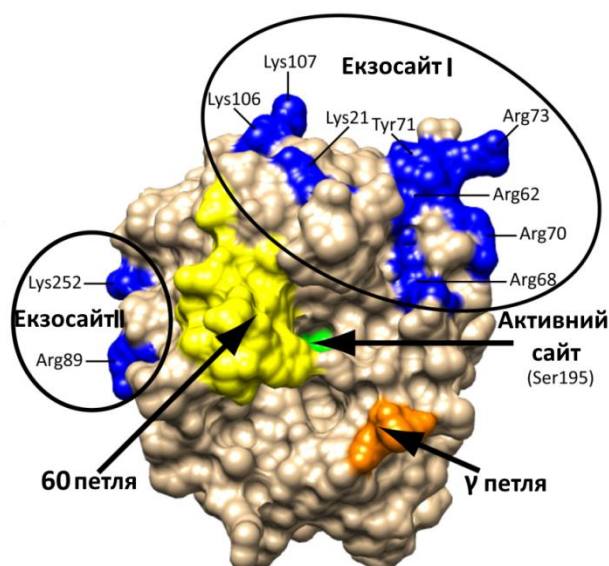


Рис. 3 - Схематична 3D модель тромбіну. Зі змінами за (Chahal *et al.*, 2015).

Протромбін виробляється в печінці і модифікується за допомогою вітамін К-залежної реакції, яка перетворює 10 глютамінових кислот протромбіну в гамма-карбоксиглутамінову кислоту (Gla). У присутності Ca^{2+} залишки Gla сприяють зв'язуванню протромбіну та інших факторів згортання з фосфоліпідами. Дефіцит вітаміну К або прийом антикоагулянтного варфарину, гальмує вироблення залишків Gla та уповільнює активацію згортання (Huang *et al.*, 2003). В рамках своєї активності в каскаді згортання тромбін також сприяє активації та агрегації тромбоцитів (Borissoff *et al.*, 2011).

І навпаки, тромбін ініціює механізм зворотного зв'язку, що призводить до власного гальмування. Після зв'язування з тромбомодуліном, інтегральним білком мембрани, експресованим ендотеліальними клітинами, тромбін активує та підвищує спорідненість до протеїн С. Активований протеїн С (aPC) в свою чергу призводить до інактивації комплексу протромбінази (= FХа + FVa) на ділянках з інтактним ендотелієм (Mosnier *et al.*, 2014). Крім того, вільно циркулюючий тромбін блокується антитромбіном-III, інгібітором серинової протеази, який посилюється у своїй активності антикоагулянтним гепарином (Jo *et al.*, 2014). У сукупності активність тромбіну в крові жорстко регулюється набором позитивних і негативних зворотних зв'язків, які сприяють згортанню в

кінця. Їх активація ініціюється незворотним, сайтоспецифічним протеолітичним розщепленням у N-кінцевій позаклітинній області, яка виявляє прив'язаний ліганд, що активує протеїни $G_{\alpha q}$ / 11, $G_{\alpha i}$ / o або $G_{\alpha 12}$ / 13 (Traynelis and Trejo, 2007). Механізм активації ПАР більш за все вивчений для ПАР1 (Coughlin, 2000). Активатор ПАР1, тромбін, зв'язується з N-кінцем (послідовність LDPR⁴¹–S⁴²) і розриває пептидний зв'язок між аргініном та серином (R⁴¹–S⁴²). Таким чином, ця нова послідовність виступає у якості ліганда, який зв'язується у консервативній області другої петлі, і ініціює активацію сигнального каскаду у клітині (Wojtukiewicz *et al.*, 2015). Відомо, що ПАР1 зв'язаний з $G_{\alpha q}$ -, $G_{\alpha i}$ -, $G_{\alpha 12/13}$ - та $G_{\beta\gamma}$ -субодиницями, а також опосередковує β -арестинний шлях (Vu *et al.*, 1991; Davie and Kulman, 2006).

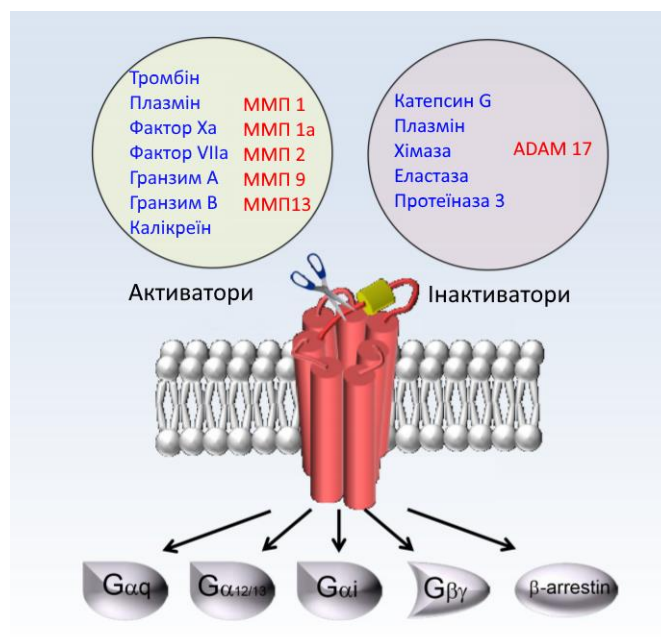


Рис. 5 - Схематичне зображення рецептору ПАР1, його активаторів та інактиваторів, дія яких реалізується за рахунок протеолізу: синім позначені серинові протеази, червоним - матричні металопротеази (ММП). Зі змінами (Flaumenhaft and Ceunynck, 2017).

Активація ПАР може запускати кілька внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, залежно від активуючого ліганду, певної G_{α} -субодиниці. (Russo *et al.*,

2009). Це різноманіття сигнальних шляхів та залежність від типу активуючого ліганду є причиною різноманіття впливу ПАР (Russo *et al.*, 2009; Bourgoignon *et al.*, 2013).

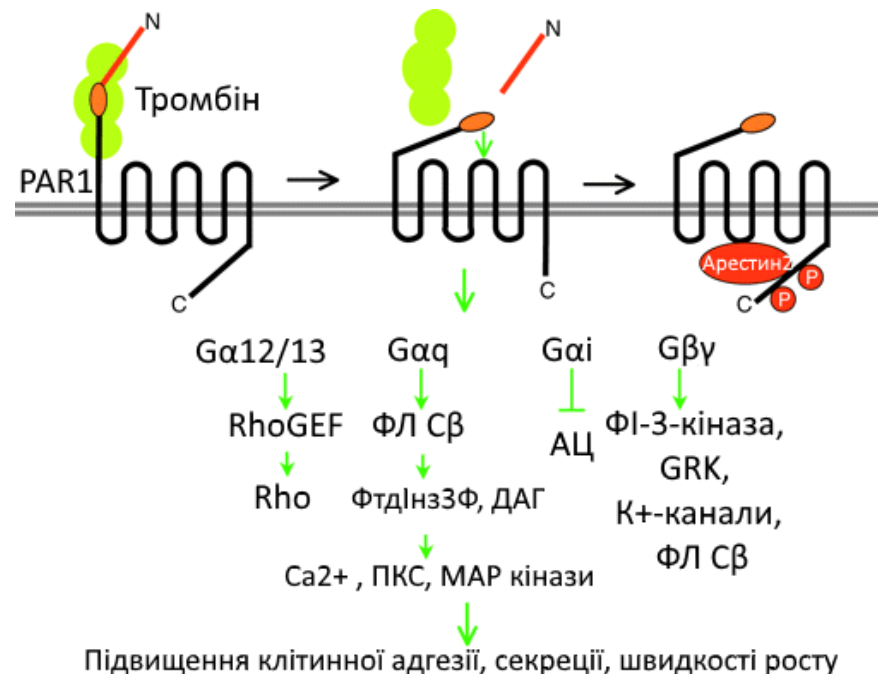


Рис. 6 - Сигнальні клітинні каскади опосередковані активацією ПАР 1: ФІ-3-кіназа - фосфоінозитид-3-кіназа, ФЛ Сβ - фосфоліпаза Сβ, АЦ – аденілат циклаза, ФтдІнз3Ф - фосфатиділінозитол-3-фосфат, ДАГ – диацилгліцерол, ПКС - протеїн кіназа С. Зі змінами за (Steinberg, 2005).

Гетеротример, який складається із ПАР1 та $G_{\alpha q}$, веде до активації фосфоліпази Сβ, що запускає процес гідролізу фосфоінозиту, що у свою чергу індукує синтез інозитол-1,4,5-трифосфату та диацилгліцеролу, мобілізації Ca^{2+} , активації протеїн кінази С та MAP кіназного шляху (Рис 5). Комплекс ПАР1 з $G_{\alpha 12/13}$ активує малі G-білки, Rho та Rac. Комплекс $G_{\alpha i}$ з ПАР1 веде до інгібування аденілат циклази. $G_{\beta \gamma}$ активує фосфоінозитид-3-кіназу, кінази рецепторів, що зв'язані з G-білками (G-protein-coupledreceptorkinases, GRKs), K^+ -канали та фосфоліпазу Сβ. За рахунок фосфорилування та зв'язування з арестином ПАР1 від'єднується від G-білків. Усі ці каскади ведуть до підвищення проліферації клітин, покращення адгезії та секреції запальних інтерлейкінів (Coughlin, 2000;

Aroga *et al.*, 2007; Wojtukiewicz *et al.*, 2015). Рецептори, що активуються протеазами, представлені майже у всіх типах клітин у кровоносній системі (безпосередньо у крові та у клітинах судин, окрім еритроцитів): фібробластах, міоцитах, ендотеліальних клітинах, тромбоцитах, макрофагах, лейкоцитах (Austin *et al.*, 2013). Також ці рецептори є у епітелії, нейронах, астроцитах та імунних клітинах (Wojtukiewicz *et al.*, 2015).

1.4 Тромбін та ПАР1 у ЦНС

Тромбін і його неактивний попередник протромбін також були виявлені в мозку (Dihanich *et al.*, 1991; Xi *et al.*, 2003). Протромбінова мРНК проявляє найвищу експресію в корі головного мозку і помірну експресію в гіпокампі і мозочку (Dihanich *et al.*, 1991). У гіпокампі виражена імуногістохімічна мітка тромбіну спостерігається в шарах пірамідальних клітин, тоді як нижній (кластеризований) сигнал тромбіну спостерігається у молекулярних шарах. Хоча точне клітинне джерело тромбіну в мозку та молекулярні механізми, що відповідають за його утворення та вивільнення, вимагають подальшого дослідження, були отримані експериментальні докази того, що експресія нейронального тромбіну та активність тромбіну сильно регулюються у фізіологічних та патологічних умовах (Xi *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2015). Отже, молекулярна техніка сигналізації тромбіну/ПАР1 виявляється не тільки в судинній системі, але і присутня в тканинах мозку, де вона, здається, діє як модулятор нейронної пластичності (Ben Shimon *et al.*, 2015).

У ЦНС рецептори, що активуються протеазами, відіграють важливу роль у процесах пошкодження та запалення. У людини наявні 4 типи таких рецепторів: ПАР1, ПАР2, ПАР3 і ПАР4. Відомо, що ПАР1 є найбільш розповсюдженим серед цієї родини (Wojtukiewicz *et al.*, 2015). Цікаво, що ПАР також експресуються в головному мозку, і хоча ПАР2 являє собою клас рецепторів, активованих трипсином/триптазою, ПАР1, ПАР3 та ПАР4 найбільш ефективно активуються тромбіном (Gingrich and Traynelis, 2000). ПАР1 в мозку виявлено як

в нейронах, так і в астроцитах, при цьому останні демонструють більш сильний імуногістохімічний сигнал в мозковій тканині людини (Junge *et al.*, 2004). Високий рівень PAR1 виявлений у гіпокампі, смугастому тілі та корі головного мозку людини (Junge *et al.*, 2004). Хоча точні молекулярні шляхи, активовані нейронним PAR1, ще вивчаються, виявлено, що в мозку активація PAR1 модулює синаптичну передачу та пластичність завдяки посиленню струмів НМДА-рецепторів (Gingrich *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2014; Vance *et al.*, 2015). Крім того, повідомлялося, що тварини з дефіцитом PAR1 мають зміни в процесах навчання та пам'яті, залежних від гіпокампу (Almonte *et al.*, 2013), що свідчить про те, що PAR1 відіграє вирішальну роль у формуванні пам'яті та синаптичній пластичності у фізіологічних умовах.

Різноманітні неврологічні стани були пов'язані зі змінами експресії PAR1 у мозку. При хворобі Паркінсона було зафіксовано значне збільшення кількості астроцитів, що експресують PAR1, у чорній речовині (Ishida *et al.*, 2006). Також є свідчення підвищення рівня тромбіну в експериментальній моделі розсіяного склерозу (Beilin *et al.*, 2005) та інших запальних захворюваннях мозку (Charman, 2006). Стимуляція PAR1 тромбіном викликає проліферацію глії та спричиняє реактивний гліоз, інфільтрацію клітин запалення та ангіогенез (Striggow *et al.*, 2001). Також, експресія PAR1 посилюється в експериментальних моделях хвороби Альцгеймера (Pompili *et al.*, 2004) та ішемії мозку (Striggow *et al.*, 2001).

Блокування PAR1 є одним із можливих підходів до запобігання запальних процесів та інших пошкоджень нервової тканини, спричинених нападом під час епілепсії. На даний момент існує 4 підходи до блокування цього рецептору, одним із яких є ортостеричне інгібування, при якому блокатор майже незворотно приєднується до ліганд-зв'язуючого сайту на зовнішньоклітинній поверхні. Відомими на сьогоднішній день блокаторами, які здатні до даного типу інгібування, є SCH79797, атопаксар та ворапаксар (Flaumenhaft and Ceunynck, 2017).

1.5 Роль тромбіну та PAR1 рецептора у розвитку епілепсії

Хоча в нервовій тканині серинові протеази експресуються в дуже низькій концентрації (Luo *et al.*, 2007), їх рівень значно збільшується в мозку після порушення ГЕБ. У цьому стані відбувається значне, неселективне збільшення проникності капілярів мозку та тісних з'єднань, так, що білки з високою молекулярною вагою (Ballabh *et al.*, 2004) та інші компоненти крові отримують доступ до мозку. Ця подія трапляється при деяких неврологічних станах (Ballabh *et al.*, 2004; Tomkins *et al.*, 2008) включаючи геморагічний / ішемічний інсульт (Bang *et al.*, 2009; Ivens *et al.*, 2010) та травму мозку (Itzekson *et al.*, 2014). Незважаючи на те, що кількість інформації щодо кількості тромбіну, який доляє ГЕБ, недостатня, повідомляється, що рівень данної сполуки збільшується більш ніж у 200 разів (зі 100 пМ до 25 нМ) у спинномозковій рідині пацієнтів із субарахноїдальним крововиливом (Suzuki *et al.*, 1992). Крім того, якщо кровотеча відбувається безпосередньо всередині тканини мозку, активний тромбін та інші протеази вільно дифундують у паренхіму мозку (Suzuki *et al.*, 1992). Прямим наслідком контакту тромбіну з тканиною мозку є почастищення нападів (Lee *et al.*, 1997). Було показано, що внутрішньомозкові ін'єкції тромбіну призводять до появи епілептиформної активності. Цікаво, що введення тромбіну разом з його інгібітором альфа-NAPAP запобігало появі як клінічних, так і електрографічних нападів (Lee *et al.*, 1997). Аналогічно, у мишей, у яких не вистачає Nexin-1, ендогенного інгібітора тромбіну, є підвищена сприйнятливність до нападів, спричинених каїнатною кислотою (Lüthi *et al.*, 1997).

Подальші дослідження продемонстрували, що індуковані тромбіном судоми опосередковуються активацією PAR1 (Maggio *et al.*, 2008). У гіпокампальних зрізах тромбін у концентрації 5 нМ (1 ОД / мл) посилював спонтанну активність пірамідальних клітин CA3 (Maggio *et al.*, 2008). Для вивчення впливу тромбіну на розвиток епілептичної активності в умовах, що імітують порушення ГЕБ в зрізі, тромбін додавався при підвищених рівнях K⁺ або глутамату (Chen and Swanson, 2003; Beart and O'Shea, 2007; Ben Shimon *et al.*,

2015). У нормі, додавання 4 мМ K^+ до зрізів мозку не спричиняло появу спонтанної епілептоформної активності, яка була чітко видна при збільшенні K^+ до 15 мМ. Аналогічно, глутамат у концентрації 100 мкМ, на відміну від 500 мкМ, не викликав появу спонтанної епілептоформної активності у зрізі. У присутності тромбіну, епілептиформна активність виникала нижчих концентраціях K^+ (4 мМ) та глутамату (100 мкМ). Такий вплив тромбіну на прояви епілептиформної активності був опосередкований ПАР1, оскільки він імітував дію агоністу ПАР1 (PAR1-AP) і блокувався інгібітором ПАР1 (SCH79797).

Гіпокамральні зрізи молодих постнатальних щурів (P6 до P15), піддавали впливу великим концентраціям тромбіну (10 ОД/мл), і виявили, що тромбін деполаризує мембрану нейронів і створює гіперполяризуючий зсув чутливого до тетродотоксину струму (INap) через ПАР1-залежний механізм дії (Isaeva *et al.*, 2012). Крім того, повідомлялося, що тромбін впливає на синаптичну передачу в нейронах гіпокампа СА3 шляхом підвищення як частоти, так і амплітуди мініатюрних збуджуючих постсинаптичних потенціалів (mEPSC), зменшуючи при цьому частоту і амплітуду мініатюрних гальмівних постсинаптичних потенціалів (mIPSC; Maggio *et al.*, 2013). Також інгібування ПАР1 за допомогою SCH79797 після ЕС призводило до зниження розвитку хронічної епілепсії та смертності від неї, збільшенню виживання нейрональних клітин у гіпокампі, зменшенню інтер-іктальних спалахів активності мозку, та поліпшенню електрографічного та поведінкового нападів після ЕС (D. Isaev *et al.*, 2015). Разом ці дослідження показали про-епілептичний ефект тромбіну, який індукує мембранні та синаптичні зміни, що призводять до нападів через активацію ПАР1. Однак вплив спричиненого тромбіном підвищення активності нейронів на розвиток епілепсії на більш пізній стадії, залишається незрозумілим. Якщо тромбін справді грає важливу роль у розвитку нападів у цьому стані, то потрібні подальші дослідження можливості використання антагоністів ПАР1 та/або інгібіторів тромбіну як потенційних проти-епілептичних препаратів.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В даній роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця та мали вільний доступ до їжі та води. Всі протоколи досліджень та експерименти відповідають положенням Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 року), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 р) та інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі, що було підтверджено комітетом біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця (Київ, Україна) згідно з протоколу № 2/20 від 26.02.2020.

2.1 Тваринні моделі епілепсії

Для вивчення та розуміння процесів, які полягають в основі епілепсії, вибір відповідної тваринної моделі, яка імітує людську скроневу епілепсію, є дуже важливим етапом при проведенні дослідів. Тваринні моделі дають змогу на системному рівні досліджувати ефективність та безпечність нових проти-епілептичних ліків. Різні патофізіологічні зміни, такі як гіпокампальний склероз, різні ураження, розростання збуджувальних, глутаматергічних мохоподібних волокон та спонтанні повторювані напади можуть бути відтворенні за допомогою тваринних моделей епілепсії (табл. 1).

Таблиця 1

Тваринна модель	Запропонований механізм	Метод та дози	Тип нападу	СПН	Нейродегенерація	Обмеження
Каїнатна модель	Агоніст AMPA та КА рецепторів	Сис./ ВГ ін'єкція у дозі 0.4-2 мкг (щури)	Лімбаїчний ЕС та тоніко-клонічні судоми	+	Тяжка	Висока смертність, варіативність чутливості до нападів, нейродегенерація може бути не викликана ЕС
Пілокарпінова модель	Активация М1 та НМДА рецепторів	Сис./ ВГ ін'єкція у дозі 100-400 мкг/кг (щури)	Лімбаїчний ЕС та тоніко-клонічні напади	+	Тяжка	Висока смертність, множинні місця ураження
Органофосфатна модель	Інгібування АСhE та підвищення вивільнення глутамату	ВГ/периферійна ін'єкція	Лімбаїчний ЕС	+	Тяжка	Висока смертність пов'язана з токсичними речовинами
Флоротилова модель	Відкриття Na каналу інгібує синтез ГАМК	Інгаляція 40 мкл/хв	Тоніко-клонічні напади	Немає у дорослих	Помірна	Швидкість випаровування в залежності від атмосферних умов
Електрична модель (стимуляція перфорантного шляху)	Одностороння стимуляція перфорантного шляху	20 Гц стимуляція (0,2 -0,4 мс) протягом 10-12 днів після	Складні часткові напади	+	Тяжка	Трудомістка, тривала затримка
Гіпоксично-ішемічна модель	Зниження кров'яного тиску O ₂ приводе до нападів спровокованих асидозом	Щурята піддаються впливу кисню концентрацією 4-7% протягом 15 хв	Повторювальні короткі тоніко-клонічні напади	+	Тяжка	Чутливість до нападів змінюється від лінії та віку
Гіпертермічна модель	Підвищення температури тіла провокує напади	Підвищення температури тіла до 41 С ⁰	Нерухомість, автоматизм обличчя, фібрильні напади	+	Мінімальна	Вірогідність смерті під час ініціації
Модель ударної травми	Розвиток пост-травматичного мозкового ураження	Ін'єкція під тиском у 2 атм під тверду мозкову оболонку	Генералізовані тоніко-клонічні напади	+	Помірна	Трудомістка, тривала затримка, невизначене місце походження нападів
Тетанотоксична модель	Блокування вивільнення ГАМК та гліцину	ВГ ін'єкція	Складні часткові напади	+	Помірна	Важка в обробці, висока смертність
Гентична (аудіогенна модель)	Гризуні генетично чутливі до звуку	Звукова стимуляція	Тоніко-клонічні напади	-	Помірна	Невелика розповсюдженість генетичних моделей у дослідженні скроневої епілепсії

Примітка: AMPA - рецептор α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонової кислоти, КА - каїнова кислота, М1 - мускариновий ацетилхоліновий рецептор, НМДА - N-метил-D-аспартат, ГАМК - гамма-аміномасляна кислота, Сис. - системне введення, ВГ - внутрішньогіпокампальне введення, СПН - спонтанні повторювальні напади, ЕС - епілептичний статус.

На рисунку 7 наведені схематичні зображення патофізіології скроневої епілепсії та механізми розвитку скроневої епілепсії при різних тваринних моделях. Систематична електрична стимуляція скроневого регіону провокує напад і використовується у таких моделях як «стимуляція перфорантного шляху». При гіпертермії та у літій пілокарпіновій моделі напад розпочинається

внаслідок підвищення інтерлейкіну 1β (IL 1β) та порушення гематоенцефалічного бар'єру. Підвищення рівня глутамату провокує напад при каїнатній, пілокарпіновій, орфенадріновій та органофосфатній моделях епілепсії. Інші хімічні речовини, такі як хінолінова кислота, кобальт-гомоцистеїн, тетанус токсин також можуть провокувати напади, наприклад флюоротил через інгібування ГАМК рецептори (Nirwan *et al.*, 2018).

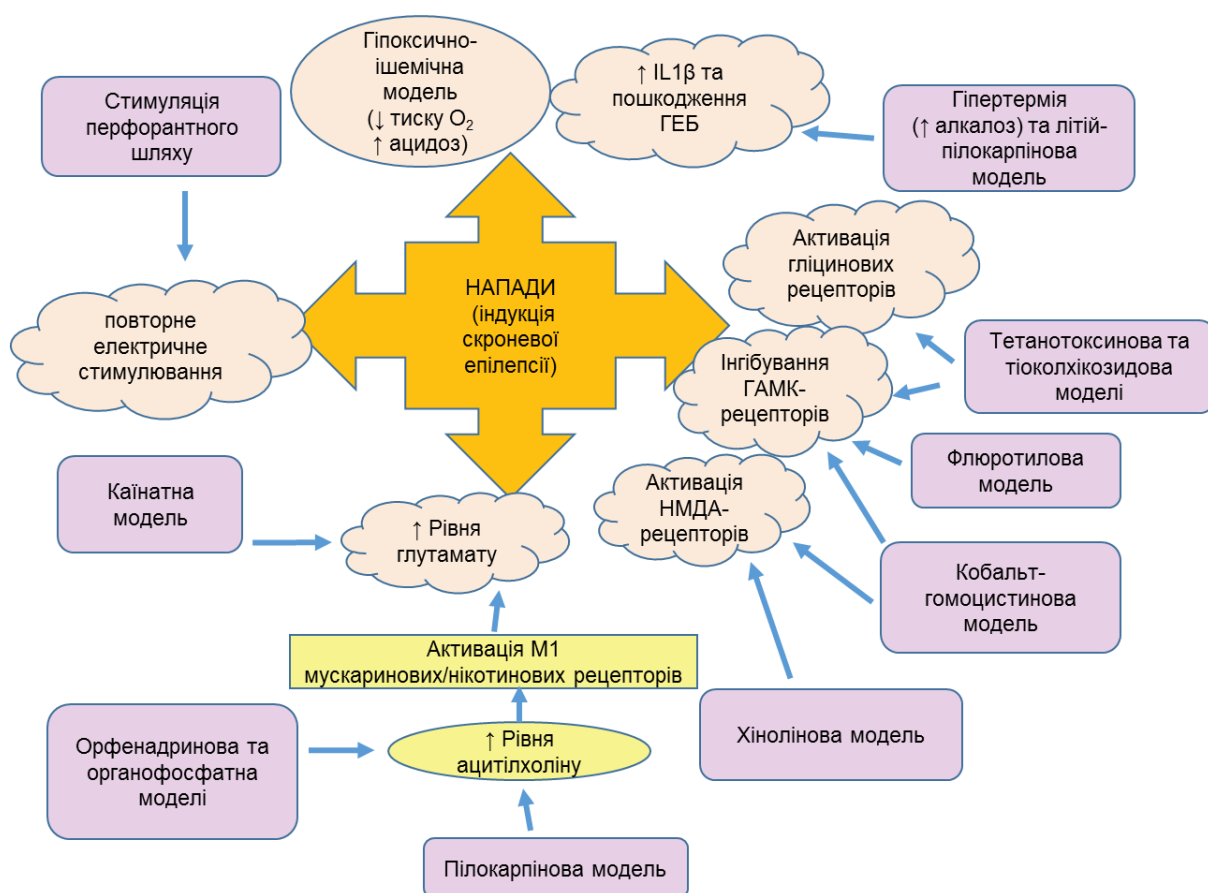


Рис. 7 – Механізми залучені до розвитку скроневої епілепсії при різних тваринних моделях. Зі змінами за (Nirwan *et al.*, 2018).

Тваринна модель скроневої епілепсії повинна моделювати основні ознаки скроневої епілепсії. Так наприклад, вогнища нападів при скроневої епілепсії зазвичай локалізовані у лімбічній системі, зокрема, у гіпокампі, енторінальній корі та мигдалині (Bartolomei *et al.*, 2005). Для скроневої епілепсії характерним є наявність так званого «латентного періоду», часового проміжку, який настає після первинної травми та характеризується відсутністю спонтанних

повторюваних нападів. Також часто спостерігається одностороннє ураження гіпокампа, що призводить до атрофії, спричиненої втратою нейронів та гліозом у різних ділянках (Mathern *et al.*, 1997). Але, жодна з існуючих моделей не відтворює всі характеристики скроневої епілепсії. Отже вибір моделі слід проводити згідно з проблемами та процесами, які будуть досліджуватися. В даному випадку нас цікавить модель, яка може максимально близько імітувати людську скроневу епілепсію, через цікавий для нас механізм розвитку, а саме пошкодження гематоенцефалічного бар'єру.

2.1.1 Літій - пілокарпінова модель

Більшість характеристик скроневої епілепсії можуть бути успішно відтворені за допомогою пілокарпінової моделі епілепсії. Було показано, що внутрішньочеревна ін'єкція пілокарпіну у дозі 400 мг/кг у щурів призводить до поведінкових та лімбічних змін, за якими через 1 – 2 години, настає розвиток епілептичного статусу та нейродегенеративних процесів (Turski *et al.*, 1983). Ця тваринна модель дуже схожа з характеристиками скроневої епілепсії у людей, тому її застосовували в багатьох лабораторіях, наприклад у вивченні ефективності антиепілептичних препаратів (Leite *et al.*, 2002).

Пілокарпінова модель має ряд важливих особливостей:

- індукція гострого ЕС при внутрішньочеревному введенні виникає швидше в порівнянні з іншими розповсюдженими моделями, наприклад з каїнатною моделлю;
- наявність латентного періоду з подальшим виникненням спонтанних повторних нападів (СПН, хронічна фаза) (Leite *et al.*, 1990; Cavalleiro *et al.*, 1991);
- виникнення широко розповсюджених уражень головного мозку, які локалізуються в тих самих областях, які постраждали у хворих на скроневу епілепсію, і пов'язані з реорганізацією мережі нейронів у регіонах гіпокампа та парагіпокампа (наприклад, проростання

мохоподібних волокон, втрата інтернейронів та клітинна проліферація зернистих клітин (Wieser, 2004);

- напади у тварин з пілокарпіновою моделлю епілепсії, так як і у пацієнтів зі скроневою епілепсією, погано піддаються контролю за допомогою протиепілептичних препаратів (Glien *et al.*, 2002; Chakir *et al.*, 2006).

Здатність пілокарпіну індукувати ЕС, залежить від активації підтипу мускаринового рецептора M1, оскільки у мишей із нокаутом відповідного гена, не виникає нападів у відповідь на пілокарпін (Hamilton *et al.*, 1997). Інші холіноміметики, такі як карбахол та оксотреморин, при ін'єкції системно або безпосередньо в мозок, також здатні викликати напади та пов'язані з ними пошкодження мозку (Olney *et al.*, 1983). Крім того, системне введення антагоністу мускаринових рецепторів атропіну, здатне запобігти розвитку ЕС індукованого пілокарпіном. Проте, атропін ефективний лише перед початком нападу, а після того, як розпочалися судоми, його ін'єкції стають неефективними, оскільки перебіг нападу залежить від інших механізмів (Clifford *et al.*, 1987). Експерименти з культивованими нейронами гіпокампа продемонстрували, що пілокарпін, діючи через мускаринові рецептори, викликає дисбаланс між збудливою та гальмівною передачею, що призводить до генерації нападів (Priel and Albuquerque, 2002). Крім того, дослідження *in vivo* показали, що пілокарпін призводить до підвищення рівня глутамату в гіпокампі після появи нападу (Smolders *et al.*, 1997). Наразі відомо що після ініціювання рецепторами M1 напади підтримуються активацією НМДА – рецепторів (Nagao *et al.*, 1996).

Зараз пілокарпінова модель широко застосовується, і вона була модифікована в ряді лабораторій. Залежно від цілей експериментів, різні групи дослідників використовують різні дози пілокарпіну, процедури попередньої обробки, лінії та види тварин (Cugia *et al.*, 2008).

Однією з найпоширеніших варіацій пілокарпінової моделі є літій-пілокарпінова модель (Lévesque *et al.*, 2016). Препарати на основі літію широко

використовуються в терапії психічних розладів, а також при лікуванні гострих травм мозку та хронічних нейродегенеративних захворюваннях (Wada *et al.*, 2005). Зазвичай хлорид літію вводять за 24 години до індукції ЕС, це дозволяє помітно знизити дозу пілокарпіну, необхідну для індукції нападу (30 мг / кг). Послідовність змін та характер поведінки, що спостерігаються у тварин під час ЕС, дуже схожі при літій-пілокарпіновому введенні порівняно з пілокарпіном, який вводився поодиночі (Honchar *et al.*, 1983). Повідомлялося, що у тварин, які отримували літій + пілокарпін, спостерігалася зменшена мінливість часу настання ЕС (Clifford *et al.*, 1987).

Зміни у поведінці тварин під час літій-пілокарпіновій ініціації корелюють зі змінами ЕЕГ активності. Спочатку в ЕЕГ з'являються поодинокі високовольтні сплески, розділені переривчастою низьковольтною активністю. З часом частота таких сплесків зростає після чого настає генералізований тоніко-клонічний напад (Jope *et al.*, 1986). У деяких тварин вентральний передній мозок (ventral globus pallidum і nucleus accumbens) був очевидним місцем виникнення електрографічних нападів, які потім поширювалися на інші ділянки. У інших тварин електрографічні напади починалися одночасно у кількох регіонах. Така різниця у локалізації виникнення електрографічних нападів спостерігалася як при дії високої дози пілокарпіну, так і при ін'єкції хлориду літію. Також нейрональні пошкодження, отримані внаслідок ініціації ЕС, були по суті подібними в літій-пілокарпіновій та пілокарпіновій моделях (Clifford *et al.*, 1987). Таким чином, синдроми, що утворюються за допомогою літій-пілокарпіну та пілокарпіну у високих дозах, не відрізняються за поведінковими, метаболічними, нейропатологічними та електрографічними ознаками. Основна очевидна відмінність, полягає у підвищеній чутливості до пілокарпіну у щурів, яким попередньо вводився літій (Clifford *et al.*, 1987). Також рівень успішного розвитку тонічно-клонічних нападів та ЕС у тварин, яким вводили хлорид літію, становить 100%, що є вищим порівняно з тим, що спостерігається при використанні високої дози пілокарпіну (близько 60%) (Goffin *et al.*, 2007).

Рівень смертності тварин у літій-пілокарпіновій моделі, як і у пілокарпіновій, залишається дуже високим при дозі пілокарпіну 30 мг/кг. Ін'єкція хлориду літію дозволяє знизити дозу пілокарпіну, що супроводжується зменшенням смертності при збереженні ефективності викликання ЕС (Jope *et al.*, 1986). Крім того, зміна порядку введення пілокарпіну та літію не призводила до розвитку нападів, хоча одночасне введення агентів призводило до нападів у 60% щурів. Також важливим є час, оскільки пілокарпін призводить до розвитку нападів лише за умов ведення протягом 24 годин після хлориду літію. Так, напади не спостерігались у тварини, які отримували пілокарпін через 48 годин після Літію (Clifford *et al.*, 1987).

Ми використовували подальшу модифікацію пілокарпінової моделі запропоновану (Glien *et al.*, 2001), в якій щурам вводили пілокарпін через 24 години після хлориду літію як разову дозу у розмірі 30 мг/кг, а тривалість ЕС обмежували до 90 хв, в результаті чого смертність становила 45%, а у 80% тих, хто вижив, розвивалися СПН. Однак було виявлено, що якщо вводити пілокарпін у розділених дозах по 10 мг/кг з інтервалом 30 хв, поки не наступить ЕС, смертність знижувалася до 7%, а 85% тварин розвивали СПН. Крім того, коли у тварин розвивався ЕС, їм вводили низьку дозу центрального м'язового релаксанту - ксилазину, який зменшував вираженість клонічних скорочень м'язів, при цьому не впливаючи на електрографічні напади (Yang *et al.*, 2006). Отже, спираючись на вказані переваги літій-пілокарпінової моделі над пілокарпіновою, та її широке використання у дослідженнях скроневої епілепсії, для наших досліджень нами було обрано протокол цієї моделі з розділеним введенням пілокарпіну.

2.2 Поведінкові тести

Тести хрестоподібний лабіринт та відкрите поле використовувалися задля вимірювання тривожності та загальної локомоторної активності (локомоторності) експериментальних тварин, також враховувалися такі

додаткові параметри: кількість вертикальних положень як показник дослідницької поведінки, кількість вмивань як показник обережності, кількість дефекацій як показник емоційного стану та кількість уринацій як показник новизни середовища. Валідність інтерпретації результатів отриманих в різних тестах неоднакова. Так, при розбіжності параметрів тривожності у різних тестах перевагу надавали тесту хрестоподібний лабіринт, а при розбіжності у локомоторності перевага надавалася тесту відкрите поле (Ramos, 2008).

2.2.1 Тест «відкрите поле»

Це методика, яка дозволяє кількісно оцінити моторну активність щурів та рівень дослідницької активності за умов незнайомого середовища, а також оцінити наявність та рівень страху, збудження або збільшення орієнтовної реакції щура (Denenberg, 1969; Pellow *et al.*, 1985). Локомоторна активність оцінювалася як загально пройдена твариною дистанція. Також оцінювалися додаткові параметри як то: пройдена дистанція у зовнішньому та внутрішньому периметрі, час проведений у зовнішньому та внутрішньому периметрі, та відсоткове співвідношення кількості пройдених внутрішніх квадрантів до загальної кількості. Експериментальна установка являла собою квадратне поле зі сторонами 100 см та висотою стінок 30 см. Установка освітлювалася двома світлодіодними лампами, кожна по 60 Вт, які розташовані на висоті 2 м. Тварина поміщалася в один із кутів установки, після чого протягом п'яти хвилин проводилася відеореєстрація. Аналіз відео проводили за допомогою процедури AutoTyping, реалізованої у програмному пакеті MATLAB. Протягом всього експерименту тварини мали вільний доступ до їжі та води. Перед початком вимірювань щури проходили адаптаційний період до нової обстановки з метою зменшення стресового стану.

Нове оточення, у якому опиняється тварина, веде до формування двох протилежних мотивацій: страху перед новим оточенням та прагненням дослідження цього оточення. Ці дві тенденції характеризуються різним часовим

ходом та різними патернами переміщення у просторі. Під час аналізу, арена умовно розподілялась на дві зони: внутрішню та зовнішню. Типовою поведінкою тварини є переважне знаходження біля стінок у зовнішньому периметрі і лише нечасті та короткі «розвідки» внутрішньої «відкритої» зони. На рисунку 8 зображено приклад траєкторії контрольного щура у експериментальній арені.

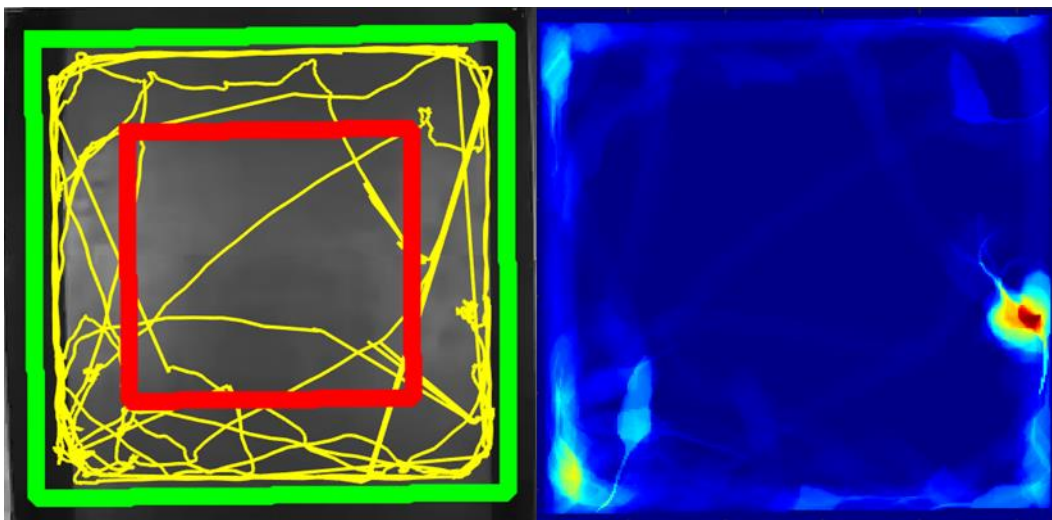


Рис. 8 - Траєкторія руху та кумулятивна карта часу місцезнаходження тварини протягом 5 хвилин тесту «відкрите поле»

Очікується, що ураження гіпокампа, та інших ділянок мозку, які є наслідком епілептичного статусу, призведе до збільшення локомоторної активності та зменшенню тривожності. Тобто щури з епілепсією повинні демонструвати збільшення загальної пройденої дистанції та кількості часу проведеному у внутрішньому периметрі (Hernan *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2016).

2.2.2 Тест «хрестоподібний припіднятий лабіринт»

Це методика дозволяє кількісно оцінити рівень тривожності щурів, а також оцінити моторну активність щурів, результати здебільшого корелюють з даними тесту «відкрите поле» (Campos *et al.*, 2013; Hoffman, 2016). Оцінка поведінки проводилися за наступними основними параметрами: загальна пройдена дистанція, кількість переходів з відкритих рукавів до закритих, кількість переходів з закритих рукавів до відкритих, час знаходження у відкритих та закритих рукавах, загальна кількість переходів та процентне відношення

переходів. Експериментальна установка являла собою підняте хрестоподібне поле з двома протилежними від-критими рукавами (50 см x 10 см) та двома закритими рукавами (50 см x 10 см x 30 см). Вся установка була піднята на висоту 50 см від підлоги. Центральна частина перехрестя являла собою квадрат зі сторонами 10 см у який на початку тесту, обличчям до відкритого рукава, розташовувалася тварина. Установка освітлювалася двома світлодіодними лампами, кожна по 60 Вт, які були розташовані на висоті 2 м. Дослід записувався на IP камеру, після чого проводилась оцінка параметрів за допомогою програмного пакету MATLAB.

Основна парадигма тесту базується на природній схильності щурів уникати відкритого оточення та тенденції до уникання виходу з більш захищених частин установки. Рівень тривожності тварин оцінювався як відношення часу, проведеного у відкритих та закритих рукавах. Тварини які проводили більше часу у відкритих рукавах мають менший рівень тривожності порівняно з тваринами, які віддавали перевагу знаходженню у закритих рукавах. Так, у нормі вважається, що протягом 5 хвилинного тесту тварини основний час проводять у закритих рукавах, але, також, деякий час приділяють для дослідження відкритих рукавів. Відповідно збільшення відвідування відкритих рукавів трактується як зменшення тривожності тварини. На Рис. 9 зображено приклад аналізу траєкторії руху щура у експериментальній арені.

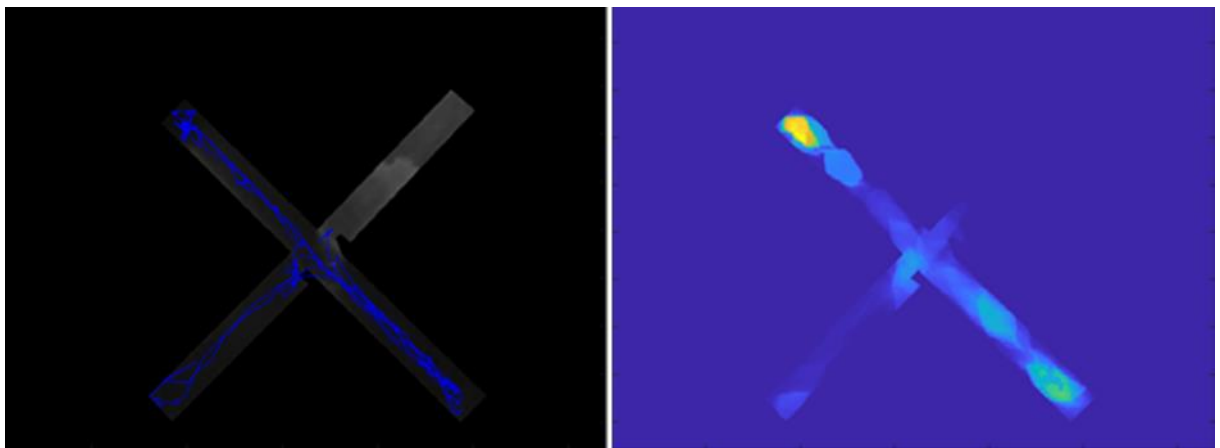


Рис. 9 - Траєкторія руху та кумулятивна карта часу місцезнаходження тварини в протягом 5 хв у тесті хрестоподібний припіднятий лабіринт

Очікується, що поведінка щурів з епілепсією у даному тесті повинна корелюватися з результатами отриманими у тесті «відкрите поле», а саме повинна збільшитись загальна пройдена дистанція, а також кількість входів та час у відкритих рукавах (Dos Santos *et al.*, 2005).

2.2.3 Тест на дослідження обумовленого страху

Це поведінкова парадигма, основана на асоціативному емоційному навчанні (Davis, 1986; Rustay *et al.*, 2009). Тварини отримували умовний стимул (conditioning stimulus), зазвичай це звуковий сигнал за яким слідує електричний розряд (unconditioning stimulus). У подальшому тварини тестувалися на наявність реакції до умовного звукового стимулу та контекстним умовам. Страх, викликаний шоком від електричного розряду, можна виразити через кількість та час завмирань (freezing) тварин. У нормі, тварини проявляють страх в обох випадках, тобто запам'ятовують обстановку і умови при яких вони отримували електричний стимул. Така поведінка може зберігатися тривалий час, що дозволяє по отриманим даним оцінювати вклад короткочасної та довгочасної пам'яті на формування поведінки.

Перед початком вимірювань тварини проходили адаптаційний період до нової обстановки з метою зменшення стресового стану. Експериментальна установка являла собою плексигласовий бокс (50 см x 40 см x 40 см) з непрозорими стінками, який розташовувався у звукоізольованій кімнаті з освітленням 600 люменів. Звуковий сигнал подавався через динамік (5 W, 8 Ом) розташований на верхній частині боксу. Шоковий стимул генерувався за допомогою прецензійного регульованого генератора під'єданого до металеві решітки розташованої на підлозі боксу. Дослід записувався на ІР камеру, після чого проводилась оцінка параметрів.

Протокол тесту складався з трьох днів. У перший день, тварини проходили процедуру адаптації. Їх саджали в установку на 5 хв без будь-яких стимулів. Другий день був «тренувальним», через 1 хв після початку експерименту,

роздавався звуковий сигнал (10 кГц, 75 дБ, 20 с) одразу після якого слідував електричний розряд (0.5 мА, 0.5 с). Загалом тварини отримували по 3 стимула с періодичністю 1 хв. На третій день, «тестовий», тварини поміщались до установки і після 1-2 хв подавався звуковий сигнал аналогічний сигналу другого дня, тільки після нього не слідував електричний розряд. Час завмирання тварини використовувався як показник страху. Завмирання визначалося як нерухомість, за виключенням дихальних рухів. Цей параметр вимірювався за 20 с до звукового сигналу та в продовж часу генерації звуку. Порівняння проводилися між другий і третім днем експерименту. У нормі, тварини після отримання електричного розряду у другий день, на третій день демонструють значне збільшення часу завмирання, як перед стимулом (contextual freezing), так і в продовж стимулу (conditioning freezing). На рисунку 10 наведена схема протоколу для тесту на дослідження обумовленого страху. Загалом вимірювали наступні параметри: 1 – спонтанну локомоторну активність; 2 – спонтанне завмирання; 3 – завмирання за 20 с до першого звукового стимулу (unconditioned contextual freezing); 4 – реакція на звуковий стимул; 5 – завмирання протягом першого звукового сигналу; 6 – реакція на перший звуковий сигнал; 7 – завмирання протягом 60 с після першого електричного розряду (postshock freezing); 8 – завмирання до звукового сигналу на третій «тестовий» день (contextual conditioning); 9 – завмирання протягом звукового сигналу на третій «тестовий» день (conditioning to tone).



Рис. 10 - Протокол тесту на дослідження обумовленого страху.

Останні дослідження вказують на те, що напади часто асоціюються з дефіцитом емоційно-мотивованого навчання (Kemppainen *et al.*, 2006). Отже, час завмирання у тварин з епілепсією повинен не відрізнятися між «тренувальним» та «тестовим» днями.

2.3 Процедура імплантації електродів

2.3.1 Метод анестезування щурів

Анестезування щурів потребує точності та оперативності у виконанні (Washington Institute for Laboratory Animal Research, 2011). Робота з лабораторними тваринами була виконана із дотриманням вимог, які зазначалися вище. Кількість необхідної ін'єкційної суміші розраховувалася на основі маси дослідної тварини. Найбільш ефективна доза залежить від лінії, статі та віку щурів. Для проведення анестезії була використана доза 4 мл анестезійної суміші на 1 кг.

Тварини анестезувались за допомогою суміші кетаміну («Дарниця», Україна) (80 мг/кг) та ксилазину («Дарниця», Україна) (8 мг/кг). В якості розчинника використовувався 0,9% NaCl (Richardson and Flecknell, 2005). Кетамін – це анестетик, який викликає м'язову ригідність, а також рухи, які виглядають як посмикування (Nadjat-Haiem *et al.*, 2009). Для того, щоб нівелювати таку дію кетаміну на м'язовий апарат, використовують ксилазин, який є седативним засобом, анальгетиком та міорелаксантом (Veilleux-Lemieux *et al.*, 2013). Ін'єкції анестетиків проводились у черевну порожнину (інтраперітоніально, іп).

2.3.2 Доопераційні маніпуляції

Приблизно через 2 хв після введення анестезійної суміші тварини демонстрували зниження сенсорної, зокрема больової чутливості. У цей час проводили доопераційні маніпуляції: голили та дезінфікували операційне поле (починаючи від носа до лінії вух), фіксували у стереотаксі, а для додаткового

локального знеболення вводили 3-4 ін'єкції лідокаїну («Дарниця», Україна) у дозі 0,1 мл у ділянку шкіри голови, де робили розріз. Після зазначених процедур (15 хв від часу ін'єкції) перевіряли рефлекси. Першими ознаками того, що тварина увійшла у анестезію, є пригнічення рефлексу заплющування очей. Для того, щоб перевірити ступінь больової чутливості, проводилася діагностика згинального рефлексу задньої кінцівки у відповідь на подразник (стискання за допомогою пінцету пальця або шкіри поміж пальців). В разі необхідності вводили додаткову вдвічі меншу за початкову дозу суміші ксилазину та кетаміну та через 10-15 хв знову перевіряли зазначений рефлекс. Хірургічні маніпуляції проводились лише після відсутності рефлексу.

2.3.3 Імплантація електродів

Уся процедура імплантація електродів у ділянку CA1 гіпокампа разом з часом, який витрачається на анестезію, займала близько 60 - 80 хв. Операція проводилася за кімнатної температури +23°C.

Першим етапом операції було очищення ділянки черепа від поверхневих тканин. Для цього було необхідно зробити розріз стерильним скальпелем по центру голови починаючи від середньої точки між очей до середньої точки між вухами щура. Стерильними затискачами захоплювалися краї шкіри та відводилися в боки. Далі необхідно було очистити тверду оболонку черепа від сполучної тканини, так щоб помітними були на черепі точки брегма та лямбда.

Другим етапом була робота зі стереотаксом M900 («David Kopf Instruments», США) та встановлення необхідних координат. Для початку встановлювалася координати брегми, які приймали за точку відліку для встановлення і позначення інших координат. У місцях позначення необхідних точок робили краніальні отвори у черепі щура. Координати введення електродів для досліджень змін локальних потенціалів були наступними: нюхова цибулина (AP +6,7 мм; ML \pm 1,5 мм; DV -3,0 мм), гіпокамп (AP -3,7 мм; ML \pm 2,5 мм; DV -2,0 мм) та мигдалеподібне тіло (AP -2,6 мм; ML \pm 4,8 мм; DV -8,5 мм) (D. Isaev

et al., 2015a; James J. Knierim, 2015). Електроди для вимірювання електричної активності нюхової цибулини та гіпокампу розташовувались у лівій півкулі, а електрод мигдалини у правій. Таке розташування було обумовлене технічними обмеженнями прототипу телеметричної системи та нюансами операційних маніпуляцій, а так як більший науковий інтерес був у одночасному спостереженні локальних потенціалів нюхової цибулини та гіпокампу, то саме ці електроди було вирішено розташувати іпсилатерально. Фіксувальні болти закручували вище брегми, а індиферентний електрод у місці лямбди (Рис. 11).

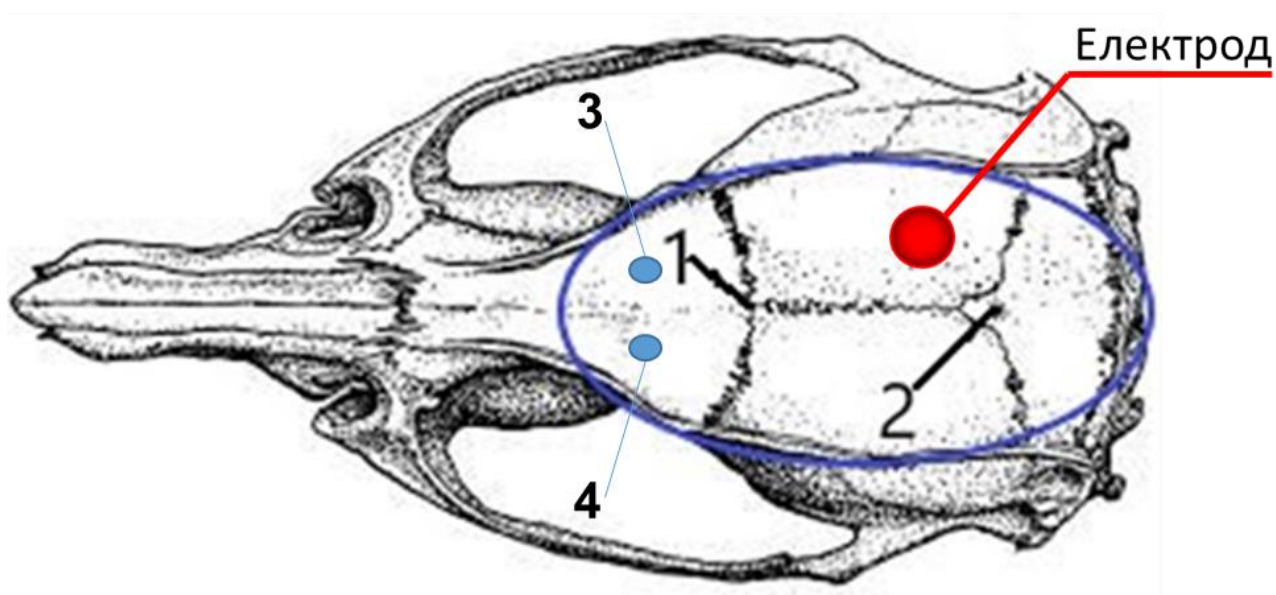


Рис. 11 - Графічне зображення черепа щура (вид зверху): 1 – брегма, 2 – лямбда, 3,4 – місця фіксувочих болтів. Синім позначено місце скальпування. Електрод – місце імплантації електроду до гіпокампу

Електроди та болти фіксували за допомогою протакрилу-М («СТОМА», Україна). Протакрил-М розводили розчином до утворення пастоподібної суміші, яку потім наносили безпосередньо на череп до повного застигання. Краї розрізу зашивали шовковою ниткою або склеювали медичним клеєм Бф-6 (ВАТ «Лубнифарм», Україна). Надалі тварина ще близько 40-60 хв знаходилася у непритомному стані, після чого дія анестезії поступово припинялась і щур повертався до нормального стану.

По закінченні операції щури знаходилися у сухому, теплому та ізольованому місці для запобігання розвитку гіпертермії, що є однією із головних причин смертності щурів після проведення операції (Richardson and Flecknell, 2005).

2.4 Локальні потенціали та їх реєстрація

Ритми мозку це періодично-змінні хвилі які генеруються синхронною активністю великої кількості нейронів. При синхронізації клітинні струми додаються і викликають високоамплітудні флуктуації локальних потенціалів (ЛП), у той час як не синхронізована активність не здатна генерувати достатньо великі зміни, які могли би бути зареєстровані як локальні потенціали. Вважається що мозкові ритми, саме за рахунок синхронізації, грають ключову роль у формуванні пам'яті та тісно пов'язані з когнітивними функціями (Vanderwolf, 1969).

Гіпокамп відіграє важливу роль у формуванні епізодичної пам'яті, тобто утворення нових спогадів про пережиті події. Двостороннє пошкодження даної структури призводить до антероградної амнезії, тобто втрати здатності до формування нових спогадів. Деякі дослідники розглядають гіпокамп, як частину більш складної системи, яка зосереджена в ділянці середньої скроневої доли і відповідає за пам'ять (James J. Knierim, 2015). Гіпокамп включає в себе густо розташовані нейрони, які здатні генерувати великі ЛП, які в свою чергу, породжують значні за амплітудою ритми. Так, наприклад, зона CA1 має велику щільність паралельно розташованих дендритів пірамідних клітин. Через це синаптичний струм протікає в тому самому напрямку і інтегрується породжуючи високо-амплітудні сигнали які легко реєструються при записі.

В гіпокампі гризунів реєструється різні типи електричної активності серед яких тета-ритм (~ 4 – 12 Гц), гострі хвилі – зубчасті комплекси (~ 110-250 Гц ритм який накладається на ~0.01-3 Гц хвилі) та гамма-ритм (~ 25 – 100 Гц). Кожний тип ритму має певні поведінкові кореляти, генерується конкретними

механізмами та асоціюється з особливістю нейронної активності (Buzsáki *et al.*, 1983; Buzsáki, 1986; Bragin *et al.*, 1995).

2.4.1 Тета-ритм

Тета-ритм це низькочастотні синусоїдальні хвилі які генеруються у всіх частинах гіпокампа та присутні під час дослідницької активності та фази швидкого сну (REM) (Buzsáki *et al.*, 1983; Buzsáki, 1986). Тета-ритм, вперше відкритий у досліджах на кролях, в подальшому був виявлений у багатьох видів котів, собак, мишей, кажанів, мавп та людей (Green and Arduini, 1954; Vanderwolf, 1969). Цей ритм також реєструється у багатьох кортикальних та підкоркових регіонах (Mitchel, SJ, 1980; van der Meer and Redish, 2011). Високоамплітудні тета хвилі дуже часто присутні при локомоторній поведінці (Vanderwolf, 1969). Вважається, що пейсмейкером для цього ритму виступає регіон присередньої перегородки та діагональної смужки Брока (medial septum–diagonal band of Broca - MSDB). Це припущення було зроблене після того, як при ураженні септуму виявили приглушення тета-ритму в гіпокампі (Green and Arduini, 1954). ГАМК-ергічні нейрони у медіальному септумі (MS) виступають як пейсмейкери для інтернейронів зубчастої звивини, CA3 та CA1 регіонів гіпокампу (Freund and Antal, 1988). Ці інтернейрони ритмічно розгальмовують пірамідні клітини гіпокампа тим самим сприяючи виникненню тета активності. Було показано, що різні типи механізмів в інтернейронах залучені в генерацію тета-ритму, в наслідок чого генерація потенціалів окремими групами нейронів припадає на різні фази тета циклу (Varga *et al.*, 2012; Somogyi *et al.*, 2014).

2.4.2 Гамма-ритм

Гамма-ритм реєструється у гіпокампі під час різних форм поведінки, але його амплітуда є нижчою за тета-ритм (Buzsáki *et al.*, 1983; Csicsvari *et al.*, 2003). Останнім часом все більш поширюється думка, що класичний гамма-ритм, який описується діапазоном часто від 25 Гц до 100 Гц, у CA1 регіоні включає в себе більш, ніж один мозковий ритм. Активність в діапазоні ~ 25 – 55 Гц визначається

як «низькі» або «повільні» гамма хвилі і генерується у СА3 регіоні (Colgin *et al.*, 2009; Schomburg *et al.*, 2014). Другий тип гама хвиль відносять до вищих частот ~ 60 – 100 Гц. Їх пов'язують з входами від медіальної енторинальної кори (МЕС). Цей тип активності називають «швидким» або «середньочастотним» гамма-ритмом. Гамма-ритми присутні у багатьох ділянках мозку, і подібно до гіпокампу, поділяються на низько- та високо- частотні складові (Kemere *et al.*, 2013; Zheng and Colgin, 2015). Існують достатні докази що гальмівні інтернейрони відіграють важливу роль у процесах генерації гамма-ритму. Гамма-ритми у локальних потенціалах щурів відображають гальмівні події, у пірамідних клітинах зон СА3 та СА1, а також зернистих клітинах зубчатої звивини (Pernía-Andrade and Jonas, 2014). Гамма-ритм керується вхідними сигналами від медіальної енторинальної кори, яка відповідає за обробку сенсорної інформації та передає її до гіпокампа (Schomburg *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2014). Тому, однією із можливих функцій гамма-ритму є декодування отриманої сенсорної інформації.

2.4.3 Взаємодія між різними ритмами гіпокампа

Гіпокампальні ритми взаємодіють між собою у різних варіаціях. Швидкі коливальні спайки нейронної активності (sharp wave-ripples (SWRs)) реєструються постійно навіть при відсутності вхідного стимулу до мережі (Vandecasteele *et al.*, 2014). У тварин перехід від стану спокою до активної поведінки може активувати вхідні стимули, що призводить до приглушення SWRs та домінування тета-ритму (Kubota *et al.*, 2003; Vandecasteele *et al.*, 2014). Тета цикли розмежовуються гальмівними проміжками, які корелюють з актами, що слугують для отримання сенсорної інформації, наприклад, нюхання або рухи очима. В цьому випадку, кожен тета цикл постачає до гіпокампа, свого роду «знімок» поточного оточення, з якого тварина отримує зовнішні стимули, і гіпокамп декодує відповідну інформацію. Однак, тета-ритм також присутній під час внутрішньогіпокампальних процесів, таких як відновлення раніше

збереженої інформації (Belchior *et al.*, 2014) та обдумування майбутніх подій (Wikenheiser and Redish, 2015). Під час цих, притаманних гіпокампу процесів, кожен тета цикл повинен активувати злагоджений ансамбль клітин які відповідають за раніше збережену інформацію або передбачення майбутньої траєкторії. Переключення між зовнішніми та внутрішніми операціями можуть залежати від типу гамма-ритму який супроводжує тета цикл, чи то «швидкий» гамма-ритм, зумовлений зовнішніми стимулами від МЕС, чи «повільний» гамма-ритм, зумовлений внутрішніми сигналами від зони СА3. Нещодавно було показано, що «повільні» гама ритми присутні під час SWRs, з чого виходить що гамма-ритми відіграють важливу роль в протіканні процесів передачі інформації від СА3 до СА1. Для обох, «повільних» та «швидких» гамма-ритмів, гальмівні події які присутні підчас гама циклу, можуть слугувати для вибору клітин, які отримали найбільший вхідний стимул, ігноруючи нерелевантні «шумові» вхідні сигнали.

2.4.4 Реєстрація локальних потенціалів

Для запису локальних потенціалів використовували системи Neurologger (New Behavior) та NL-1, спеціально розробленні для бездротового запису електричних потенціалів з мозку щурів. Щоб дослідити зміни активності мозку під час ініціації епілептичного статусу (ЕС) реєстрація локальних потенціалів проводилася у два етапи..

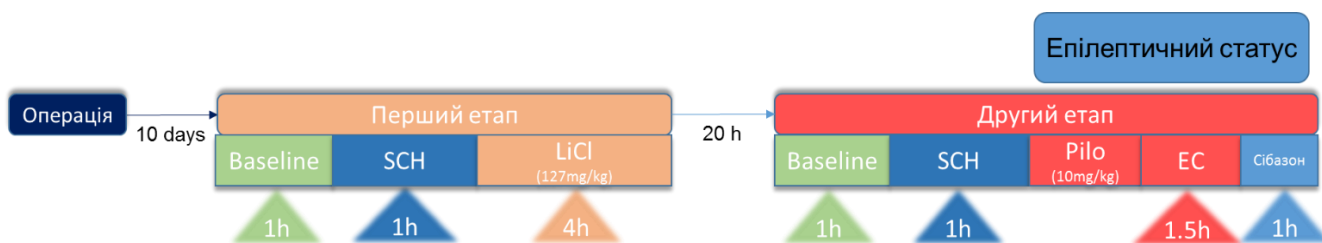


Рис. 12 - Протокол проведення експерименту

Перший етап – протягом години записували базову лінію, далі проводили ін’єкцію специфічного блокатора ПАР1 SCH79797 або 0,9 %-й NaCl, записували ще годину, потім робили ін’єкцію хлориду літію, після чого записували протягом

чотирьох годин. На наступний день (другий етап) - протягом години записували базову лінію, далі проводили ін'єкцію SCH79797 або 0,9 %-й NaCl, потім робили ін'єкції пілокарпіну, після чого запис проводився до зупинки ЕС. На Рис. 12 приведено алгоритм проведення експерименту

Для аналізу на кожному етапі ініціації, записи розбивались на часові відрізки, які відповідали різним фазам становлення ЕС. Для першого етапу (ін'єкція LiCl) порівняння проводилось між відрізком запису, який відповідає базовій лінії (за 2 год до ін'єкції LiCl) та відрізком відповідним 4й год запису після ін'єкції LiCl. Для другого (ін'єкція пілокарпіну) порівнювали базову лінію (за 2 год до першої ін'єкції пілокарпіну), латентну фазу (за 0,5 год до розвитку ЕС), та під час ЕС.

2.5 Методи статистичного аналізу

Спектральний аналіз записаних електричних сигналів здійснювали за допомогою алгоритму швидкого перетворення Фур'є. Аналіз результатів проводили із використанням програм Matlab, Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) та Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA). Визначення нормальності розподілу експериментальних даних здійснювали за допомогою тесту Шапіро-Вілка. У випадку, якщо результати були розподілені за Гаусом, для визначення статистичної вірогідності розбіжностей між групами використовувався однофакторний або двофакторний дисперсійний аналіз з post hoc тестом Тьюкі (One-way/Two-way ANOVA post hoc Tukey test) та непарний t-тест Стьюдента (Unpaired t-test) та також U-критерію Манна-Уїтні для непараметричних даних. Відміни вважали значущими при $P < 0,05$. Деякі з результатів поведінкових тестів не відповідали критерію нормальності розподілу, у такому випадку для їх аналізу використовували метод дисперсійного аналізу з повторними вимірюваннями з подальшим post-hoc аналізом за допомогою тесту Бонферонні. Результати у роботі представлені у вигляді «середнє значення \pm стандартна похибка середнього».

3 РЕЗУЛЬТАТИ

3.1 Розробка бездротової системи для реєстрації електричних потенціалів головного мозку у щурів

Запис електрофізіологічних сигналів з експериментальних тварин які вільно рухаються, є важливим підходом до вивчення фізіологічних параметрів (наприклад, артеріального тиску, серцебиття, температури тіла, мозкової активності) у відносно природних умовах. Тривалий запис сигналів можна здійснювати за допомогою дротового з'єднання тіла тварини до підсилювачів та записуючої апаратури. Такі «прив'язані системи» є успішними в тривалому моніторингу ЕЕГ і дозволяють співвідносити ЕЕГ з поведінкою. На відміну від акумуляторних систем, прив'язані системи здатні забезпечувати енергію, необхідну для довготривалих записів, за допомогою декількох електродів і високої частоти дискретизації.

Однак пряме з'єднання тварини із записуючим пристроєм, за допомогою дротів, що з'єднують ЕЕГ-електрод на голові тварини з підсилювачем, не тільки обмежує тварину в її рухомості та дослідницькій поведінці, але може також діяти як сильний стрес-фактор, тим самим змінюючи різні фізіологічні параметри (Tang *et al.*, 2004).

Також дроти це потенційне джерело експериментальних артефактів що призводить до додаткової похибки вимірів (Kramer *et al.*, 2001). Щоразу, коли тварина рухається, з'єднувальні дроти також рухаються. Ці рухи взаємодіють з електростатичними полями в клітці тварини, в результаті чого виникає тимчасовий шум, відомий як «артефакт руху». Такий шум важко відрізнити від біологічних сигналів. Більше того, будь-яке розділення між проводами змушує їх вловлювати магнітні поля, що генеруються змінними мережевими струмами, внаслідок чого виникає «мережевий» шум 50 або 60 Гц.

Тіло тварини повинно бути під'єднане дротом низького опору до потенціалу заземлення записуючого обладнання, інакше коливання потенціалу

тіла тварини змінить або наситить сигнал шумами. Однак цей заземлювальний провід сам по собі може додавати «мережевого» шуму та артефактів руху.

Датчик, імплантований в тіло тварини, може уникнути електричного шуму прив'язаної системи. Електроди, дроти та датчик занурені, або причеплені на те саме провідне тіло тварини. Тому на них не впливають зовнішні електростатичні поля і вони створюють значно менше артефактів руху. Оскільки пристрій працює від акумулятора, між датчиком і тілом тварини не потрібно використовувати окремий заземлений низький імпеданс. Тварина може вільно пересуватися навколо своєї клітки, покращуючи свій комфорт під час тривалих записів (Chang *et al.*, 2011).

Тому бездротові, так звані телеметричні системи запису, максимально зручні для експериментальної тварини, в багатьох аспектах мають більше переваг порівняно зі звичайними пристроями запису (Lapray *et al.*, 2008).

Телеметрична система запису повинна відповідати ряду вимог, щоб гарантувати довгостроковий та коректний запис фізіологічних параметрів у експериментальних тварин. Усі пристрої, які повинні бути імплантовані тварині, повинні бути якомога меншими та легшими, щоб мінімізувати або зовсім запобігти формуванню стресу і болю у тварини. Система також повинна бути повністю біостабільною та біосумісною для того, щоб проводити телеметричні записи протягом тривалих періодів тижнів чи навіть місяців. Споживання енергії імплантованих компонентів повинно бути якомога нижчим. Також повинна бути можливість керування джерелом енергії (як правило, акумулятором) від зовнішнього середовища, включаючи та вимикаючи систему або перезаряджаючи акумулятор. Система повинна забезпечувати телеметричну передачу записаних сигналів на відстань принаймні декількох метрів, щоб забезпечити вільну дослідницьку поведінку тварин у визначеному середовищі, наприклад, тест «відкрите поле». Бажано щоб система мала змогу надійно працювати у воді, щоб забезпечити телеметричні записи фізіологічних параметрів у поведінкових тестах пов'язаних з водним середовищем. Для

зменшення витрат внутрішні компоненти повинні бути повторно використані, а зовнішня система запису повинна бути максимально простою. Усі зовнішні компоненти телеметричної системи (наприклад, приймач) повинні бути якомога меншими та портативними, щоб дозволяти проводити експерименти поза звичайними лабораторними установками. (Lapray *et al.*, 2008). Ще одна проблема існуючих систем, як «прив'язаних» так і телеметричних систем - відсутність технічних характеристик, наданих їх виробниками, включаючи основні властивості, такі як частота дискретизації датчика, шум, що присутній на вході, характер фільтра проти згладжування та вхідний опір підсилювач. Крім того, для багатьох систем телеметрії потрібне власне програмне забезпечення. Це програмне забезпечення може бути дорогим і зазвичай працює з одним видом систем. Іноді програмне забезпечення застосовує невідому обробку до набутих сигналів та невідомі алгоритми розрахунку, що не дає змогу експериментатору в повній мірі розібратися у процесі обробки та інтерпретації даних.

Телеметричні записи ЕЕГ у вільно рухомих ссавців наразі є важливим методом у нейронауках, оскільки порівняно недавно було описано ряд різних ритмів мозку, але фізіологічна функція та поведінковий контекст різних ритмів мозку не повністю зрозумілі (Buzsáki, 2006). Також для спостереження за наслідками лікування та картографування розвитку епілепсії необхідна суцільна електроенцефалограма (ЕЕГ), тим більше, що іктальна ЕЕГ-активність може передувати найбільш раннім спостережуваним змінам у (Lieb *et al.*, 1976; Litt *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2011).

На даний час існує багато різних телеметричних систем. Найбільш відомі: Stellar Telemetry (TSE systems), Neurologger (New Behavior), SCT (OSI), 4ET (DSI), IW5 (TBSI). Всі вони забезпечують потрібні характеристики для реєстрації електроенцефалограми (електрокортикограми). Але, для досліджень пов'язаних з епілепсією, більшість з існуючих систем мають свої обмеження.

Деякі пристрої, типу Stellar Telemetry, SCT та 4ET потрібно імплантувати під шкіру, що ускладнює операцію. Деякі з пристроїв мають RF передавач, тому

їм потрібен спеціальний приймач. Neurologger не дозволяє спостерігати сигнали у реальному часі. Також конструкція деяких систем не розрахована на те, щоб витримувати навантаження пов'язані з перебігом нападу. І майже всі системи мають високу вартість, що робить їх не доступними для багатьох груп вчених задля використання у невеличких не основних проектах.

У даній роботі ми розробили корисну модель багатоканальної бездротової системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів головного мозку щурів (Боговик та ін., 2020). Наша корисна модель належить до медицини, а саме, до науково - дослідних приладів реєстрації електроенцефалограми (електрокортикограми) і може бути використана у дослідях електричної активності головного мозку щурів.

Найбільш близький до пристрою, що заявляється, є пристрій Neurologger – бездротовий пристрій для зняття електроенцефалограми, він має чотири реєструючі канали, фіксоване підсилення, інфрачервоний сенсор, сенсор руху, контролер та вбудовану пам'ять для зберігання отриманих даних. Однак, такий прилад має певні недоліки: необхідність заміни елементів живлення, необхідність у зчитувачі пам'яті, крихка конструкція за рахунок використовуваних елементів.

Задачею розробки нашої корисної моделі є перехід зі змінних елементів живлення до використання системи живлення на акумуляторі, використання мікроконтролера із вбудованим bluetooth модулем та використання більш жорсткої конструкції для захисту від пошкоджень твариною.

3.1.1 Блок-схема пристрою та технічне завдання

На основі вище зазначених вимог до телеметричних систем які будуть використовуватися для реєстрації електрофізіологічних параметрів щурів у дослідях пов'язаних з епілепсією нами була розроблена блок-схема основних вузлів системи (рис. 13) та поставленні наступні технічні завдання:

блок підсилювачів повинен забезпечувати низький рівень електричних шумів, мати високий вхідний опір та необхідний коефіцієнт підсилення з можливістю динамічної зміни залежності від поставлених завдань; блок підсилювачів повинен містити інтегровані фільтри високих та низьких частот задля зменшення рівня шумів; мікроконтролер повинен мати вбудований аналого-цифровий перетворювач, вбудований радіо-модуль та режим наднизького енергоспоживання; контролер живлення повинен забезпечувати стабільну безперебійну подачу живлення незалежно від навантаження та можливість контролювати заряд/розряд літій-іонного акумулятора.

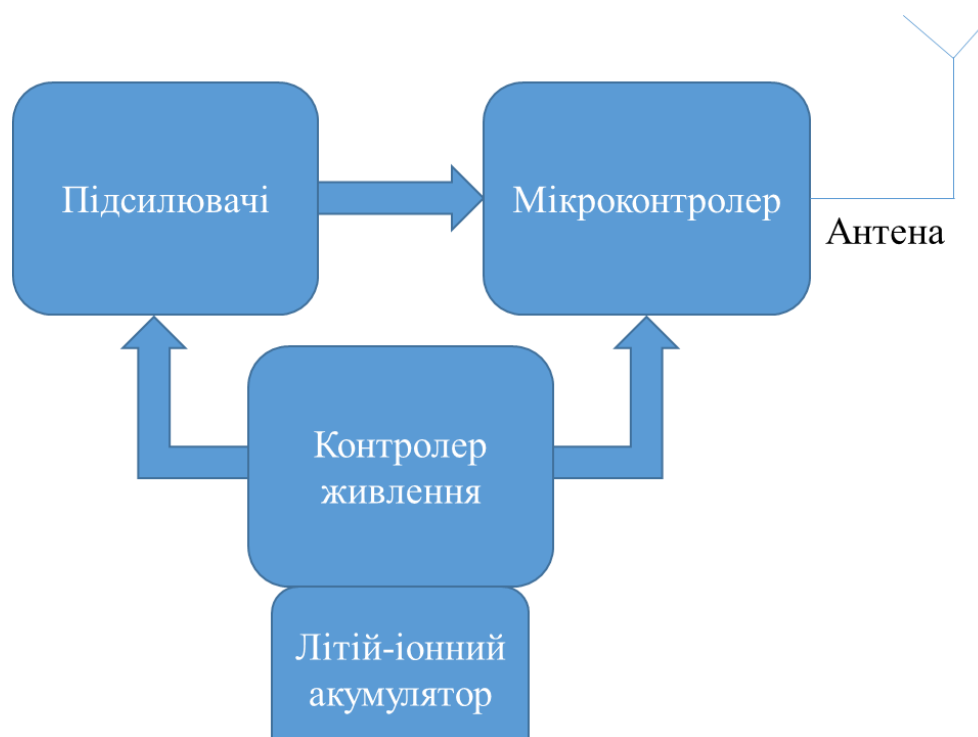


Рис. 13 – Блок-схема основних вузлів телеметричної системи.

3.1.2 Принципова схема та основні блоки

Розробка принципової схеми проводилась на основі електронних компонентів фірми Texas Instruments. За основу деяких технічних рішень зі змінами було взято розробки за (Lapray *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2011) та Texas Instruments.

На рисунку 14 приведена принципова схема чотирьохканальної бездротової телеметричної системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів на якій позначено: (1) роз'єм підключення електродів; (2) блок підсилювачів та фільтрів сигналу; (3) контролер живлення та генерації опорного потенціалу; (4) мікроконтролер з компонентами для безпроводної передачі сигналу; (5) модуль пам'яті для резервного зберігання даних.

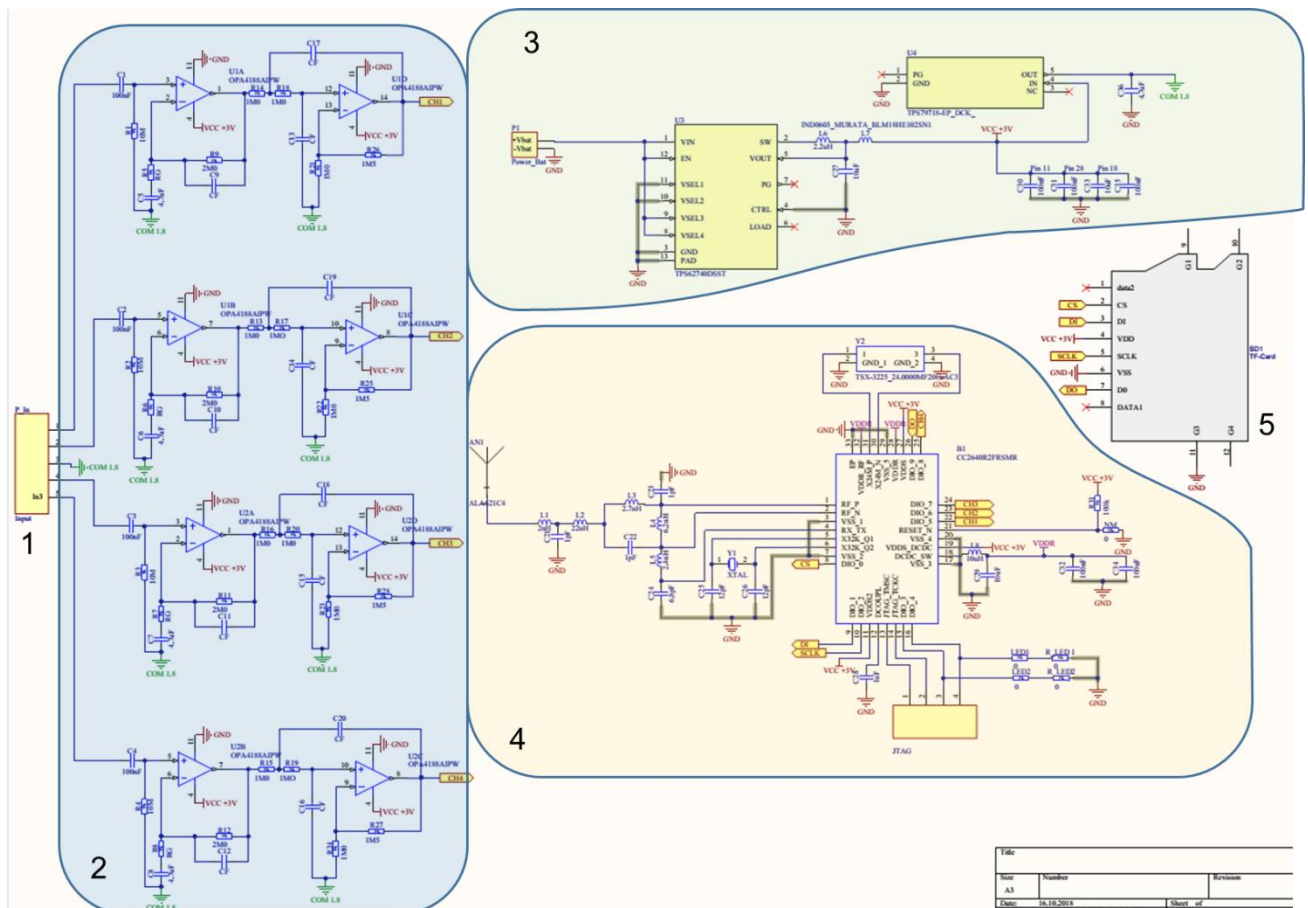


Рис. 14 – Принципова схема чотирьохканальної бездротової телеметричної системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів.

Електродні провідники підключаються до роз'єму (1). Ці роз'єми з'єднані послідовно з 100-нФ-конденсатором та 10-М резистором, які розташовані на вході кожного каналу і разом визначають вхідний опір. Кожен вхід підключений безпосередньо до основного потенціалу підсилювача. Тут ми бачимо одну з найважливіших переваг системи, що працює на елементах живлення. Весь передавач ізольований від тіла тварини, за винятком двох електродів. Ємність

між передавачем і тілом тварини становить приблизно 10 пФ. При 160 Гц і нижче ця ємність має опір більше, ніж 100 МОм, і тому він є незначним порівняно з 10-МОм вхідним опором передавача (Chang *et al.*, 2011). Таким чином, ми отримуємо майже ідеальний диференціальний вхід, використовуючи два відведення без необхідності заземлення з низьким опором.

Різниця між електродом та опорним потенціалом посилюється у два етапи. Загальний коефіцієнт посилення на першому етапі залежить від співвідношення резисторів у ланцюгу зворотного негативного зв'язку який забезпечують загальний коефіцієнт підсилення 200. Перший каскад підсилювачів забезпечує один полюс триполюсного низькочастотного фільтра, що запобігає згладжуванню, а другий ступінь забезпечує другий та третій полюси. При частоті дискретизації у 400 Гц, підсилювач і фільтр забезпечують коефіцієнт посилення 100 при 160 Гц, 10 при 256 Гц і 1 при 512 Гц (Chang *et al.*, 2011). Сигнали, що перевищують 200 Гц, які були б перетворені в шум випромінювання шляхом вибірки при 400 Гц, послаблюються принаймні в десять разів. Фільтр зменшує їх внесок у спектри потужності щонайменше на два порядки.

У ролі підсилювачів ми використовували мікросхеми серії OPAx333 виробництва Texas Instruments. Це операційні підсилювачі на структурі КМОН (комплементарна структура метал-оксид-напівпровідник), які надають високу точність із низьким струмом спокою. Амперсистеми OPA2333 мають фірмову техніку автоматичного калібрування, яка одночасно дозволяє досягти дуже низької напруги зміщення (максимум 10 мкВ) та майже нульового дрейфу у часі та температурі. Крім того, пристрій забезпечує високі імпедансні входи, які мають широкий діапазон вхідної напруги, а також вихід який здатен видавати напругу близьку до напруги живлення. Ці пристрої оптимізовані для роботи з низькою напругою та однополярним живленням на рівні 1,8 В ($\pm 0,9$ В) і до 5,5 В ($\pm 2,75$ В) і ідеально підходять до поставлених задач.

На роль ядра системи ми обрали мікроконтролер CC2640R2F виробництва Texas Instruments. Це новий представник сімейства дешевих пристроїв

бездротового зв'язку радіочастотного діапазону 2.4 ГГц з наднизьким енергоспоживанням. Надзвичайно малий струм споживання радіочастотного тракту і мікроконтролера в активному стані та режими зниженого енергоспоживання істотно збільшують ресурс батареї, дозволяючи пристрою працювати від невеликих елементів живлення або в системах з функцією накопичення енергії з навколишнього середовища. CC2640R2F інтегрує 32-бітний мікроконтролер на базі ядра ARM® Cortex®-M3 з робочою частотою 48 МГц в якості основного процесора і широкий набір периферійних модулів, включаючи унікальний мало споживаючий контролер датчиків, що підтримує збір аналогових і цифрових даних з зовнішніх датчиків в автономному режимі в той час, як інша система знаходиться в стані сну.

Контролер протоколу Bluetooth Low Energy реалізований в області внутрішньої ROM пам'яті пристрою і часткової виконується на співпроцесор ARM® Cortex®-M0 радіочастотного ядра. Така архітектура збільшує загальну системну продуктивність і скорочує потужність споживання, знижує навантаження на основний процесор і вивільняє обсяг внутрішньої FLASH пам'яті для призначеного для користувача програми.

Наявність вбудованого радіо модулю та широкі функціональні можливості CC2640R2F роблять його ідеальним вибором для бездротової телеметричної системи реєстрацій електрофізіологічних потенціалів, де тривалий час роботи від акумулятора, компактні розміри і легкість застосування є ключовими вимогами.

Для контролю живлення ми обрали мікросхему імпульсного регулятора TPS62740 з технологією DCS-Control (Direct Control with Seamless Transition into Power Save Mode - управління з плавними переходами між різними режимами роботи імпульсного регулятора напруги). Випущена на основі цієї концепції мікросхема дуже добре підходить для побудови систем електроживлення пристроїв бездротового зв'язку малої потужності. Вона дозволяє забезпечити економічне витрачання запасу енергії батарейки на коротких інтервалах часу

роботи з великим струмом навантаження (робота на передачу сигналу) які чергуються з періодами помірною навантаження (робота на прийом сигналу, вимір параметрів) і тривалим «засинанням» пристрою, коли споживання повинне знижуватися на декілька порядків. У всіх цих режимах TPS62740 забезпечує мале споживання струму на власні потреби, більш ефективно витрачання енергії радіо модулем і мікроконтролером, а також швидке переключення між режимами роботи.

Для забезпечення стабільного значення опорної напруги ми використовували лінійні стабілізатори напруги з LDO (малим падінням напруги вхід / вихід) сімейства TPS797xx виробництва Texas Instruments. Вони мають низьку напругу падіння та низьке енергоспоживання. Мікросхема може стабільно працювати з будь-яким конденсатором більшим ніж 0,47 мкФ. Тому реалізація цього пристрою вимагає дуже мало місця на платі завдяки мініатюризованому корпусу та потенційно малому вихідному конденсатору. Окрім того, сімейство включає інтегрований вихід з активним високим рівнем потужності, який призначений для використання в мікроконтролері, що працює на акумуляторах.

3.1.3 Розробка прототипу

Прототип системи був виготовлений на чотиришаровому текстоліті розміром 35 x 20 мм та товщиною 1 мм. На рисунку 15 приведено схему друкованої плати, на якій зліва зображено верхній шар розміщення компонентів, справа – нижній шар.

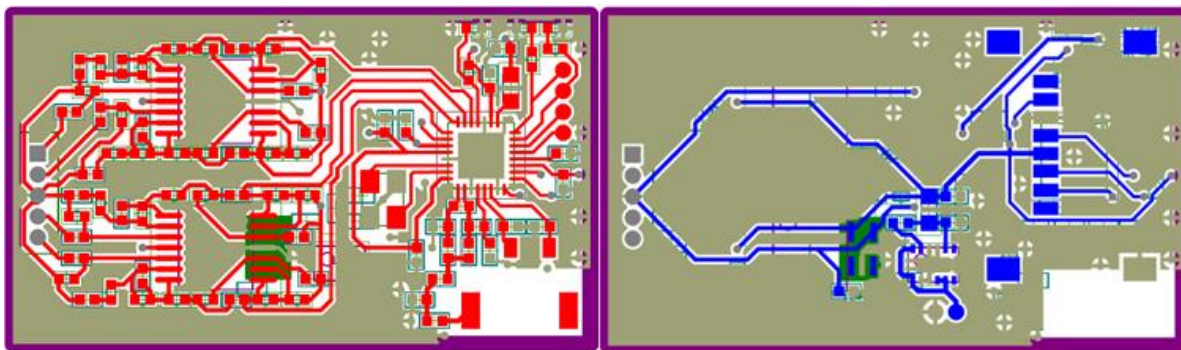


Рис. 15 – Схема друкованої плати прототипу чотирьохканальної бездротової телеметричної системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів

Для зменшення енергоспоживання частота дискретизації була встановлена в значення 400 Гц. Розрядність АЦП була обрана 8-біт, отже розрядність по напрузі, при напрузі живлення у 3 вольти, дорівнювала 11,7 мВ на розряд. Дані з усіх каналів передавались на комп'ютер кожну секунду. Для живлення ми використовували літій-іонний акумулятор ємністю 40 мА. У такому режимі пристрій був здатний стабільно працювати протягом приблизно 12 годин, після чого потребував перезарядки або заміни акумулятора. Для прийняття даних на комп'ютер використовувалася аналогічна схема передаючого вузла на базі мікроконтролера CC2640R2F. Отримані дані відображались, оброблялися та записувалися за допомогою програми написаній мовою програмування C#.

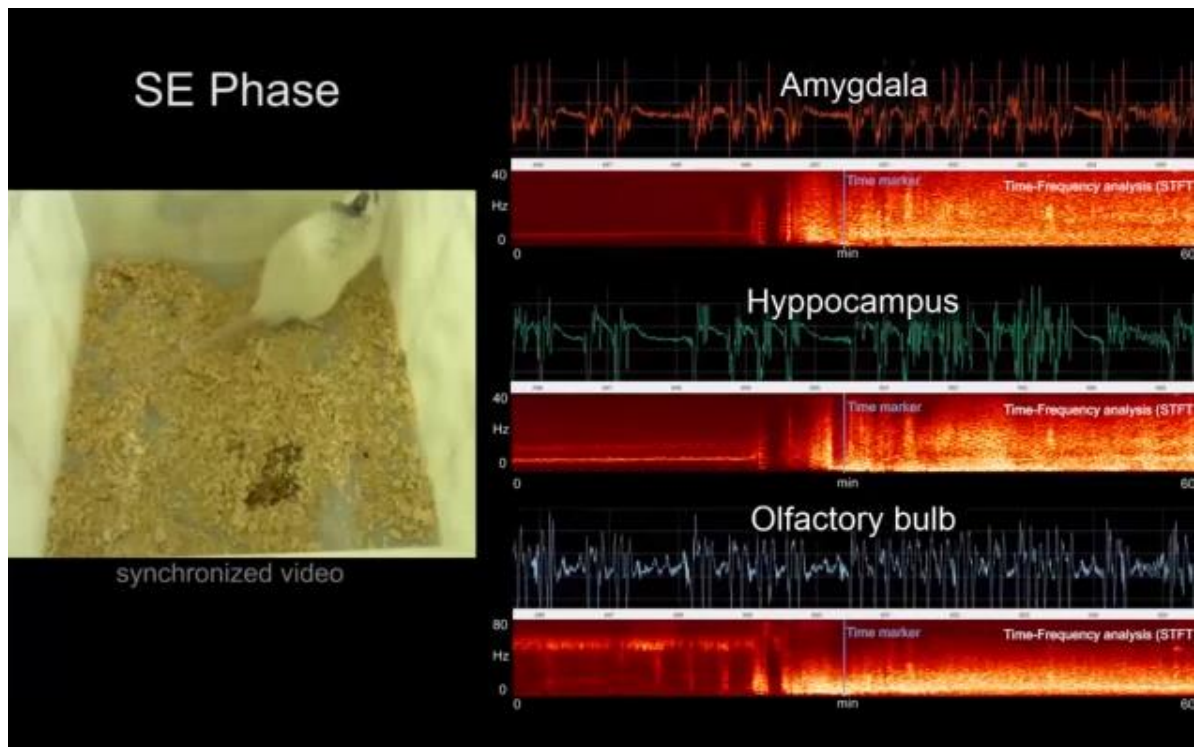


Рис. 16 – Знімок роботи прототипу телеметричної системи під час розвитку епілептичного статусу.

Тестування прототипу проводилось на щурах лінії Вістар віком 2 місяці як у спокійному стані, так і під час ініціації епілептичного статусу. Отримані дані порівнювались із отриманими від тих самих твари за допомогою наявних повірених підсилювачів (Neurologger та A-M Systems). Сигнали отримані за допомогою прототипу безпроводної системи реєстрації, повністю відповідали розрахунковим характеристикам та були використані для подальших дослідів, деякі з котрих описані у наступних розділах.

3.2 Зміни локальних потенціалів гіпокампа, мигдалеподібного тіла та нюхової цибулини під час розвитку епілептичного статусу

Цілісність ГЕБ порушується в різних ділянках мозку під час розвитку епілепсії (van Vliet et al., 2007). Порушення ГЕБ було виявлено у гіпокампі, корі, таламусі, мигдалеподібному тілі та нюховій цибулині протягом різних періодів епілептогенезу. Роль нюхової цибулини у розвиток епілептичного статусу

залишається не достатньо вивченою. Так було показано, що різкий запах, який викликає активність у великій кількості нюхових сенсорних нейронів, здатен провокувати напади у пацієнтів з епілепсією (Restrepo et al., 2014). Так резекція нюхової цибулини може призводити до генерації нападів та епілептиформної активності (Jiang et al., 2015). Також у пацієнтів з скроневою епілепсією може виникати так звана «нюхова аура» (Acharya et al., 1998). Ми припустили, що нюхова цибулина може бути залучена до розвитку епілептичного статусу за умов літій-пілокарпіновій моделі.

Базуючись на вищезазначених даних ми вирішили дослідити зміни локальних потенціалів нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалеподібному тілі під час розвитку епілептичного статусу. Для цього групі щурів (n=5) проводили операцію по вживлянню електродів за протоколом зазначеним у розділі 2.3 «Процедура імплантації електродів». Далі проводили процедуру ініціації ЕС та реєстрацію локальних потенціалів за протоколами зазначеними у розділі 2.4.4 «Реєстрація локальних потенціалів». Процес реєстрації розвитку ЕС у літій – пілокарпіновій моделі можна умовно розділити на декілька етапів. Перший етап - це запис локальних потенціалів перед введенням пілокарпіну, так звана «базова лінія» (*Рис. 17*).

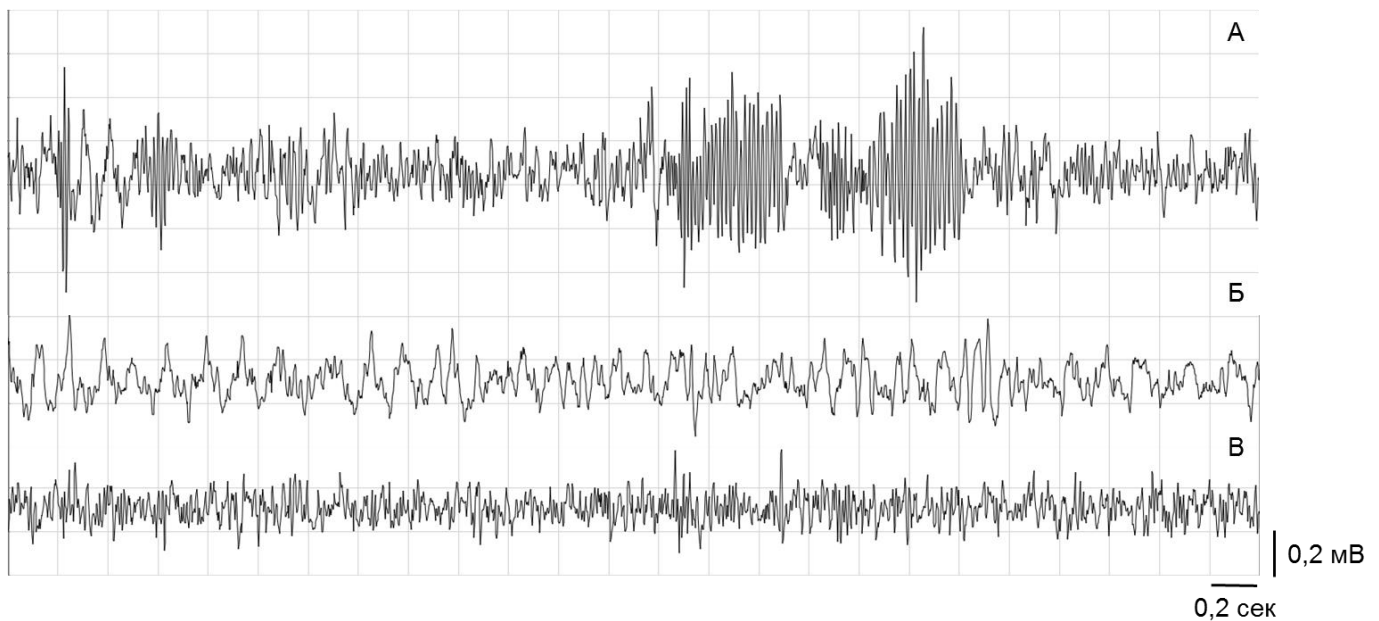


Рис. 17 – Базова активність (А) нюхової цибулини, (Б) гіпокампу та (В) мигдалеподібного тіла. Фрагмент (5 сек) запису локальних потенціалів щура перед введенням пілокарпіну

Під час цього етапу ми реєстрували характерну для даних ділянок активність. Так як, запис «базової лінії» проводився за годину до введення пілокарпіну, треба зазначити, що дану активність не можна вважати активністю у нормальному стані, оскільки протокол літій-пілокарпінової моделі передбачає введення хлорида літію за 20 годин до пілокарпіну. Введення пілокарпіну призводило до настання так званої «латентної фази» під час якої під дією пілокарпіну виникали зміни у поведінці тварини, загальній потужності сигналів та локальних потенціалах (*Рис. 18*).

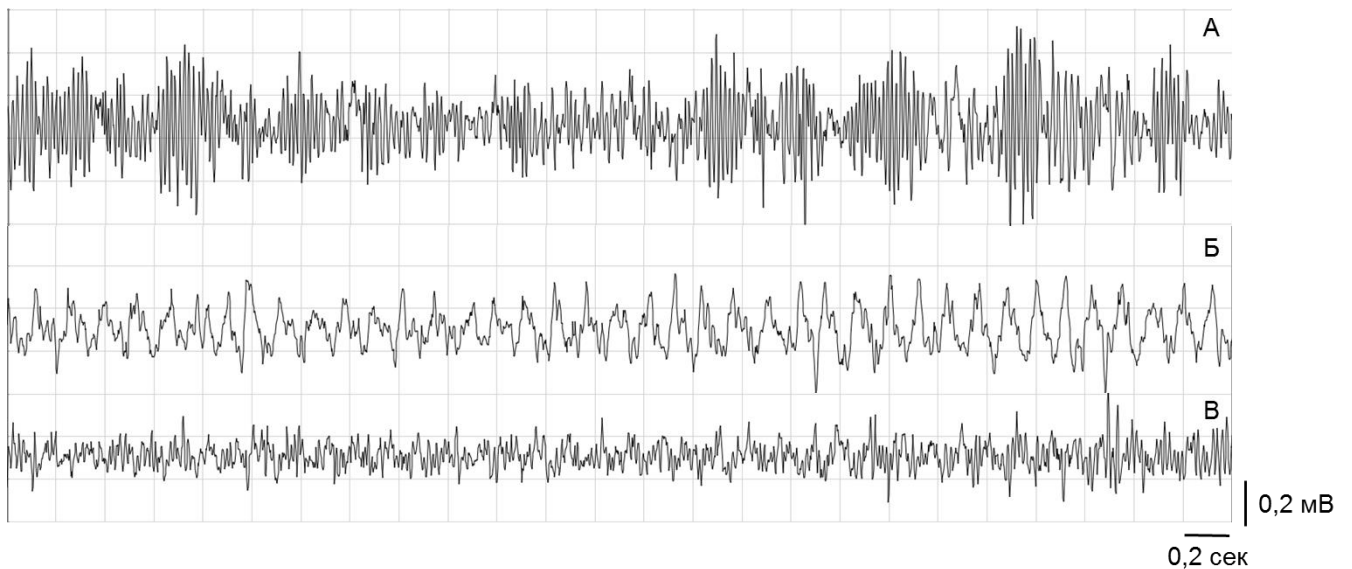


Рис. 18 – Локальні потенціали (А) нюхової цибулини, (Б) гіпокампу та (В) мигдалеподібного тіла через 15 хв після введення пілокарпіну

Після введення пілокарпіну потужність тета-ритму зростала у гіпокампі та мигдалеподібному тілі, а у нюховій цибулини, навпроти, зменшувалась. Також відбулися зміни у бета-ритмі гіпокампа та мигдалині, та у гамма-ритмі нюхової цибулини та мигдалині (*Рис. 19*).

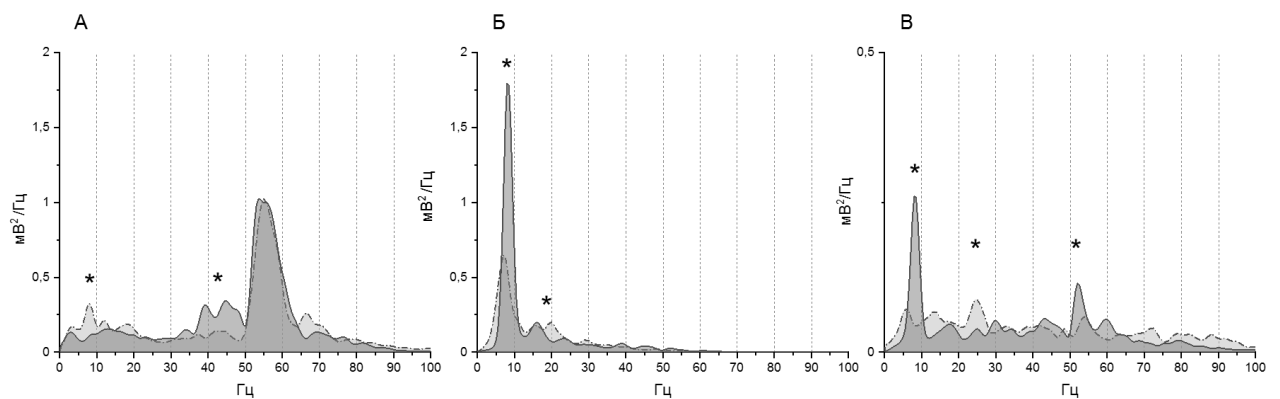


Рис. 19 – Зміни спектральної густини потужності локальних потенціалів (А) нюхової цибулини, (Б) гіпокампа та (В) мигдалеподібного тіла після введення пілокарпіну (суцільна лінія) в порівнянні з базовою (переривчаста лінія)

Хоча слід зазначити, не дивлячись на те, що потужність окремих ритмів зростала, загалом латентна фаза характеризувалась пригніченням загальної потужності у всіх ділянках. Латентна фаза закінчувалась з появою перших

іктальних спалахів. Ми виявили, що у нюховій цибулині перші іктальні спалахи з'являлися на 25 ± 7 секунд раніше ніж у гіпокампі та мигдалеподібному тілі (Рис. 20).

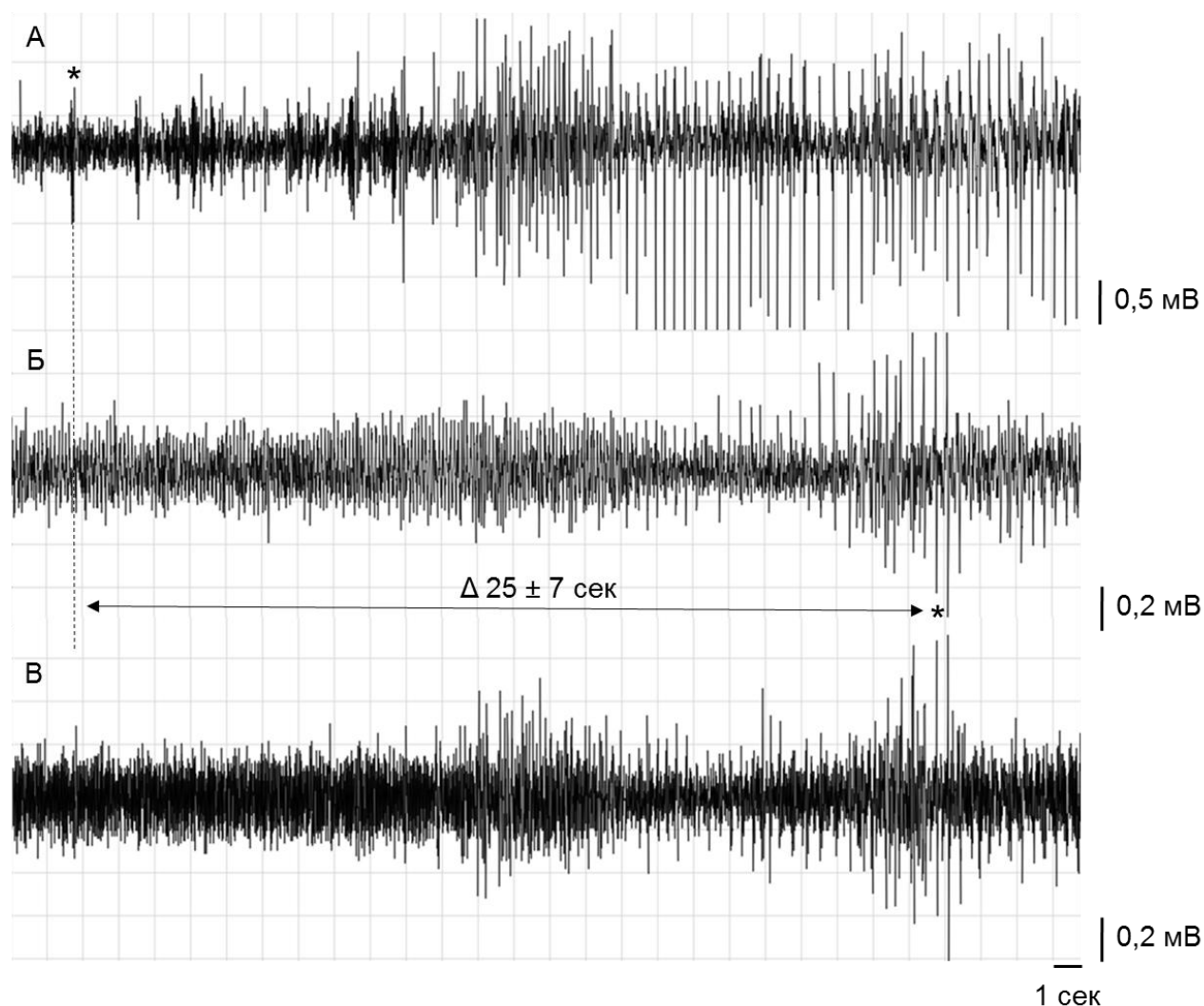


Рис. 20 – Поява перших іктальних спалахів у (А) нюхової цибулини, (Б) гіпокампі та (В) мигдалеподібному тілі. * - місці появи перших спалахів

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

3.3 Ефект блокування PAR1 на розвиток епілептичного статусу при літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.

Для кращого розуміння початку нападу та переходу до стадії епілептичного статусу в літій-пілокарпіновій моделі ми проводили спектральний та середньоквадратичний аналіз потужності (RMS - root mean square) зареєстрованих сигналів. RMS метод є одним із найпоширеніших методів для оцінки амплітуд біологічних сигналів. Амплітуди виражаються у вигляді магнітуд потужності (енергії за час) досліджуваного сигналу. (Basmajian et al., 1985; Cram et 1998). Оцінка RMS під час різних фізіологічних станів може слугувати кількісною оцінкою змін біологічних сигналів. Отримані записи фільтрувались за допомогою цифрового режекторного фільтра (50 Гц) для усунення випромінювання електромережі, та розбивались за часовими та частотними діапазонами. Аналіз проводився у всьому діапазоні частот (1 – 200 Гц) , та за фізіологічними ритмами мозку: дельта-ритм (1 – 5 Гц), тета-ритм (6 – 8 Гц), альфа-ритм (8 – 12 Гц), бета-ритм (12 – 30 Гц) та гамма-ритм (30 – 50 Гц).

Для вивчення впливу селективного блокатора PAR1 – SCH79797, дослідні тварини з ЕС були поділені на дві групи: Контроль, яким вводили NaCl (n = 7) та SCH, яким вводили блокатор (n = 7).

3.3.1 Ефект літію на базову активність гіпокампу в контролі та за умов блокування PAR1

Основними ритмами гіпокампа є тета- та гамма-ритми. Гамма-ритм має значно меншу амплітуду, і тому на графіку спектральної густини потужності в основному виділяється більш високоамплітудні ритми, такі як, наприклад, тета та дельта ритми (Рис. 21).

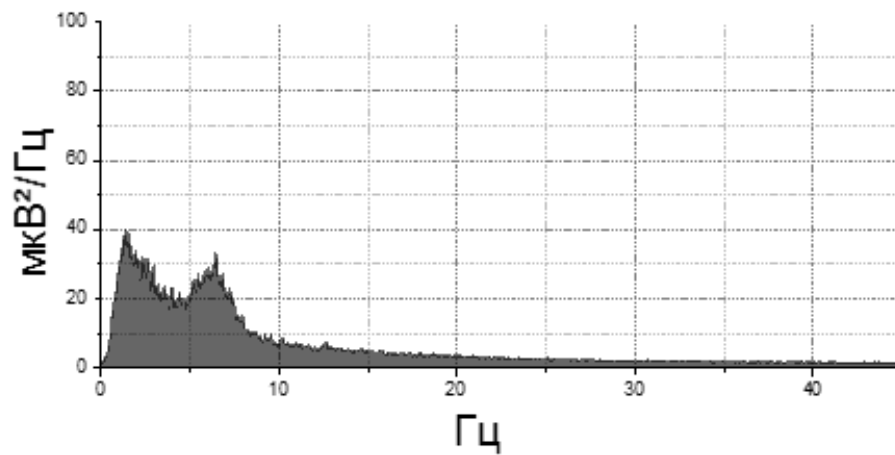


Рис. 21 - Спектральна густина потужності базової лінії контрольної тварини

Для оцінки впливу літію, розраховували RMS значення потужності сигналу за 30 хв до ін'єкції LiCl (127 мг/кг маси щура) та встановлювали це значення, як базову лінію. Еквіваленті за часовою довжиною ділянки сигналу, вільні від артефактів, брали для оцінки змін викликаних LiCl, через 1 год та через 4 год після ін'єкції. Отримані значення нормалізувались відносно базового значення, та перевірялись на статистично значущі зміни. Було встановлено, що у контрольних тварин через годину після введення LiCl спостерігалось статистично значуще зменшення потужності тета- ($p = 0,0061$) та гамма-ритмів ($p = 0,0266$) відносно базового значення. Значення потужності в окремих ритмах, так як і загальна потужність, не мали статистично достовірної різниці від базового значення (Загальна: $p = 0,1488$; Дельта: $p = 0,1367$; Альфа: $p = 0,0798$; Бета: $p = 0,1623$). Нормалізовані дані приведені на Рис. 22.

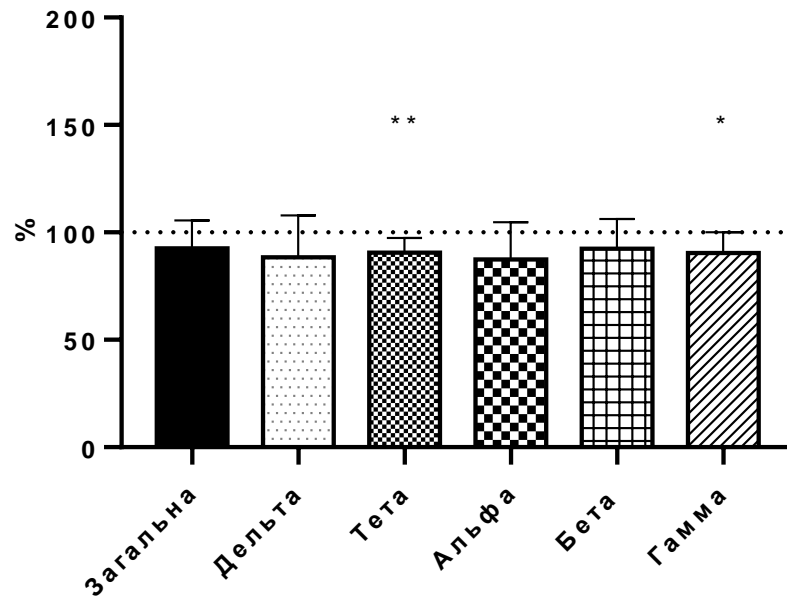


Рис. 22 - Нормалізовані значення потужності потенціалів контрольних тварин через годину після ін'єкції LiCl відносно базової лінії (100 %)

На четверту годину після ін'єкції LiCl спостерігалось статистично значуще збільшення загальної потужності сигналу (Загальна: $p = 0,0396$) та дельта- ($p = 0,0258$), тета- ($p = 0,0383$) і альфа-ритмів ($p = 0,0317$). Ритми бета ($p = 0,0889$) та гамма ($p = 0,08457$) не мали статистично значущій різниці, дані приведені на Рис. 23.

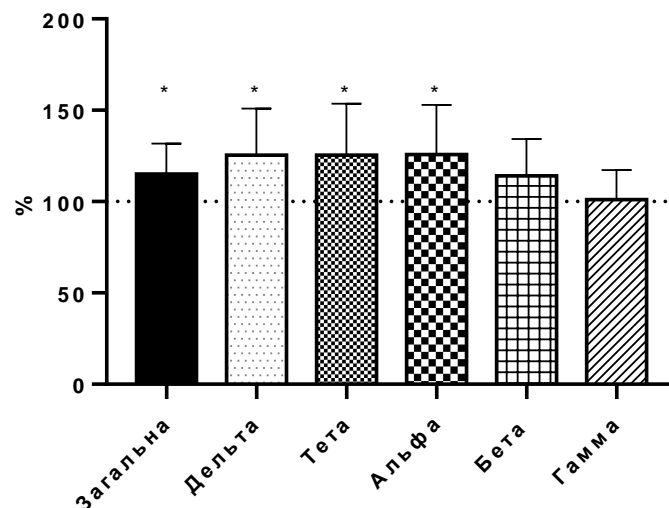


Рис. 23 - Нормалізовані значення потужності через 4 години після ін'єкції LiCl відносно базової лінії (100 %)

Нижче приведені репрезентативні графіки спектральної густини потужності у контрольній тварини через 1 год та через 4 години після ін'єкції . На графіках видно збільшення загальної потужності сигналу та підвищення домінування тета-ритму (Рис. 24).

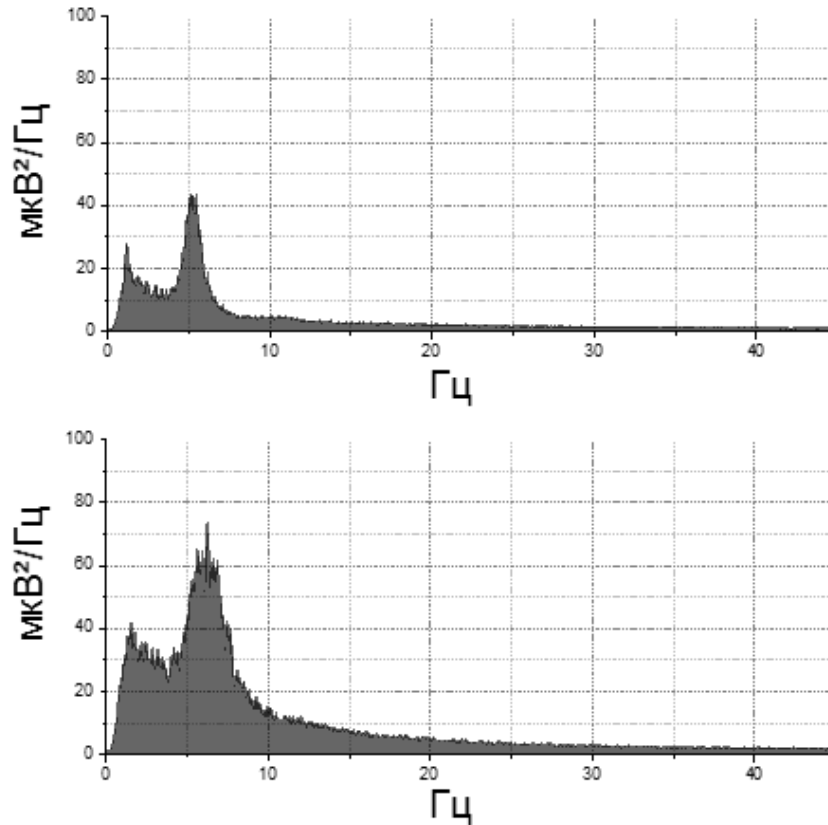


Рис. 24 - Спектральна густина потужності сигналу через 1 год та через 4 год після ін'єкції LiCl

Також, нижче приведен графік спектрального зображення розподілу потужності магнітуди сигналу (Рис. 25). На графіку чітко видно збільшення потужності сигналу с часом, після введення LiCl.

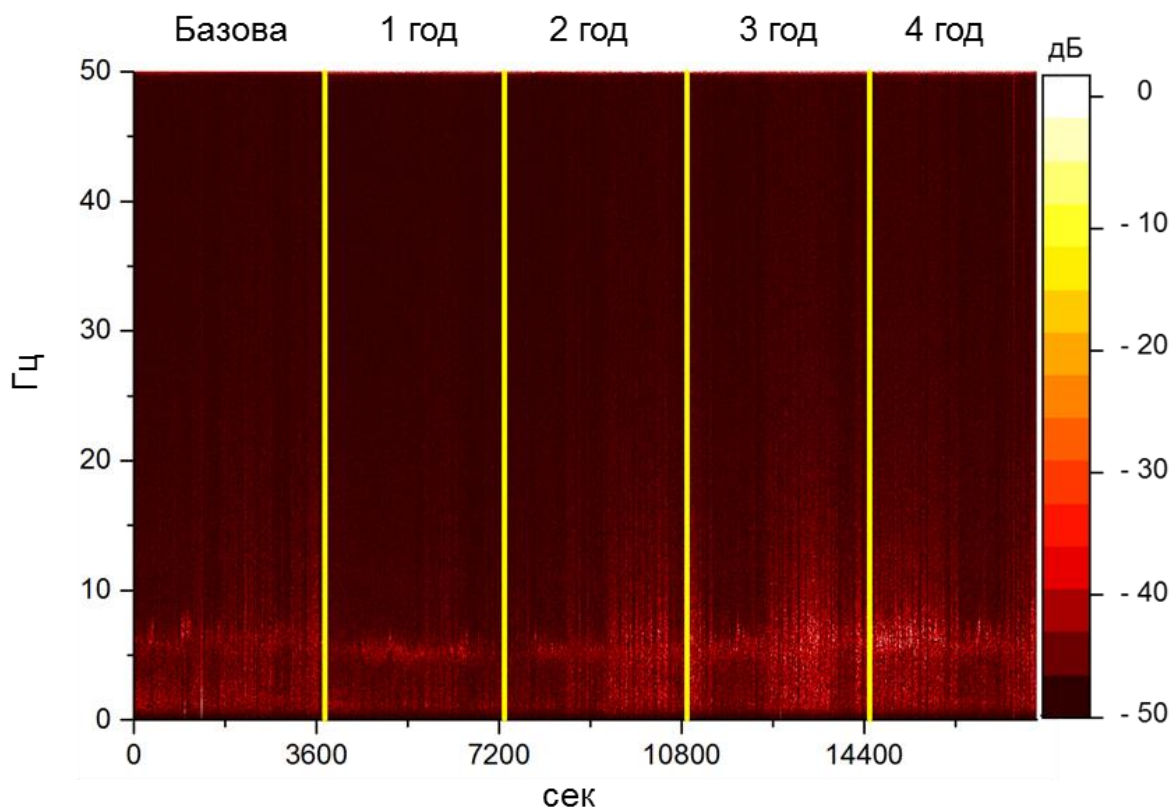


Рис. 25 - Спектральне зображення розподілу потужності сигналу під час першого дня запису. Колір відображає потужність у дБ/Гц, чим яскравіше колір тим більша магнітуда сигналу

Введення блокатора ПАР1 проводилось за 1 год до введення літій хлориду. Для оцінки впливу SCH79797 (25 мг/кг маси щура), розраховували RMS значення потужності сигналу за 30 хв до ін'єкції LiCl (127 мг/кг маси щура) та встановлювали це значення, як базову лінію. Еквіваленті за часовою довжиною ділянки сигналу, вільні від артефактів, брали для оцінки змін викликаних LiCl у тварин з SCH79797, через 1 год та через 4 год після ін'єкції.

Отриманні значення нормалізувались відносно базового значення, та перевірялись на статистично значущі зміни відносно значення базової лінії та відносно значень у тварин без ін'єкції блокатора. Отже, у тварин з SCH79797 через 1 год після введення LiCl не спостерігалось статистично значущих зменшень потужності ритмів відносно базового значення (Рис. 26).

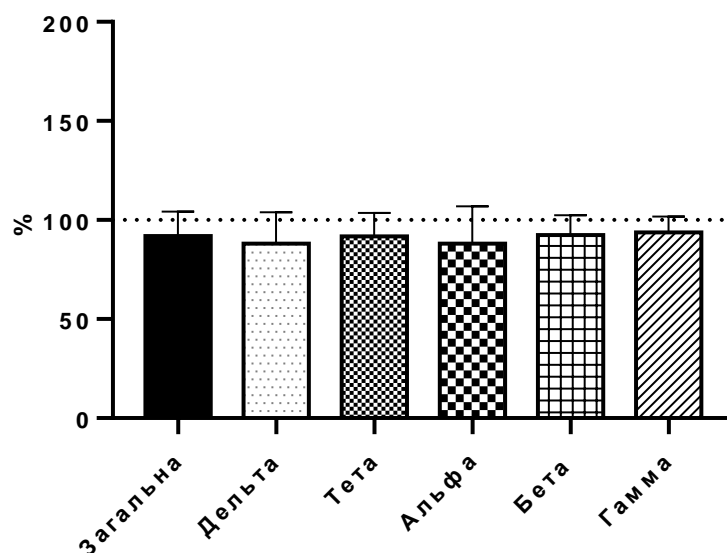


Рис. 26 - Нормалізовані значення потужності сигналу у тварин з SCH79797 через 1 год після ін'єкції LiCl відносно базової лінії (100%)

На 4-ту год після ін'єкції LiCl, у тварин з SCH79797, спостерігалось статистично значуще зменшення гамма-ритму ($p = 0,0024$). Всі інші ритми (дельта ($p = 0,0,2849$), тета ($p = 0,3146$), альфа ($p = 0,3274$) та бета ($p = 0,4539$)) не мали статистично значущій різниці, дані приведені на Рис. 27.

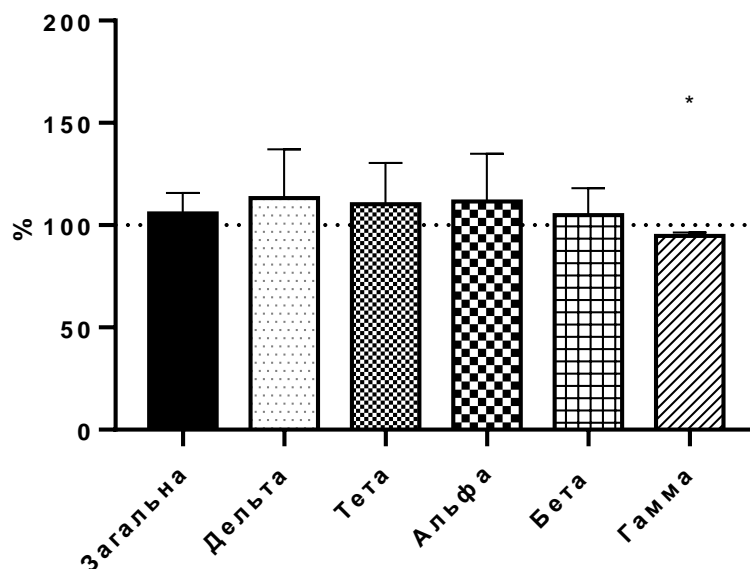


Рис. 27 - Нормалізовані значення потужності сигналу у тварин з SCH79797 через 4 год після ін'єкції LiCl відносно базової лінії (100%)

Статистичний аналіз за допомогою t-критерія Стьюдента не показав статистично значущої різниці між групами за 1 год після ін'єкції LiCl (Загальна: $p = 0,9310$) та дельта ($p = 0,9697$), тета ($p = 0,8334$), альфа ($p = 0,9498$), Бета ($p = 0,9915$) та гамма ($P = 0,5357$); Рис. 28).

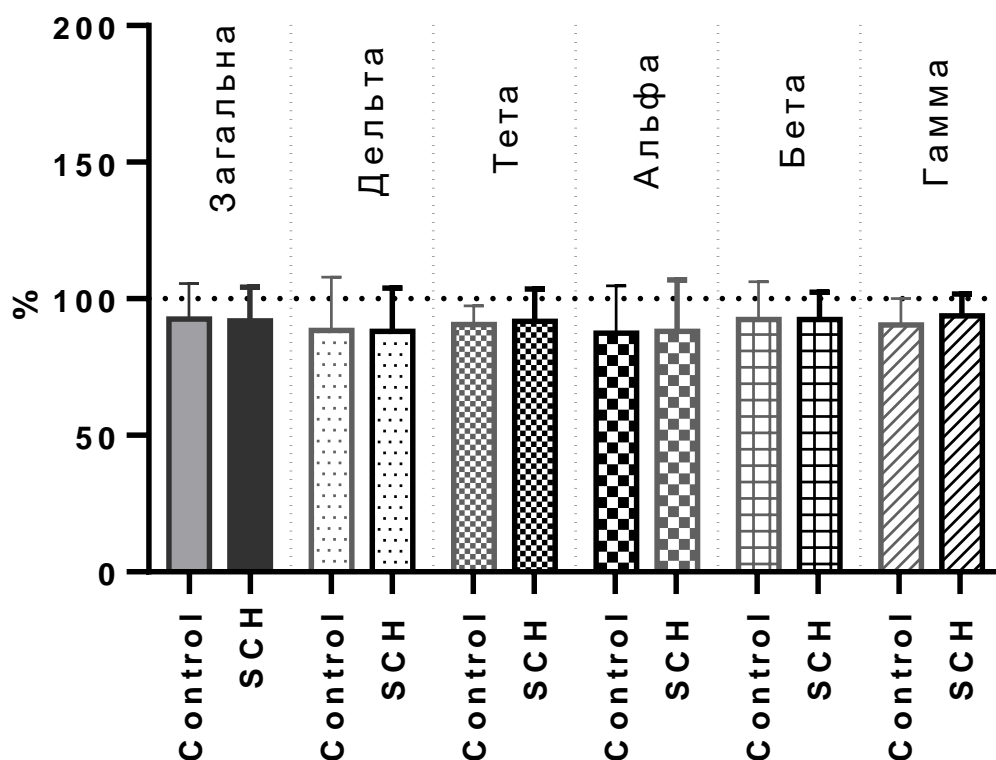


Рис. 28 - Порівняння нормалізованих значень потужності сигналу контрольних тварин, та тварин з SCH79797 через 1-ну годину після ін'єкції LiCl

Через 4-ри години після ін'єкції LiCl, статистичний аналіз також не виявив різниці між контрольними тваринами та тваринами з SCH79797 у всіх частотних діапазонах (Загальна: $p = 0,0396$) та дельта ($p = 0,0258$), тета ($p = 0,0383$) і альфа ($p = 0,0317$), бета ($p = 0,0889$) та гамма ($p = 0,08457$) ритми; Рис. 29).

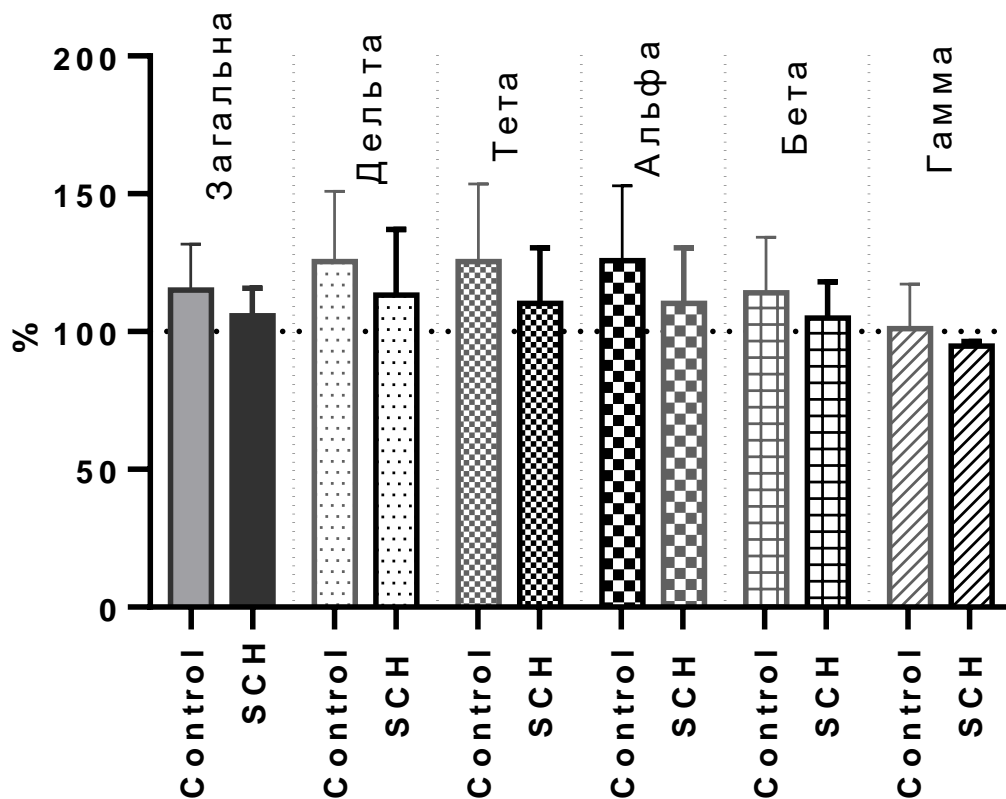


Рис. 29 - Порівняння нормалізованих значень потужності сигналу контрольних тварин, та тварин з SCH79797 через 4 год після ін'єкції LiCl

3.3.2 Ефект блокування ПАР1 на розвиток епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії

У контрольних тварин, через декілька хвилин після першої ін'єкції пілокарпіну спостерігалось пригнічення потужності майже у всіх частотних діапазонах [(Загальна: $P < 0,0001$), дельта ($P < 0,0001$), альфа ($P < 0,0001$), бета ($P < 0,0001$) та гамма ($P = 0,0052$)], окрім тета-риму ($P = 0,5016$). Нормалізовані дані приведені на Рис. 30.

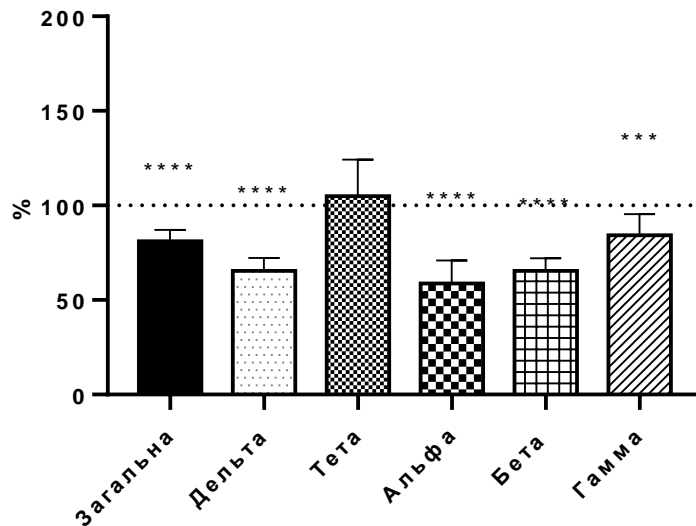


Рис. 30 - Нормалізовані значення потужності сигналу у контрольних тварин протягом 30 хв після першої ін'єкції пілокарпіну відносно базової лінії (100 %)

Ця фаза характеризується як «латентна», тобто це проміжок між ін'єкцією (або початком дії) пілокарпіну і першим іктальним проявом активності. Іктальний прояв визначався як підвищення значення RMS потужності більш ніж на 200 % від базового значення. Проміжок між першим іктальним проявом та початком епілептичного статусу характеризується як «транзитна» фаза. Під час транзитної фази у контрольних тварин спостерігалось статистично значуще збільшення відносно базового значення майже всіх ритмів [(Загальна: $p = 0,0036$); тета ($p < 0,0001$), альфа ($p = 0,028$), бета ($p < 0,0001$) та гамма ($P < 0,00001$)], окрім дельта ($p = 0,8699$). Однак слід зазначити що дельта-ритм збільшився, як звісно і всі ритми, відносно значення у латентній фазі. Нормалізовані середні значення ритмів у транзитній фазі наведені на Рис. 31.

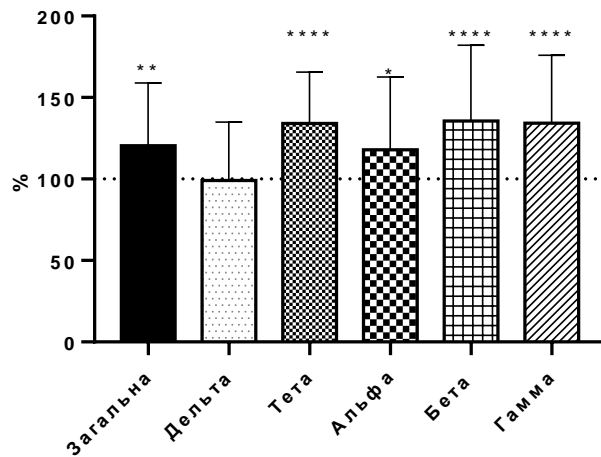


Рис. 31 - Нормалізовані значення потужності сигналу у контрольних тварин протягом транзитної фази, тобто після першого іктального підвищення потужності до початку епілептичного статусу

Початок епілептичного статусу визначається як значне перманентне підвищення RMS потужності сигналу. На приведених нижче графіках спектрального зображення розподілу потужності магнітуди сигналу (Рис. 32).

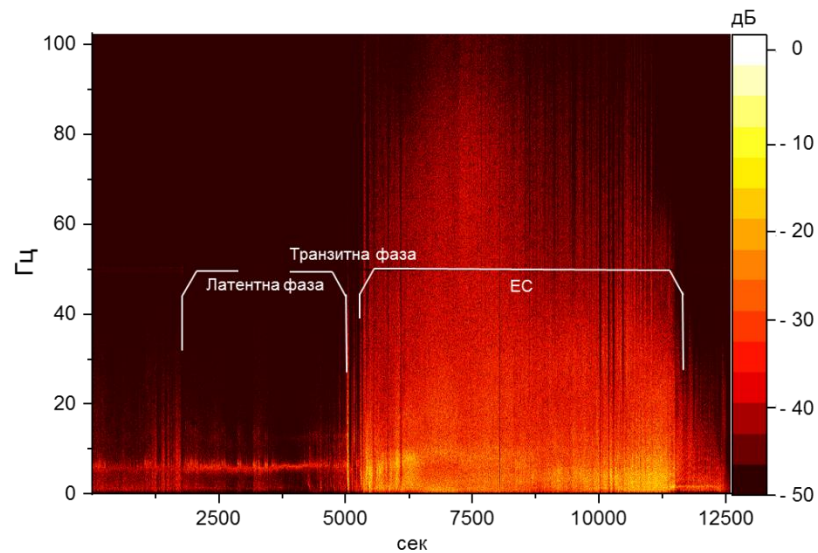


Рис. 32 - Спектральне зображення розподілу потужності сигналу під час ініціації у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії у контрольних тварин. Колір відображає потужність у дБ/Гц, чим яскравіше колір тим більша магнітуда сигналу

Також приведений середньоквадратичний аналіз потужності (RMS) контрольної тварини під час ініціації епілептичного статусу (Рис. 30). На цих графіках чітко видно початок латентної фази, а саме пригнічення загальної потужності локальних потенціалів в наслідок дії пілокарпіну та розвиток ЕС у вигляді значного підвищення потужності сигналу. На графіках спостерігається пригнічення потужності сигналу (латентна фаза), розвиток епілептичного статусу (транзитна фаза) та епілептичний статус.

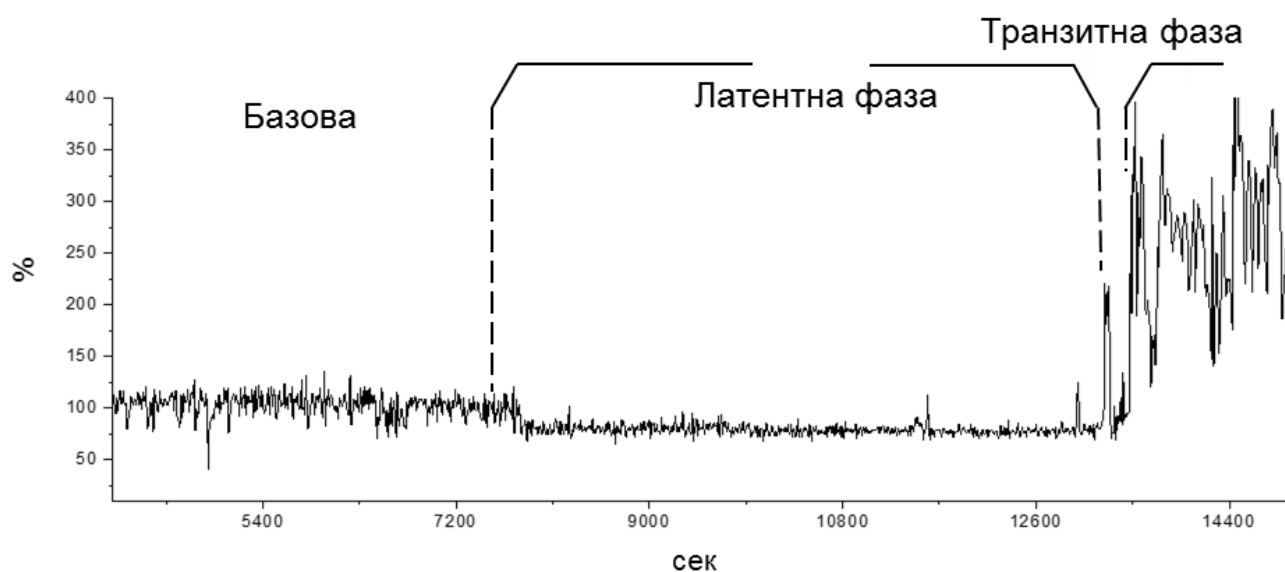


Рис. 33 - Середньоквадратичний аналіз потужності (RMS) сигналу під час ініціації у літій пілокарпіновій моделі епілепсії у контрольних тварин. За 100 % взято RMS базового відрізка сигналу, та весь сигнал нормалізований відносно базової лінії

Між тваринами з SCH79797 та контрольними тваринами не було статистично значущої різниці ($p = 0,4482$) за середнім часом становлення епілептичного статусу. У контрольних тварин цей час був $65,22 \pm 21,18$ хвилин, а у тварин з SCH79797 - $75,33 \pm 29,1$ хвилин (Рис. 34).

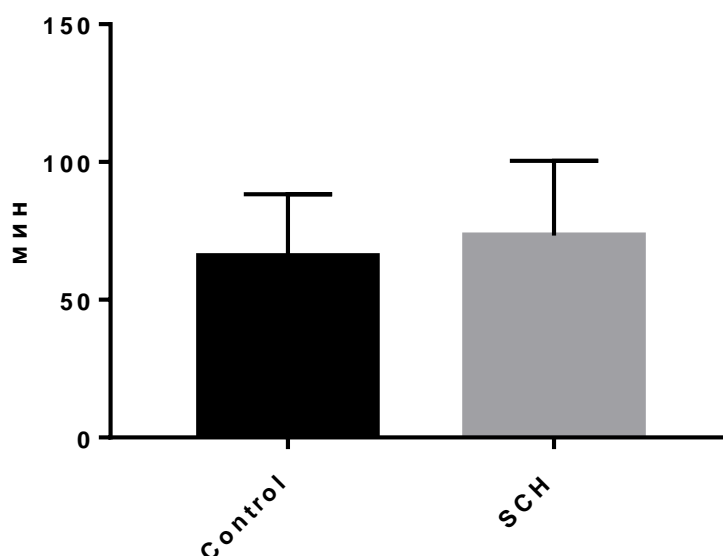


Рис. 34 - Середній час становлення епілептичного статусу

У тварин з SCH79797, через декілька хвилин після першої ін'єкції пілокарпіну теж спостерігалось пригнічення потужності майже у всіх частотних діапазонах [(Загальна: $p < 0,0001$) та дельта ($p < 0,0001$), альфа ($p = < 0,0001$), бета ($P < 0,0001$) та гамма ($p = 0,0052$)], окрім тета-риму ($p = 0,5016$). Нормалізовані дані приведені на Рис. 35

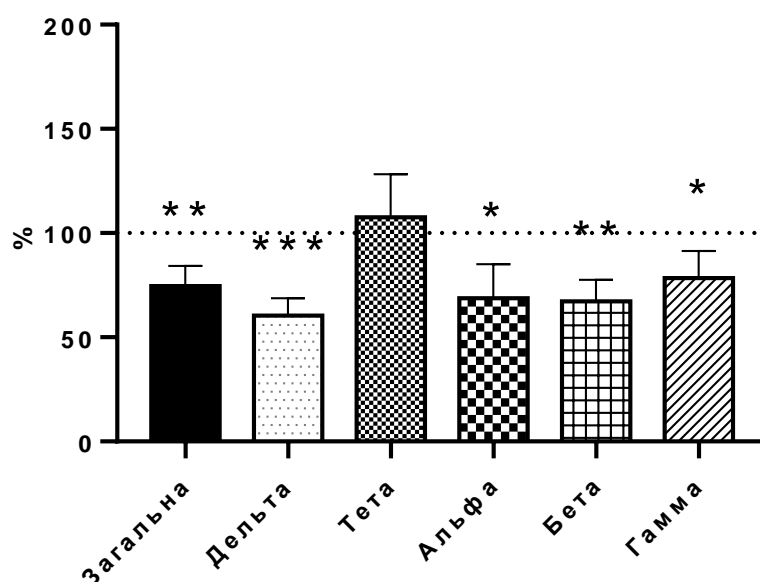


Рис. 35 - Нормалізовані значення потужності сигналу у тварин з SCH79797 протягом 30 хв після першої ін'єкції пілокарпину відносно базової лінії (100 %)

Під час транзитної фази у тварин з SCH79797 не спостерігалось статистично значуще змін відносно базового значення майже всіх ритмів [(Загальна: $p = 0,5258$); дельта ($p = 0,3058$), тета ($p = 0,9536$), альфа ($p = 0,5441$), бета ($p = 0,1279$) та гамма ($p = 0,2310$)]. Але, відносно латентної фази відбулося підвищення потужності усіх ритмів (Рис. 36).

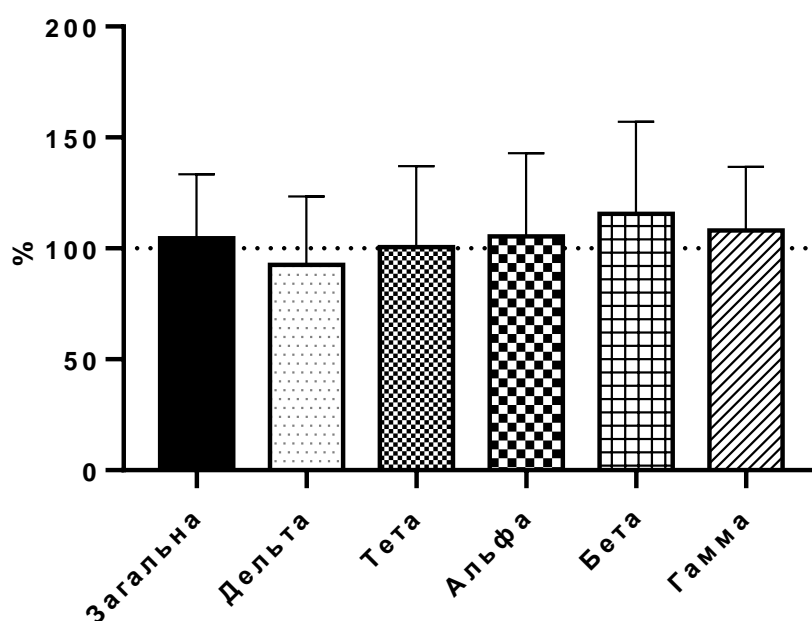


Рис. 36 - Нормалізовані значення потужності сигналу у тварин з SCH79797 протягом транзитної фази

Отже, протягом латентної фази спостерігалось значне зменшення потужності ритмів, окрім тета, як у контрольних тварин, так і у тварин з SCH79797. Статистичний аналіз не виявив відмінностей між двома групами протягом латентної фази (Рис. 37).

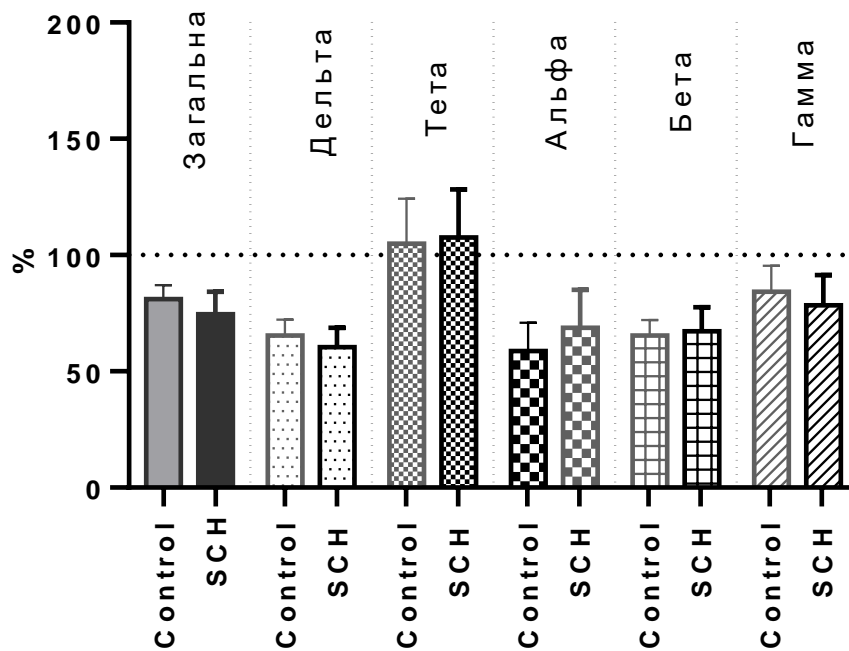


Рис. 37 - Порівняння нормалізованих значень потужності сигналу контрольних тварин, та тварин з SCH79797 протягом латентної фази ініціації епілептичного статусу

Однак, у тварини з SCH79797 протягом транзитної фази спостерігалось значно менше збільшення потужності сигналу, ніж у контрольних тварин. Статистично значущу різницю було виявлено між тета ($p = 0,0014$) та гамма ($p = 0,0412$) ритмами. У тварин з SCH79797 потужність цих ритмів була значно меншою, ніж у контрольних тварин (Рис. 38).

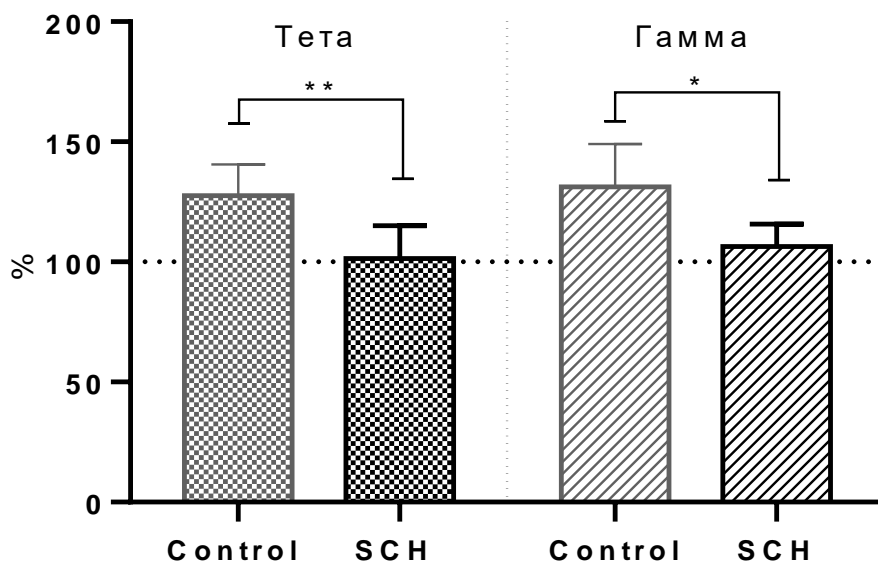


Рис. 38 - Порівняння нормалізованих значень потужності сигналу контрольних тварин, та тварин з SCH79797 протягом транзитної фази ініціації епілептичного статусу

Отримані дані можуть свідчити про те, що блокування протеазаактивованих рецепторів типу 1 за допомогою селективного блокатора SCH79797 не впливає на зміни локальних потенціалів гіпокампа, які були викликані літєм у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії у щурів. Також, не було виявлено відмінностей у зменшенні потужності сигналу викликаною ін'єкцією пілокарпіну у літій – пілокарпіновій моделі епілепсії. Проте було виявлено вплив блокатора на розвиток епілептичного статусу, а саме, на потужність тета та гамма-ритмів під час «транзитної» фази розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. У тварини с блокатором спостерігалось значно менше збільшення потужності сигналу, ніж у контрольних тварин.

3.4 Вплив фармакологічної блокади ПАР1 на поведінкові реакції щурів

Перед проведенням поведінкових дослідів на дослідження впливу фармакологічної блокади ПАР1 рецепторів на поведінкові реакції щурів у латентний та хронічний періоди розвитку епілепсії нами були проведені

дослідження впливу блокування ПАР1 на поведінкові реакції контрольних щурів. Для цього здоровим щурам яким не проводили індукцію ЕС, вводили блокатор SCH79797 згідно протоколів для дослідження впливу блокування ПАР1 у латентний та хронічний періоди епілепсії. Тварини були поділені на дві групи: Control (n = 10) - контрольні тварини без епілептичного статусу, яким вводився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; SCH (n = 10) - тварини без епілептичного статусу, але з ін'єкціями блокатору у дозі 25 мкг/кг. У тесті «відкрите поле» блокування ПАР1 не викликало змін у поведінці щурів. Так, не було виявлено статистично достовірної різниці за основними показниками: загальна пройдена дистанція (Рис. 39А; $t = 1,421$ $p < 0,175$) та співвідношення часу знаходження у внутрішньому периметрі (Рис. 39Б; $t = 0,754$ $p < 0,461$).

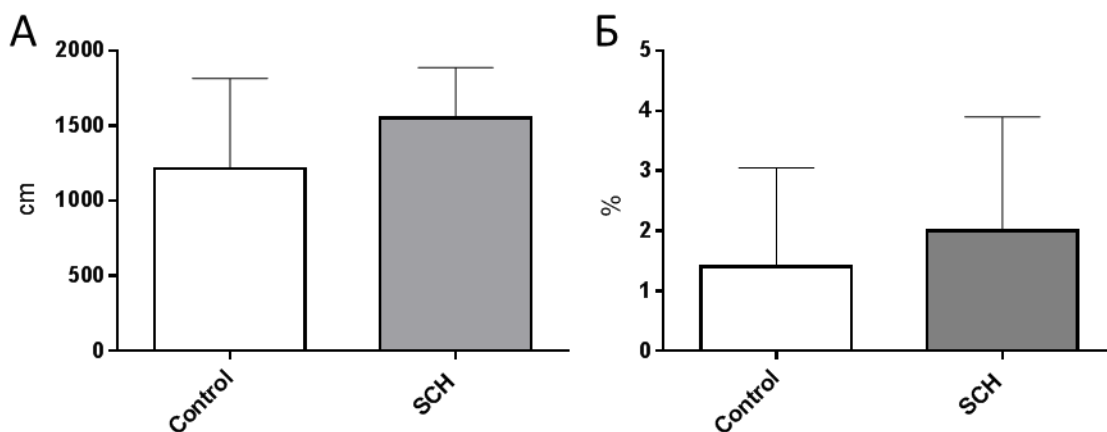


Рис. 39 – Ефект блокування ПАР1 рецептора у тесті «відкрите поле». Загальна пройдена дистанція (А) та час проведений у внутрішньому периметрі відносно загального часу (В)

У тесті «хрестоподібний лабіринт» ми також не виявили змін у поведінці щурів з блокатором ПАР1 відносно контрольної групи: загальна пройдена дистанція (Рис. 40А; $t = 1,068$, $p < 0,301$), співвідношення часу знаходження у відкритих рукавах (Рис. 40Б; $t = 0,533$, $p < 0,601$) та співвідношення кількості заходів у відкриті рукава (Рис. 40В; $t = 0,457$, $p < 0,654$).

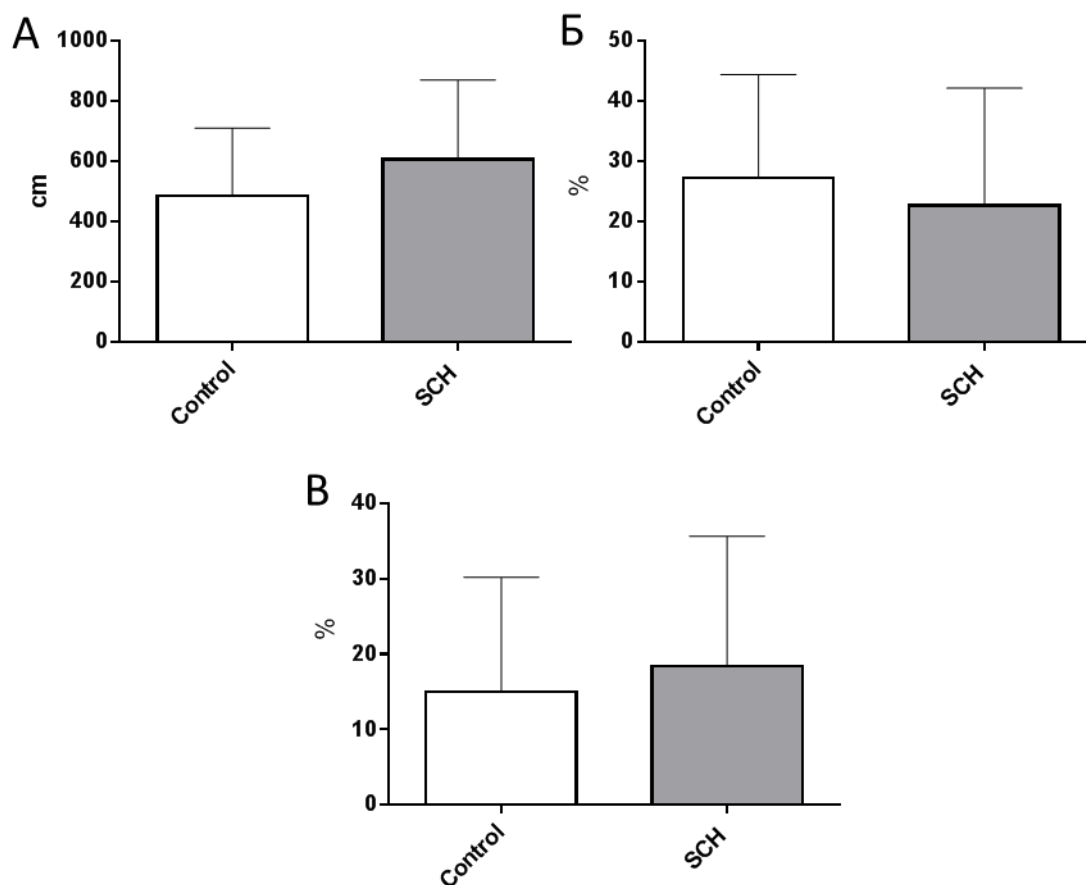


Рис. 40 – Ефект блокування ПАР1 рецептора у тесті «хрестоподібний лабіринт». Загальна пройдена дистанція (А), відсоток кількості входів у відкриті рукава (Б) та відсоток часу проведеного у відкритих рукавах (В)

У тесті на дослідження обумовленого страху час завмирання у тварин з ПАР1 перед (contextual conditioning) та під час (conditioning to tone) звукового сигналу у другий «тренувальний» день не відрізнявся між групами (Рис. 41АБ; перед: $t = 0,756$, $p < 0,703$; підчас: $t = 0,645$, $p < 0,77$). На третій «тестовий» день у групи з блокатором ПАР1 час завмирання перед сигналом був нижчий, а час завмирання підчас сигналу не відрізнявся від групи без блокатора (Рис. 41АБ; перед: $t = 2,24$, $p < 0,05$; підчас: $t = 0,905$, $p < 0,605$).

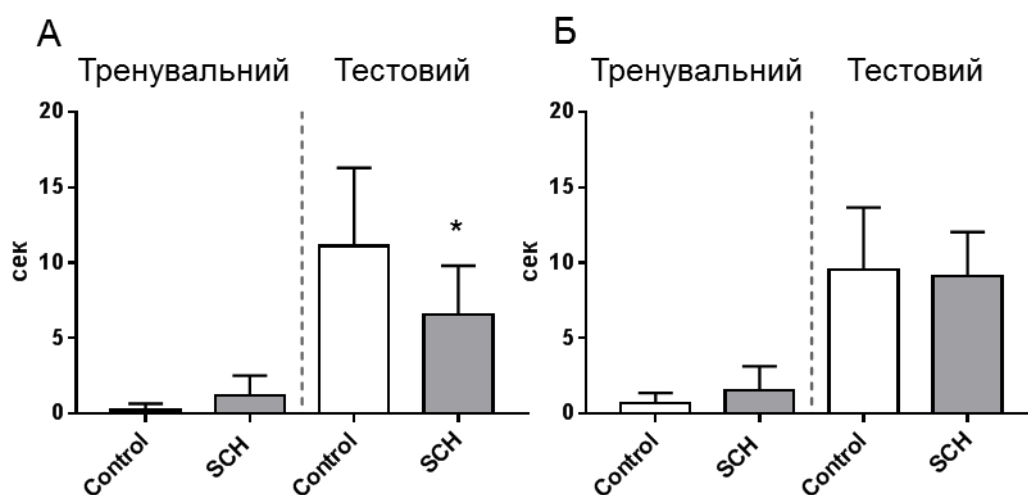


Рис. 41 - Ефект блокування ПАР1 рецептора на рівень обумовленого страху перед (А - contextual conditioning) та підчас (Б - conditioning to tone) звукового сигналу у «тренувальний» та «тестовий» дні

Наведені вище результати отримані для контрольних тварин за протоколом дослідження поведінкових реакцій у хронічний період епілепсії. Отримані дані можуть свідчати про те що блокування ПАР1 рецепторів за допомогою селективного антагоніста SCH79797 може впливати на рівень контекстуального страху у дорослих щурів. Але слід зазначити що різниця не дуже велика і спостерігається лише у одному параметрі, чого не достатньо для того щоб зробити висновок що, блокування ПАР1 впливає на рівень емоційно-обумовленої пам'яті у контрольних тварин. До того ж, у контрольних тварин за протоколом дослідження поведінкових реакцій у латентний період ми не виявили ніякої різниці між тваринами за усіма тестами. Отже, загалом, можна стверджувати що, блокування ПАР1 рецептора несуттєво впливає на поведінкові реакції дорослих щурів.

3.5 Вплив ЕС та фармакологічної блокади ПАР1 рецепторів на поведінкові реакції щурів у латентний період розвитку епілепсії

Для цього експерименту тварини були поділені на три групи: Control (n = 10) – контрольні тварини без епілептичного статусу, яким водився фізіологічний

розчин у еквівалентному об'ємі; SE (n = 10) – тварини з епілептичним статусом, яким водився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; SE + SCH (n = 10) - тварини з епілептичним статусом, яким вводився блокатор.

Для вивчення ефекту блокування ПАР1, групі щурів SE + SCH двічі інтраперітоніально вводили блокатор SCH79797 у дозі 25 мкг/кг під час ініціації ЕС у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Перший раз - за годину до введення хлориду літію, другий – за годину до введення пілокарпіну. Через 14 діб після епілептичного статусу усі тварини проходили поведінкові тести.

3.5.1 Зміни рівня тривожності та локомоторної активності в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у латентний період

За параметром загальної пройденої дистанції різниця між групами була виявлена лише у тесті «відкрите поле». Так тварини груп SE та SE+ SCH пройшли значно більшу дистанцію у цьому тесті ніж контрольні тварини (one-way ANOVA: $F(2, 21) = 11,29$, $p < 0,05$; post-hoc: SE – $p < 0,01$; SE+ SCH – $p < 0,001$; Рис. 42А). У тесті «хрестоподібний лабіринт» ми не виявили статистично значущої різниці між групами (one-way ANOVA: $F(2, 21) = 1,312$, $p = 0,29$; Рис. 42Б).

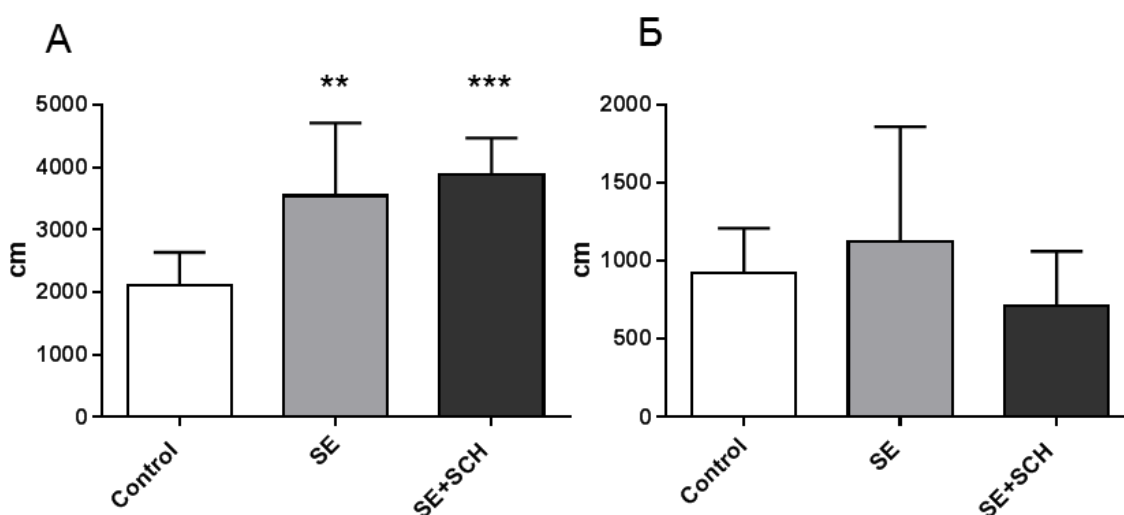


Рис. 42 – Ефект блокування ПАР1 на рівень загальної пройденої дистанції у тестах (А) «відкрите поле» та (Б) «хрестоподібний лабіринт» у латентний період. **;*** $p < 0,01$; $0,001$

За часом знаходження у внутрішньому периметрі у тесті «відкрите поле» ми виявили різницю лише між групами SE та Control, показник групи SE + SCH не відрізнявся від інших груп (one-way ANOVA: $F(2, 21) = 3,957$, $p < 0,05$; post-hoc: SE : Control – $p < 0,01$; SE + SCH : Control – $p = 0,23$, SE – $p = 0,61$; Рис. 43А). У тесті «хрестоподібний лабіринт» ми не виявили статистично значущої різниці між групами за кількістю входів у відкриті рукава (one-way ANOVA: $F(2, 20) = 2,982$, $p = 0,08$; Рис. 43Б). та часом проведення у відкритих рукавах (one-way ANOVA: $F(2, 20) = 2,462$, $p = 0,11$; Рис. 43В).

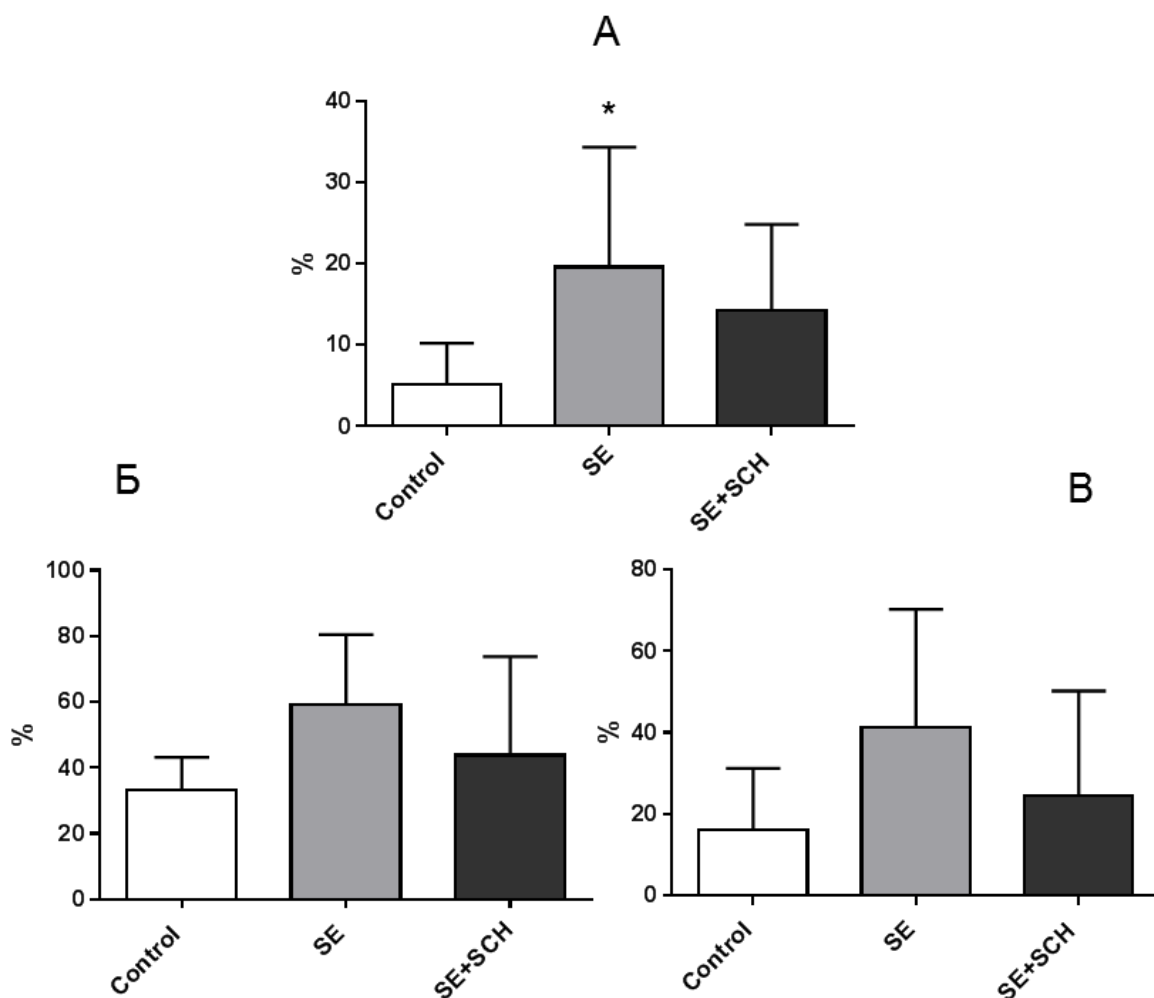


Рис. 43 - Ефект блокування ПАР 1 на показники тривожності щурів з епілептичним статусом у тестах «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт» у латентний період. Час проведений у внутрішньому периметрі відносно загального часу (А) у тесті «відкрите поле». Кількість входів (Б) та час

у відкритих рукавах (B) у тесті «хрестоподібний лабіринт». **:*** $p < 0,01$; 0.001 відносно Control;

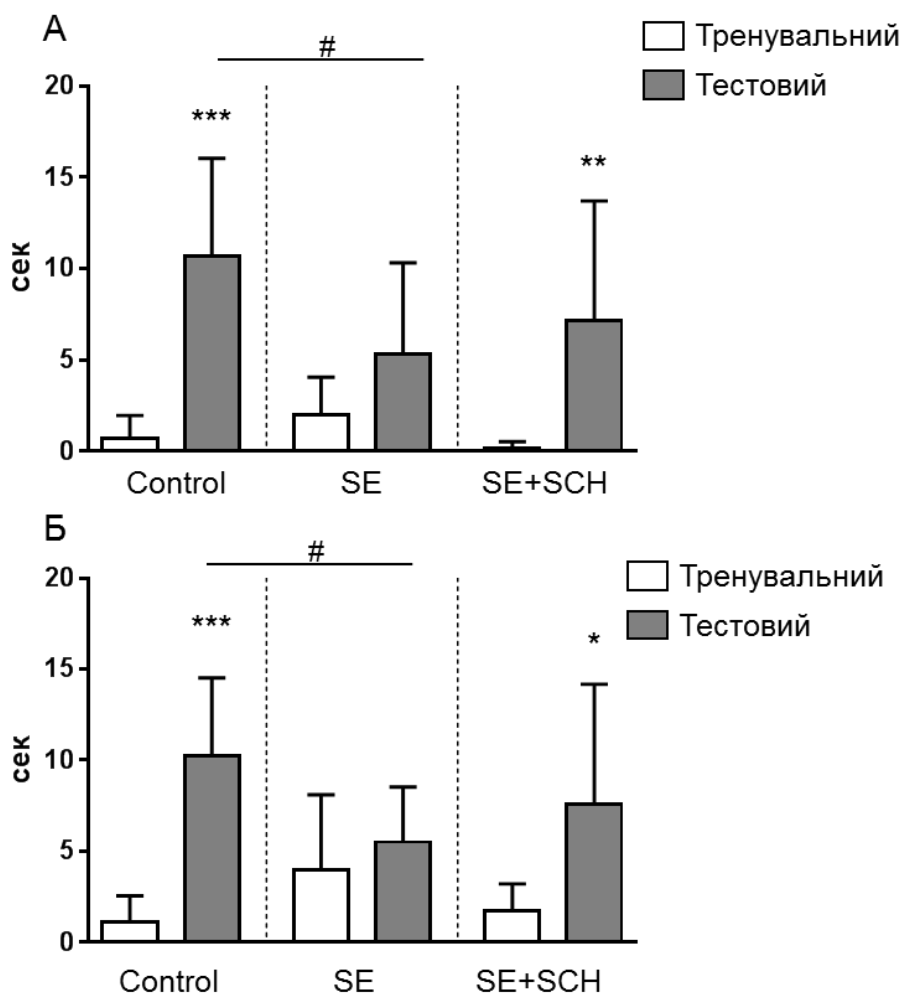
Отримані дані свідчать про збільшення локомоторної активності в обох групах щурів з епілептичним статусом, хоча слід зазначити що, підвищення спостерігалось лише у тесті «відкрите» поле». Тривожності була меншою лише у тварин групи SE, і проявлявся тільки у тесті «відкрите поле». За тестом «хрестоподібний лабіринт» ми не виявили статистично значущих відмінностей між групами за усіма параметрами. Це свідчить про незначний вплив ЕС в контролі, та за умов блокування ПАР1 рецепторів на зміни в поведінці щурів у латентний період розвитку епілепсії.

3.5.2 Зміни рівня обумовленого страху в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у латентний період

Реакція тварин на перед першим та підчас першого звукового сигналу у «тренувальний» день не відрізнялася між групами. Це свідчить про те що, до отримання негативного досвіду у вигляді електричного розряду тварини усіх груп однаково реагували на оточення в якому знаходились (contextual) та на звуковий стимул (tone).

Реакція контекстуального страху (contextual conditioning), яка проявляється у вигляді підвищеного часу завмирання перед звуковим сигналом у «тестовий» день в порівнянні з «тренувальним», спостерігалася у груп Control та SE + SCH (two-way ANOVA: $F(1, 23) = 38,38$, $p < 0,001$; post-hoc: Control – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,01$; Рис. 44А). Також тварини групи Control завмирили значно більше в порівнянні з групою SE (two-way ANOVA: $F(2, 23) = 3,461$, $p < 0,05$; post-hoc: Control – $p < 0,05$; Рис. 44А). У тварин групи SE спостерігалася тенденція до збільшення часу завмирання перед звуковим сигналом, але ми не виявили статистично значущої різниці. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на оточення, так званого контекстуального страху у тварин з епілептичним статусом.

Реакція обумовленого страху (conditioning to tone), яка характеризується підвищенням часу завмирання під час звукового сигналу у «тестовий» день в порівнянні з «тренувальним», також спостерігалася у груп Control та SE + SCH: (two-way ANOVA: $F(1, 21) = 28,48$, $p < 0,001$; post-hoc: Control – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,05$; Рис. 44Б). Але, як і у випадку до стимулу, реакція страху на звуковий стимул у тварин групи Control була вища порівняно з такою у групі SE (two-way ANOVA: $F(2, 21) = 4,892$; post-hoc: Control – $p < 0,05$; Рис. 44Б). Ми також не виявили статистично значущої різниці у групі SE за часом завмирання під час стимулу. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на стимул, так званого обумовленого страху у тварин з епілептичним статусом.



*Рис. 44 - Ефект блокування ПАР1 на поведінку тварин під час тестів на пам'ять, обумовлену страхом. Час завмирання (А) до звукового стимулу (contextual conditioning), та (Б) протягом звукового стимулу на другий «тренувальний» день та третій «тестувальний» день. «Тренувальний» vs «тестовий» дні - *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$; порівняння у «тестовий» день між групами - # $p < 0,05$*

Загалом, отриманні дані свідчать про те що, блокування ПАР1 нормалізує рівень локомоторної активності та емоційно-зумовленої пам'яті у тварин після ЕС у латентний період розвитку епілепсії. Але слід зазначити що у контрольній групі блокування ПАР1 призвело до зниження рівня контекстного та обумовленого страху. Таким чином, блокування ПАР1 у нормальному мозку може бути шкідливим, тоді як після епілептичного статусу має терапевтичний ефект у тварин у хронічний період розвитку епілепсії.

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

Для цього експерименту тварини були поділені на три групи: Control (n = 20) – контрольні тварини без епілептичного статусу, яким водився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; SE (n = 12) – тварини з епілептичним статусом, яким водився фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі; SE + SCH (n = 14) - тварини з епілептичним статусом, яким вводився блокатор.

Для вивчення ефекту блокування ПАР1, групі щурів SE + SCH інтраперитоніально вводили блокатор SCH79797 у дозі 25 мкг/кг аси щура через 20-30 хвилин після зупинки епілептичного статусу. Введення продовжували кожен день протягом 10-ти діб.

Через 60 діб після епілептичного статусу усі тварини протягом 6 діб, по 12 год в день, спостерігались за допомогою системи відео моніторингу. Отримані

відеореєстрації аналізувались на наявність спонтанних епілептичних нападів. Так як напади 1-2 стадії за шкалою Расіна дуже важко розрізнити від нормальної поведінки щурів, у розрахунок брали тільки напади, які розвивались до 3-5 стадії за шкалою Расіна. Далі всі тварини проходили поведінкові тести. Тварини проходили тест лише за умови, якщо в них не спостерігали напад протягом години до проведення тесту.

3.6.1 Вплив блокування ПАР1 на кількість спонтанних повторювальних нападів у хронічний період

Спонтанні повторюванні напади спостерігались у 9 з 12 щурів (75%) в SE + vehicle групі та у 6 з 14 щурів (46%) в групі SE+ SCH.

3.6.2 Зміни рівня тривожності та локомоторної активності в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у хронічний період

Ми виявили статистично достовірну різницю за показником загальної пройденої дистанції у групах тварин SE та SE+ SCH у порівнянні з контрольними тваринами, як у тесті «відкрите поле» (one-way ANOVA: $F(2, 38) = 15,59$, $p < 0,001$; post-hoc: SE – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,001$; Рис. 45А), так і у тесті «хрестоподібний лабіринт» (one-way ANOVA: $F(2, 34) = 10,12$, $p < 0,001$; post-hoc: SE – $p < 0,01$; SE+ SCH – $p < 0,001$; Рис. 45Б).

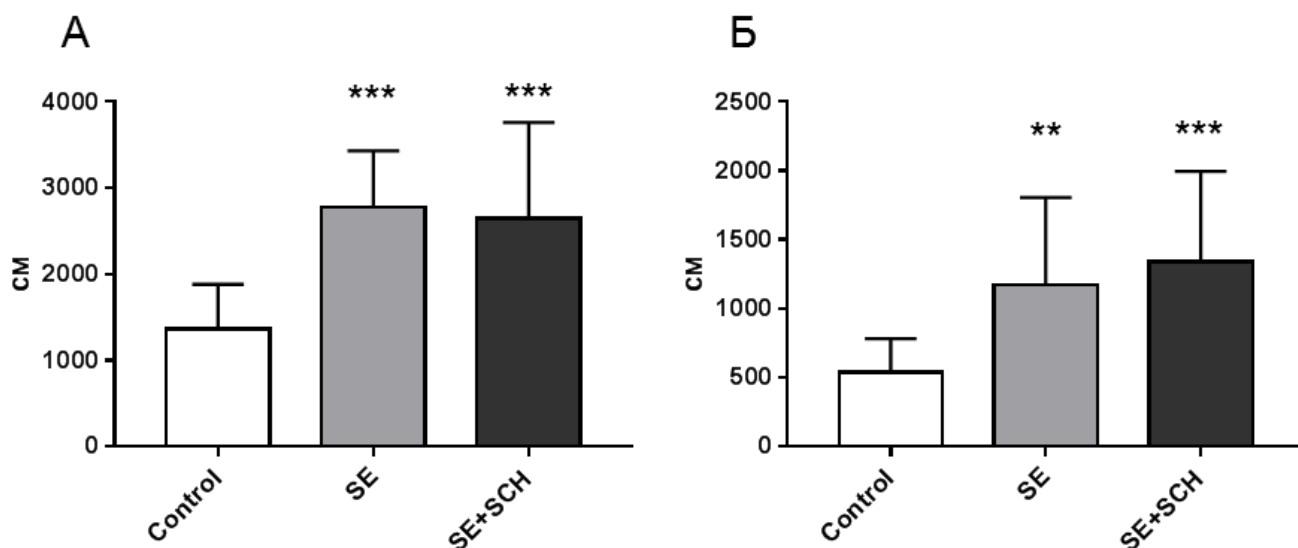


Рис. 45 – Вплив блокування ПАР1 на рівень загальної пройденої дистанції у тестах (А) «відкрите поле» та (Б) «хрестоподібний лабіринт». **;*** $p < 0,01$; 0.001

Співвідношення часу знаходження у внутрішньому периметрі к загальному часу у тесті «відкрите поле» було вищим відносно групи Control лише у групі SE (one-way ANOVA: $F(2, 40) = 5,957$, $p < 0,01$; post-hoc: SE – $p < 0,01$; SE + SCH – $p < 0,11$; Рис. 46А). У тесті «хрестоподібний лабіринт» спостерігалось статистично значуще підвищення кількості входів у відкриті рукави у тварин групи SE, як відносно групи Control, так і відносно SE + SCH (one-way ANOVA: $F(2, 40) = 5,957$, $p < 0,01$; post-hoc: Control – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,01$; Рис. 46Б). Схожий результат був виявлений у часі проведенню у відкритих рукавах, він був вищий у тварин групи SE, як відносно групи Control, так і відносно SE + SCH (one-way ANOVA: $F(2, 34) = 11,46$, $p < 0,01$; post-hoc: Control – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,01$; Рис. 46В).

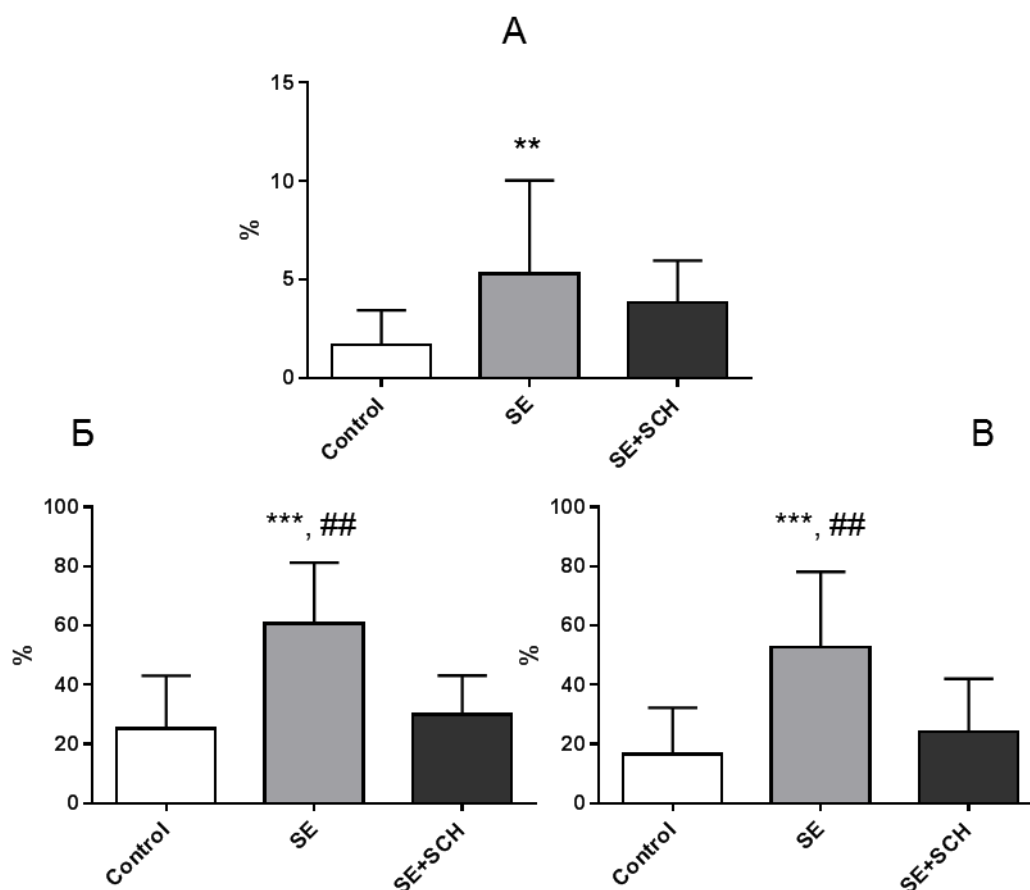


Рис. 46 - Вплив блокування ПАР 1 на показники тривожності щурів з епілептичним статусом у тестах «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт». Час проведений у внутрішньому периметрі відносно загального часу (А) у тесті «відкрите поле». Кількість входів (Б) та час у відкритих рукавах (В) у тесті «хрестоподібний лабіринт». **,*** $p < 0,01; 0.001$ відносно Control; ## $p < 0,01$ відносно SE + SCH

Отримані дані вказують на збільшення загальної пройденної дистанції в обох групах щурів з епілептичним статусом. Але за часом проведеним у внутрішньому периметрі «відкритого поля» та у відкритих рукавах «хрестоподібного лабіринту» лише тварини з епілептичним статусом, яким не вводився блокатор, показали підвищенні значення відносно інших груп. Це свідчить про те що, блокування ПАР1 рецепторів не впливає на рівень локомоторної активності, але нормалізує рівень тривожності у щурів з епілептичним статусом.

3.6.3 Зміни рівня обумовленого страху в наслідок ЕС та за умов блокування ПАР1 у хронічний період

Час завмирання тварин не відрізнявся між групами перед та під час першого звукового сигналу у «тренувальний» день. Після отримання електричного розряду під час «тренувального» дня, тварини груп Control та SE + SCH на наступний «тестовий» день показали статистично значуще збільшення часу завмирання перед (contextual conditioning) звуковим сигналом (two-way ANOVA: $F(1, 39) = 55,39, p < 0,001$; post-hoc: Control – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,01$; Рис. 47А). Але, реакція страху на оточення у тварин групи Control була вища порівняно з такою у тварин інших груп (two-way ANOVA: $F(2, 39) = 6,886, p < 0,01$; post-hoc: SE – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,01$; Рис. 47А). У тварин групи SE спостерігалася тенденція до збільшення часу завмирання перед звуковим сигналом, але ми не вияви статистично значущої різниці. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на оточення, так званого контекстуального страху у тварин з епілептичним статусом.

Протягом звукового стимулу на другий день (conditioning to tone) реакція тварин груп Control та SE + SCH була схожа з реакцією до стимулу. Вони продемонстрували статистично значуще збільшення часу завмирання в порівнянні з «тренувальним» днем (two-way ANOVA: $F(1, 38) = 71,68, p < 0,001$; post-hoc: Control – $p < 0,001$; SE+ SCH – $p < 0,01$; рис. 41Б). Але, як і у випадку до стимулу, реакція страху на звуковий стимул у тварин групи Control була вища порівняно з такою у тварин інших груп (two-way ANOVA: $F(2, 38) = 10,59$; post-hoc: SE – $p < 0,01$; SE+ SCH – $p < 0,05$; рис. 41Б). У тварин групи SE спостерігалася тенденція до збільшення часу завмирання перед звуковим сигналом, але ми також не вияви статистично значущої різниці. Це свідчить про відсутність формування умовної реакції страху на стимул, так званого обумовленого страху у тварин з епілептичним статусом.

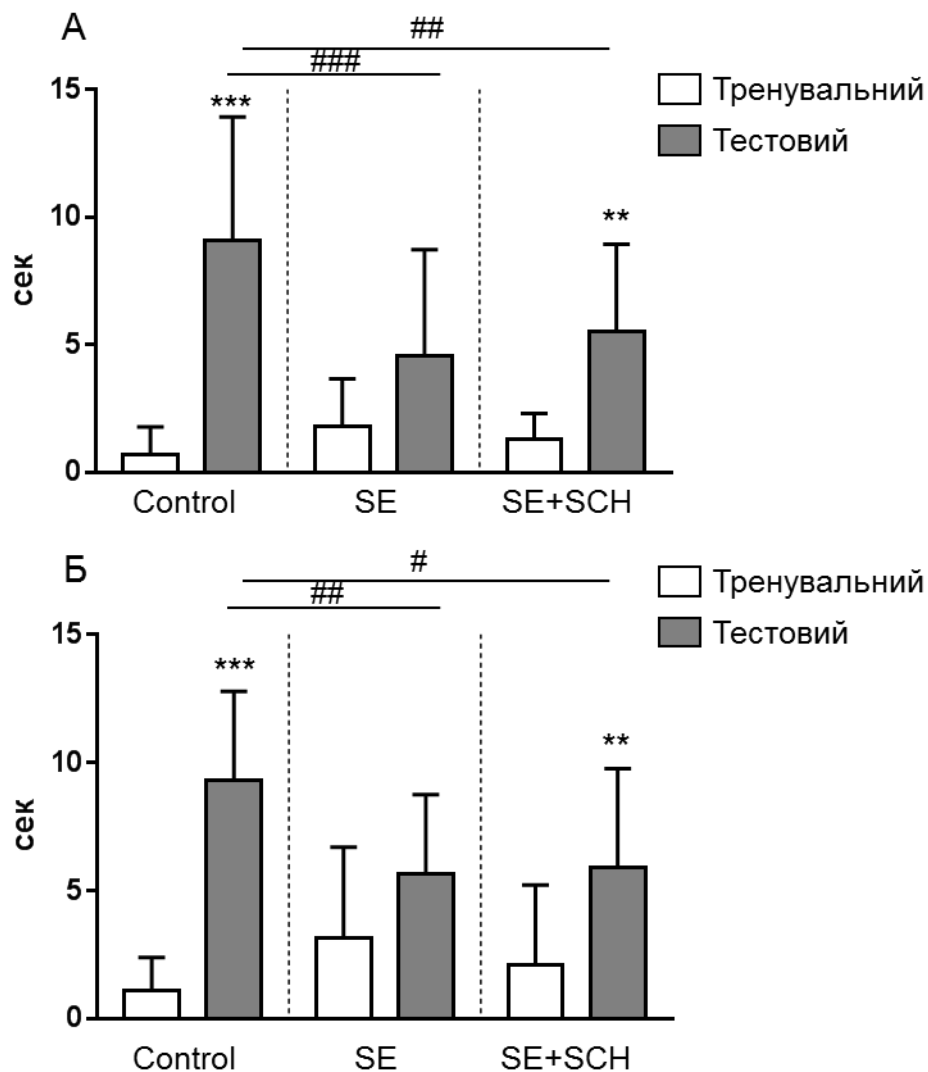


Рис. 47 - Вплив блокатора ПАР1 на поведінку тварин під час тестів на пам'ять, обумовлену страхом. Час завмирання (А) до звукового стимулу (*contextual conditioning*), та (Б) протягом звукового стимулу на другий «тренувальний» день та третій «тестувальний» день. «Тренувальний» vs «тестовий» дні - **,*** $p < 0,01, 0,001$; порівняння у «тестовий» день між групами - ##, ### $p < 0,01, 0,001$.

Загалом, отриманні дані свідчать про те що, блокування ПАР1 нормалізує рівень локомоторної активності, тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих тварин після ЕС у хронічний період розвитку епілепсії.

4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

4.1 Розробка бездротової системи для реєстрації електричних потенціалів головного мозку у щурів

Постійний запис ЕЕГ необхідний для спостереження за змінами електричної активності мозку та моторних нападів з часом з метою з'ясування механізмів епілептогенезу та вивчення ефекту протиепілептогенної терапії, призначеної для запобігання розвитку судом (Grabenstatter et al., 2005; Hernandez et al., 2002) та терапії, спрямованої на лікування спонтанних нападів. Значна частина таких робіт була проведена за допомогою дротових систем. Однак у таких системах тварина постійно «прив'язана» до вимірювальної апаратури. Це може спричинити посилення стресу, що може негативно впливати на електричну активність гіпокампа та поведінку тварини (Wood et al., 2004). Більше того, стрес може змінити чутливість до припадків (Betts, 1992). Є докази, що коротке обмеження тіла значно знижує поріг нападів для гризунів, спричинених пентилентетраезолом (Swinyard et al., 1963). Також дротові системи мають більшу здатність приводити до появи шумів та артефактів руху в сигнал ЕЕГ. Тим не менш, дротові системи залишаються корисним методом реєстрації ЕЕГ, оскільки вони мають перевагу над бездротовими у високій частоті вибірки з декількох каналів та обмеження, накладеного на час роботи акумулятора.

Розроблена нами чотирьох-канальна бездротова система успішно дозволяє одночасно реєструвати локальні потенціали різних ділянок мозку з частотою до 200 Гц. Так як система спроможна передавати дані у режимі реального часу та проводити довготривалий, до 12 годин, запис електричної активності мозку тварини під час епілептичного статусу та проведення поведінкових тестів, вона була успішно використана для дослідження змін локальних потенціалів нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалини щурів під час розвитку епілептичного статусу. Важливою є можливість системи проводити запис у відносно широкій полосі частот (1 - 200 Гц), це надає можливість фіксувати розвиток швидких коливань

під час епілептогенезу. Високочастотні коливання в гіпокампальній та енторинальній кірковій ділянці пов'язані з епілептичною активністю як у людини, так і в експериментальних тваринних моделях (Bragin et al., 1999; Jacobs et al., 2008; Worrell et al., 2004), а також, тісно пов'язаний з епілептогенезом (Bragin et al., 2004, 2005). Під час інтеріктальних періодів високочастотна кортикальна активність є маркером первинної епілептогенної зони (Jiruska et al., 2010). Такі коливання також трапляються на частотах, які перевищують пропускну здатність нашого пристрою. Можливість перепрограмування передавача та проста конструкція дозволяють проводити його модифікацію перед проведенням досліду, щоб забезпечити більш високі показники вибірки і, таким чином, більш широку пропускну здатність, хоча за рахунок зменшення часу автономної роботи.

4.2 Зміни локальних потенціалів нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалеподібного тіла під час розвитку епілептичного статусу

В даній роботі ми досліджували зміни локальних потенціалів під час розвитку епілептичного статусу у нюховій цибулині, гіпокампі та мигдалеподібному тілі. Ми виявили що перші іктальні спалахи починаються у нюховій цибулині раніше ніж у гіпокампі та мигдалині. Також зміни потужності під час транзитної фази розвитку епілептичного статусу були значно більшими у нюховій цибулині в порівнянні з іншими ділянками.

Хоча нюхова цибулина, як правило, не пов'язана з нападами, було показано, що різкий запах, який викликає активність у великій кількості нюхових сенсорних нейронів, здатен провокувати напади у пацієнтів з епілепсією (Restrepo et al., 2014). Так резекція нюхової цибулини може призводити до генерації нападів та епілептиформної активності (Jiang et al., 2015). Також у пацієнтів з скроневою епілепсією може виникати так звана «нюхова аура» (Acharya et al., 1998). В нашому випадку залучення нюхової цибулини у розвиток епілептичного статусу може бути пов'язано з порушення ГЕБ. Оскільки, підвищення проникності ГЕБ пов'язують з різними неврологічними

порушеннями, включаючи скроневу епілепсію. Пошкодження ГЕБ за допомогою манітолу призводило до появи ЕЕГ активності, яка відповідала епілептичним нападам (Fieschi et al., 1980). Напади також спостерігалися у більшості пацієнтів, які зазнали порушення ГЕБ у наслідок хіміотерапевтичного лікування новоутворень головного мозку (Neuwelt et al., 1983). Різні великі компоненти крові, такі як тромбін або альбумін, у нормі не здатні проникати через ГЕБ та зазвичай присутні у мозку в дуже незначних концентраціях (Breuer et al., 2017; Pardridge, 2012). Так було показано, що внутрішньомозкові ін'єкції тромбіну призводять до появи епілептиформної активності (Lee et al., 1997). Цілісність ГЕБ змінюється в різних ділянках мозку під час розвитку епілепсії (van Vliet et al., 2007). Порушення ГЕБ було виявлено у гіпокампі, корі, таламусі, мигдалеподібному тлі та нюховій цибулині протягом різних періодів епілептогенезу. Отже, отриманні дані свідчать про залучення нюхової цибулини у розвиток епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.

4.3 Ефект блокування PAR1 на розвиток епілептичного статусу при літій-пілокарпіновій моделі епілепсії

Резистентна до ліків епілепсія зустрічається приблизно у 30% пацієнтів і залишається головною проблемою лікування. Найбільш поширений тип рефрактерної епілепсії, скронева епілепсія, яка впливає на церебральні нейронні мережі, включаючи гіпокамп та кілька анатомічно пов'язаних областей. Епілептичні сплески електричної активності мозку є ознакою підвищеної збудливості та гіперсинхронності нейронних мереж (Ge et al., 2013). Аномально синхронізована діяльність нейронної мережі гіпокампа має вирішальне значення для виникнення нападів та розвитку епілепсії. Епілептичні випадки є результатом гіперсинхронної активності, що виникає внаслідок дисбалансу між збудженням і гальмуванням, створеним аномальною активністю нейронних мереж. Коливальна активність, помічена на ЕЕГ, служить лише непрямим показником гальмівних та збудливих властивостей залучених нейронних мереж.

У цьому дослідженні ми використовували мікроелектроди для реєстрації локальних потенціалів в гіпокампі *in vivo* у неспаних щурів під час розвитку епілептичного статусу. Епілептичний статус викликався за допомогою літій-пілокарпінової моделі епілепсії. Ми досліджували вплив блокування ПАР1 рецепторів на зміни локальних потенціалів під час становлення епілептичного статусу. Підвищення активності гіпокампа у контрольній групі після введення літію, узгоджується з дослідженнями впливу різних доз літію на активність гіпокампа, а саме з підвищенням ритмів та загальної потужності потенціалів (Hanak *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018). Після введення пілокарпіну, зміни в локальних потенціалах проходили згідно з трьома фазами (Phelan *et al.*, 2014): латентний фаза, протягом якої пригнічується активність потенціалів; транзитна фаза, яка починається з першим іктальним проявом активності і закінчується становленням ЕС; та фаза ЕС. У тварин з ПАР1, після ін'єкції літію, ми не спостерігали значного підвищення активності, а навпроти виявили зменшення гамма-ритму, а після введення пілокарпіну ми виявили зменшення потужності тета- та гамма-ритмів під час транзитної фази. Літій, якщо його вводити за 24 години до пілокарпіну, активізує каскад запалення і збільшує проникність ГЕБ, тим самим знижуючи поріг для настання нападів (cb). Збільшення проникності ГЕБ призводить до підвищення концентрації тромбіну у ЦНС (Suzuki *et al.*, 1992). Тромбін в свою чергу здатен активувати ПАР1, що може призводити до змін у процесах синапатичної передачі та впливати на електричну активність гіпокампа (Maggio *et al.*, 2013). Тому можна припустити, що зміни активності у групі тварин, яким вводили блокатор ПАР1 рецепторів, викликані зменшенням ролі тромбін/ПАР1-залежних механізмів, які здатні модулювати електричну активність гіпокама, у процесах розвитку епілептичного статусу.

4.4 Вплив ЕС та фармакологічної блокади ПАР1 рецепторів на поведінкові реакції щурів у хронічний період розвитку епілепсії

Сучасні дані стосовно впливу нападів на рівень тривожності є неоднозначними, і різняться між високим та низьким рівнями в залежності від експериментальної моделі, тяжкості нападу, віку тварин та виду (Hernan *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2016). У нашому дослідженні ми показали що, епілептичний статус зменшує рівень тривожності у тестах «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт» (Bogovuk *et al.*, 2017). Наші дані узгоджуються з кількома дослідженнями з використанням пілокарпінової та каїнової експериментальних моделей епілептичного статусу, в яких виявлено меншу тривожність у епілептичних щурів (Dos Santos *et al.*, 2005; Inostroza *et al.*, 2011), хоча інші дослідження показали підвищену тривожність після епілептичного статусу (Xiu-Yu Shi *et al.*, 2007). Зниження тривожності спостерігалось також у щурів з вентральним ураженням гіпокампа (McHugh *et al.*, 2004), області яка, зазвичай, найбільш пошкоджена при скроневої епілепсії, порівняно з дорсальним гіпокампом (Ekstrand *et al.*, 2011).

Пошкодження мозкових ділянок, важливих для емоційно - мотивованої поведінки, може пояснювати такі зміни поведінки у тварин з хронічною епілепсією. Надання щурами переваги відкритим ділянкам, після перенесеного епілептичного статусу, було б неадаптивним, оскільки в дикій природі це може наражати щурів на небезпеку. Природна тенденція уникати відкритих («незахищених») просторів, у щурів з епілептичним статусом, була відновлена у групі з антагоністом ПАР1. Аналогічне регулювання опорно-рухової активності щурів з епілептичним статусом, і без ін'єкцій SCH, показує, що надання переваги «відкритим рукавам» не обумовлено зниженням загальною активністю та / або дослідницькою мотивацією. Ми припускаємо, що ефект інгібування ПАР1 на тривожність щурів з епілептичним статусом, який спостерігається в тестах «відкрите поле» та «хрестоподібний лабіринт», можна принаймні частково пояснити нейропротекторним ефектом інгібування ПАР1 у гіпокампі (Isaev *et al.*,

2015). Останні дослідження вказують на те, що напади часто асоціюються з дефіцитом емоційно-мотивованого навчання (Kemppainen *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2009). Наші дані узгоджуються з цими дослідженнями, що свідчить про істотне погіршення формування асоціативного навчання страху (у контекстних та обумовлених парадигмах страху) у щурів, які зазнали епілептичного статусу. У нашому дослідженні інгібування ПАР1 призвело до зниження рівня контекстного та обумовленого страху у контрольній групі, але суттєво покращило ці параметри у групі з епілептичним статусом. Таким чином, гальмування ПАР1 у нормальному мозку є шкідливим, тоді як блокування ПАР1 після епілептичного статусу є терапевтичним. Роль ПАР1 у формуванні пам'яті гіпокампа та синаптичній пластичності добре встановлена. Було показано, що миші ПАР1 - / - мають суттєвий дефіцит у тесті на пасивне уникнення та в контексті кон'юнктурного та умовного страху (Almonte *et al.*, 2013). Також нещодавно було показано, що, залежно від емоційного стану тварини, активація ПАР1 може викликати протилежний вплив на активність нейронів (посилює активність нейронів у спокійному страху та зменшує активність у тварин з обумовлених страхом) у базальній мигдалині шляхом зміщення профілю їх G-білка (Bourgeois *et al.*, 2013). Ми вважаємо що ПАР1 залучений до процесів які впливають на зміни рівня тривоги та страху спричинені епілептичним статусом.

5 ВИСНОВКИ

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

1. Розроблена багатоканальна бездротова система реєстрації електрофізіологічних потенціалів, яка дозволяє одночасно реєструвати локальні потенціали різних ділянок мозку під час епілептичного статусу та проведення поведінкових тестів.
2. Розвиток епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії у дорослих щурів супроводжується ранньою появою інтеріктальних спалахів та збільшенням потужності локальних потенціалів у нюховій цибулині в порівнянні з гіпокампом та мигдалеподібним тілом.
3. Фармакологічне блокування протеазаактивованих рецепторів у дорослих щурів призводить до зменшення потужності тета- та гамма-ритмів гіпокампа під час становлення епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.
4. У дорослих щурів без епілептичного статусу інгібування функції протеазаактивованих рецепторів першого типу не призводить до змін локомоторної активності, тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті.
5. Фармакологічне блокування протеазаактивованих рецепторів першого типу призводить до нормалізації рівня тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу.

6 СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Acharya, V., Acharya, J. and Lüders, H. (1998) Olfactory epileptic auras. *Neurology*, 51(1), 56–61. Available at: doi:10.1212/wnl.51.1.56.
2. Almonte, A.G., Qadri, L.H., Sultan, F.A., Watson, J.A., Mount, D.J. and Rumbaugh, G. *et al.* (2013) Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 124(1), 109–122. Available at: doi:10.1111/jnc.12075.
3. Arora, P., Ricks, T.K. and Trejo, J. (2007) Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 6), 921–928. Available at: doi:10.1242/jcs.03409.
4. Austin, K.M., Covic, L. and Kuliopulos, A. (2013) Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*, 121(3), 431–439. Available at: doi:10.1182/blood-2012-09-355958.
5. Ballabh, P., Braun, A. and Nedergaard, M. (2004) The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *undefined*. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-blood%E2%80%93brain-barrier%3A-an-overview%3A-Structure%2C-Ballabh-Braun/4d4e33d0a812e4ca613410c8aa3b1407e74993dc>.
6. Bang, O.Y., Saver, J.L., Alger, J.R., Shah, S.H., Buck, B.H. and Starkman, S. *et al.* (2009) Patterns and predictors of blood-brain barrier permeability derangements in acute ischemic stroke. *Stroke*, 40(2), 454–461. Available at: doi:10.1161/STROKEAHA.108.522847.
7. Bartolomei, F., Khalil, M., Wendling, F., Sontheimer, A., Régis, J. and Ranjeva, J.-P. *et al.* (2005) Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia*, 46(5), 677–687. Available at: doi:10.1111/j.1528-1167.2005.43804.x.
8. Baumgartner, C. and Koren, J.P. (2018) Seizure detection using scalp-EEG. *Epilepsia*, 59 Suppl 1, 14–22. Available at: doi:10.1111/epi.14052.

9. Beart, P.M. and O'Shea, R.D. (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *British Journal of Pharmacology*, 150(1), 5–17. Available at: doi:10.1038/sj.bjp.0706949.
10. Becker, D., Ikenberg, B., Schiener, S., Maggio, N. and Vlachos, A. (2014) NMDA-receptor inhibition restores Protease-Activated Receptor 1 (PAR1) mediated alterations in homeostatic synaptic plasticity of denervated mouse dentate granule cells. *Neuropharmacology*, 86, 212–218. Available at: doi:10.1016/j.neuropharm.2014.07.013.
11. Beilin, O., Karussis, D.M., Korczyn, A.D., Gurwitz, D., Aronovich, R. and Hantai, D. *et al.* (2005) Increased thrombin inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*, 79(3), 351–359. Available at: doi:10.1002/jnr.20270.
12. Belchior, H., Lopes-Dos-Santos, V., Tort, A.B.L. and Ribeiro, S. (2014) Increase in hippocampal theta oscillations during spatial decision making. *Hippocampus*, 24(6), 693–702. Available at: doi:10.1002/hipo.22260.
13. Ben Shimon, M., Lenz, M., Ikenberg, B., Becker, D., Shavit Stein, E. and Chapman, J. *et al.* (2015) Thrombin regulation of synaptic transmission and plasticity: implications for health and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 151. Available at: doi:10.3389/fncel.2015.00151.
14. Ben-Ari, Y. (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(9), 728–739. Available at: doi:10.1038/nrn920.
15. Berg, A.T. and Shinnar, S. (1991) The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: a quantitative review. *Neurology*, 41(7), 965–972. Available at: doi:10.1212/wnl.41.7.965.
16. Berkovic, S.F. (2015) Genetics of Epilepsy in Clinical Practice. *Epilepsy Currents*, 15(4), 192–196. Available at: doi:10.5698/1535-7511-15.4.192.

17. Bernhardt, B.C., Hong, S., Bernasconi, A. and Bernasconi, N. (2013) Imaging structural and functional brain networks in temporal lobe epilepsy. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7, 624. Available at: doi:10.3389/fnhum.2013.00624.
18. Bogovyk R., Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Holmes G.L., Isaeva E. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy & Behavior* – 67:66-69; PMID: 28088683.
19. Borissoff, J.I., Spronk, H.M.H. and Cate, H. ten (2011) The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 364(18), 1746–1760. Available at: doi:10.1056/NEJMra1011670.
20. Bourgognon, J.-M., Schiavon, E., Salah-Uddin, H., Skrzypiec, A.E., Attwood, B.K. and Shah, R.S. *et al.* (2013) Regulation of neuronal plasticity and fear by a dynamic change in PAR1-G protein coupling in the amygdala. *Molecular Psychiatry*, 18(10), 1136–1145. Available at: doi:10.1038/mp.2012.133.
21. Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K. and Buzsaki, G. (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, 15(1), 47–60. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.15-01-00047.1995.
22. Brooks-Kayal, A.R., Bath, K.G., Berg, A.T., Galanopoulou, A.S., Holmes, G.L. and Jensen, F.E. *et al.* (2013) Issues related to symptomatic and disease-modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy. *Epilepsia*, 54 Suppl 4, 44–60. Available at: doi:10.1111/epi.12298.
23. Buckmaster, P.S. (2004) Laboratory animal models of temporal lobe epilepsy. *Comparative Medicine*, 54(5), 473–485. Available at: https://www.researchgate.net/publication/8152992_Laboratory_animal_models_of_temporal_lobe_epilepsy.
24. Bui, A., Kim, H.K., Maroso, M. and Soltesz, I. (2015) Microcircuits in Epilepsy: Heterogeneity and Hub Cells in Network Synchronization. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(11). Available at: doi:10.1101/cshperspect.a022855.

25. Buzsáki, G. (1986) Hippocampal sharp waves: Their origin and significance. *undefined*. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Hippocampal-sharp-waves%3A-Their-origin-and-Buzs%C3%A1ki/b1277cfb32eab7e1d893331d5042e0e1b85aec27>.
26. Buzsáki, G. (2006) *Rhythms of the brain*. Oxford University Press: Oxford, New York.
27. Buzsáki, G., S. LeungLai-Wo and C. H. Vanderwolf (1983) Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *undefined*. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Cellular-bases-of-hippocampal-EEG-in-the-behaving-Buzs%C3%A1ki-LeungLai-Wo/9090e98627690cdac6e371809e8abdc125ff093c>.
28. Campos, F.L., Carvalho, M.M., Cristovão, A.C., Je, G., Baltazar, G. and Salgado, A.J. *et al.* (2013) Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 175. Available at: doi:10.3389/fnbeh.2013.00175.
29. Cardoso, A., Carvalho, L.S., Lukoyanova, E.A. and Lukoyanov, N.V. (2009) Effects of repeated electroconvulsive shock seizures and pilocarpine-induced status epilepticus on emotional behavior in the rat. *Epilepsy & Behavior*, 14(2), 293–299. Available at: doi:10.1016/j.yebeh.2008.11.004.
30. Cavalheiro, E.A., Leite, J.P., Bortolotto, Z.A., Turski, W.A., Ikonomidou, C. and Turski, L. (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*, 32(6), 778–782. Available at: doi:10.1111/j.1528-1157.1991.tb05533.x.
31. Cavazos, J.E., Jones, S.M. and Cross, D.J. (2004) Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience*, 126(3), 677–688. Available at: doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.014.

32. Chadwick, D., Taylor, J. and Johnson, T. (1996) Outcomes after seizure recurrence in people with well-controlled epilepsy and the factors that influence it. The MRC Antiepileptic Drug Withdrawal Group. *Epilepsia*, 37(11), 1043–1050. Available at: doi:10.1111/j.1528-1157.1996.tb01023.x.
33. Chahal, G., Thorpe, M. and Hellman, L. (2015) The Importance of Exosite Interactions for Substrate Cleavage by Human Thrombin. *PloS One*, 10(6), e0129511. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0129511.
34. Chakir, A., Fabene, P.F., Ouazzani, R. and Bentivoglio, M. (2006) Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat. *Brain Research Bulletin*, 71(1-3), 127–138. Available at: doi:10.1016/j.brainresbull.2006.08.009.
35. Chang, P., Hashemi, K.S. and Walker, M.C. (2011) A novel telemetry system for recording EEG in small animals. *Journal of Neuroscience Methods*, 201(1), 106–115. Available at: doi:10.1016/j.jneumeth.2011.07.018.
36. Chapman, J. (2006) Thrombin in inflammatory brain diseases. *Autoimmunity Reviews*, 5(8), 528–531. Available at: doi:10.1016/j.autrev.2006.02.011.
37. Chebib, M. and Johnston, G.A. (1999) The ‘ABC’ of GABA receptors: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(11), 937–940. Available at: doi:10.1046/j.1440-1681.1999.03151.x.
38. Chen, D. and Dorling, A. (2009) Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 7 Suppl 1, 122–126. Available at: doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03413.x.
39. Chen, Y. and Swanson, R.A. (2003) Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(2), 137–149. Available at: doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C.

40. Clifford, D.B., Olney, J.W., Maniotis, A., Collins, R.C. and Zorumski, C.F. (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience*, 23(3), 953–968. Available at: doi:10.1016/0306-4522(87)90171-0.
41. Colgin, L.L., Denninger, T., Fyhn, M., Hafting, T., Bonnevie, T. and Jensen, O. *et al.* (2009) Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus. *Nature*, 462(7271), 353–357. Available at: doi:10.1038/nature08573.
42. Cornejo, B.J., Mesches, M.H., Coultrap, S., Browning, M.D. and Benke, T.A. (2007) A single episode of neonatal seizures permanently alters glutamatergic synapses. *Annals of Neurology*, 61(5), 411–426. Available at: doi:10.1002/ana.21071.
43. Coughlin, S.R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407(6801), 258–264. Available at: doi:10.1038/35025229.
44. Csicsvari, J., Jamieson, B., Wise, K.D. and Buzsáki, G. (2003) Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat. *Neuron*, 37(2), 311–322. Available at: doi:10.1016/S0896-6273(02)01169-8.
45. Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S.G. and Avoli, M. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2), 143–157. Available at: doi:10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
46. D. Isaev, I. Lushnikova, O. Lunko, O. Zapukhliak, O. Maximyuk, A. Romanov and G.G. Skibo *et al.* (2015) Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis, 26 March.
47. Davie, E.W. and Kulman, J.D. (2006) An overview of the structure and function of thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32 Suppl 1, 3–15. Available at: doi:10.1055/s-2006-939550.
48. Davis, M. (1986) Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behavioral Neuroscience*, 100(6), 814–824. Available at: doi:10.1037/0735-7044.100.6.814.

49. Denenberg, V.H. (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 159(3), 852–859. Available at: doi:10.1111/j.1749-6632.1969.tb12983.x.
50. Dihanich, M., Kaser, M., Reinhard, E., Cunningham, D. and Monard, D. (1991) Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron*, 6(4), 575–581. Available at: doi:10.1016/0896-6273(91)90060-D.
51. Dos Santos, J.G., Longo, B.M., Blanco, M.M., Menezes de Oliveira, M.G. and Mello, L.E. (2005) Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research*, 1066(1-2), 37–48. Available at: doi:10.1016/j.brainres.2005.09.037.
52. Dudek, F.E. and Sutula, T.P. (2007) Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. In: Scharfman, H.E. (Ed.) *The dentate gyrus: A comprehensive guide to structure, function, and clinical implications / edited by Helen E. Scharfman*. Elsevier: Amsterdam, Boston, pp. 755–773.
53. Earl W. Davie and John D. Kulman (2006) An overview of the structure and function of thrombin. *undefined*. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/An-overview-of-the-structure-and-function-of-Davie-Kulman/48c15dbc55ce19d36bedbfa77b4de8acdab5aa0a>.
54. Ekstrand, J.J., Wendy A. Pouliot, Pieter Scheerlinck and F. Edward Dudek (2011) Lithium pilocarpine-induced status epilepticus in postnatal day 20 rats results in greater neuronal injury in ventral versus dorsal hippocampus. *undefined*. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Lithium-pilocarpine-induced-status-epilepticus-in-Ekstrand-Pouliot/6f46fa68a19a211f1ce85e3c57d47a1df0f1aba9>.
55. Esmon, C.T. (2014) Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thrombosis and Haemostasis*, 111(4), 625–633. Available at: doi:10.1160/TH13-09-0730.
56. Fieschi, C., Lenzi, G.L., Zanette, E., Orzi, F. and Passero, S. (1980) Effects of EEG of the osmotic opening of the blood-brain barrier in rats. *Life Sciences*, 27(3), 239–243. Available at: doi:10.1016/0024-3205(80)90143-5.

57. Flaumenhaft, R. and Ceunynck, K. de (2017) Targeting PAR1: Now What? *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(8), 701–716. Available at: doi:10.1016/j.tips.2017.05.001.
58. Freund, T.F. and Antal, M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336(6195), 170–173. Available at: doi:10.1038/336170a0.
59. Friedman, A. (2011) Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? *Epilepsia*, 52 Suppl 8, 19–20. Available at: doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03227.x.
60. Friedman A. and Heinemann U. (2012) Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis: In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98210/>.
61. Furie, B. and Furie, B.C. (2007) In vivo thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 5 Suppl 1, 12–17. Available at: doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02482.x.
62. Ghersi-Egea, J.F., Leninger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G. and Minn, A. (1994) Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *Journal of Neurochemistry*, 62(3), 1089–1096. Available at: doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62031089.x.
63. Ghosh, C., Gonzalez-Martinez, J., Hossain, M., Cucullo, L., Fazio, V. and Janigro, D. *et al.* (2010) Pattern of P450 expression at the human blood-brain barrier: roles of epileptic condition and laminar flow. *Epilepsia*, 51(8), 1408–1417. Available at: doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02428.x.
64. Ghosh, C., Hossain, M., Puvenna, V., Martinez-Gonzalez, J., Alexopolous, A. and Janigro, D. *et al.* (2013) Expression and functional relevance of UGT1A4 in a cohort of human drug-resistant epileptic brains. *Epilepsia*, 54(9), 1562–1570. Available at: doi:10.1111/epi.12318.

65. Gingrich, M.B. and Traynelis, S.F. (2000) Serine proteases and brain damage – is there a link? *Trends in Neurosciences*, 23(9), 399–407. Available at: doi:10.1016/S0166-2236(00)01617-9.
66. Gingrich, M.B., Junge, C.E., Lyuboslavsky, P. and Traynelis, S.F. (2000) Potentiation of NMDA Receptor Function by the Serine Protease Thrombin. *The Journal of Neuroscience*, 20(12), 4582–4595. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.20-12-04582.2000.
67. Glien, M., Brandt, C., Potschka, H. and Löscher, W. (2002) Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 43(4), 350–357. Available at: doi:10.1046/j.1528-1157.2002.18101.x.
68. Glien, M., Brandt, C., Potschka, H., Voigt, H., Ebert, U. and Löscher, W. (2001) Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Research*, 46(2), 111–119. Available at: doi:10.1016/S0920-1211(01)00272-8.
69. Goffin, K., Nissinen, J., van Laere, K. and Pitkänen, A. (2007) Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Experimental Neurology*, 205(2), 501–505. Available at: doi:10.1016/j.expneurol.2007.03.008.
70. Goldberg, E.M. and Coulter, D.A. (2013) Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(5), 337–349. Available at: doi:10.1038/nrn3482.
71. Green, J.D. and Arduini, A.A. (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. *Journal of Neurophysiology*, 17(6), 533–557. Available at: doi:10.1152/jn.1954.17.6.533.

72. Hamilton, S.E., Loose, M.D., Qi, M., Levey, A.I., Hille, B. and McKnight, G.S. *et al.* (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13311–13316. Available at: doi:10.1073/pnas.94.24.13311.
73. Han, H., Mann, A., Ekstein, D. and Eyal, S. (2017) Breaking Bad: the Structure and Function of the Blood-Brain Barrier in Epilepsy. *The AAPS Journal*, 19(4), 973–988. Available at: doi:10.1208/s12248-017-0096-2.
74. Hanak, A.-S., Malissin, I., Poupon, J., Risède, P., Chevillard, L. and Mégarbane, B. (2017) Electroencephalographic patterns of lithium poisoning: a study of the effect/concentration relationships in the rat. *Bipolar Disorders*, 19(2), 135–145. Available at: doi:10.1111/bdi.12482.
75. Hannah Klein (2019) *Temporal Lobe Epilepsy (TLE): What is temporal lobe epilepsy ?* Available at: <https://www.epilepsy.com/learn/types-epilepsy-syndromes/temporal-lobe-epilepsy-aka-tle>.
76. Hauser, W.A. (1994) The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*, 35 Suppl 2, S1-6. Available at: doi:10.1111/j.1528-1157.1994.tb05932.x.
77. Hernan, A.E., Alexander, A., Lenck-Santini, P.-P., Scott, R.C. and Holmes, G.L. (2014) Attention deficit associated with early life interictal spikes in a rat model is improved with ACTH. *PloS One*, 9(2), e89812. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0089812.
78. Hoffman, K.L. (Ed.) (2016) *Modeling neuropsychiatric disorders in laboratory animals*. Woodhead Publishing: Cambridge, UK.
79. Höller, Y., Trinka, E., Kalss, G., Schiepek, G. and Michaelis, R. (2019) Correlation of EEG spectra, connectivity, and information theoretical biomarkers with psychological states in the epilepsy monitoring unit - A pilot study. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 99, 106485. Available at: doi:10.1016/j.yebeh.2019.106485.

80. Holmes, G.L. and Ben-Ari, Y. (1998) Seizures in the Developing Brain. *Neuron*, 21(6), 1231–1234. Available at: doi:10.1016/S0896-6273(00)80642-X.
81. Honchar, M.P., Olney, J.W. and Sherman, W.R. (1983) Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4594), 323–325. Available at: doi:10.1126/science.6301005.
82. Huang, M., Rigby, A.C., Morelli, X., Grant, M.A., Huang, G. and Furie, B. *et al.* (2003) Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nature Structural Biology*, 10(9), 751–756. Available at: doi:10.1038/nsb971.
83. Inostroza, M., Cid, E., Brotons-Mas, J., Gal, B., Aivar, P. and Uzcategui, Y.G. *et al.* (2011) Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PloS One*, 6(7), e22372. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0022372.
84. Isaev, D., Iryna Lushnikova, Oleksiy O. Lunko, O S Zapukhliak and E I Isaeva (2015) Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis. *undefined*.
85. Isaeva, E., Hernan, A., Isaev, D. and Holmes, G.L. (2012) Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. *Annals of Neurology*, 72(2), 192–198. Available at: doi:10.1002/ana.23587.
86. Ishida, Y., Atsushi Nagai, Shotai Kobayashi and Seung Up Kim (2006) Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase. *undefined*.
87. Itzekson, Z., Maggio, N., Milman, A., Shavit, E., Pick, C.G. and Chapman, J. (2014) Reversal of trauma-induced amnesia in mice by a thrombin receptor antagonist. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53(1), 87–95. Available at: doi:10.1007/s12031-013-0200-8.

88. Ivens, S., Gabriel, S., Greenberg, G., Friedman, A. and Shelef, I. (2010) Blood-brain barrier breakdown as a novel mechanism underlying cerebral hyperperfusion syndrome. *Journal of Neurology*, 257(4), 615–620. Available at: doi:10.1007/s00415-009-5384-z.
89. James J. Knierim (2015) The hippocampus. *undefined*.
90. Jana Kalz, H. J. ten Cate and Henri M Spronk (2013) Thrombin generation and atherosclerosis. *undefined*.
91. Jasper, H.H. (1970) Physiopathological mechanisms of post-traumatic epilepsy. *Epilepsia*, 11(1), 73–80. Available at: doi:10.1111/j.1528-1157.1970.tb03868.x.
92. Jiang, G., Pu, T., Li, Z., Zhang, X., Zhou, R. and Cao, X. *et al.* (2018) Lithium affects rat hippocampal electrophysiology and epileptic seizures in a dose dependent manner. *Epilepsy Research*, 146, 112–120. Available at: doi:10.1016/j.eplepsyres.2018.07.021.
93. Jiang, Y., Pun, R.Y.K., Peariso, K., Holland, K.D., Lian, Q. and Danzer, S.C. (2015) Olfactory Bulbectomy Leads to the Development of Epilepsy in Mice. *PloS One*, 10(9), e0138178. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0138178.
94. Jo, J.T., Schiff, D. and Perry, J.R. (2014) Thrombosis in brain tumors. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(3), 325–331. Available at: doi:10.1055/s-0034-1370791.
95. Jope, R.S., Morrisett, R.A. and Snead, O.C. (1986) Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Experimental Neurology*, 91(3), 471–480. Available at: doi:10.1016/0014-4886(86)90045-2.
96. Joshi, S., Karthik Rajasekaran and Jaideep Kapur (2013) GABAergic transmission in temporal lobe epilepsy: The role of neurosteroids. *undefined*.
97. Junge, C.E., Lee, C.J., Hubbard, K.B., Zhang, Z., Olson, J.J. and Hepler, J.R. *et al.* (2004) Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Experimental Neurology*, 188(1), 94–103. Available at: doi:10.1016/j.expneurol.2004.02.018.

98. Karasin, B. and Karasin, M. (2017) Epilepsy: Clinical Review and Surgical Options. *AORN Journal*, 106(5), 393–414. Available at: doi:10.1016/j.aorn.2017.09.003.
99. Kay, B. and Szaflarski, J.P. (2014) EEG/fMRI contributions to our understanding of genetic generalized epilepsies. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 34, 129–135. Available at: doi:10.1016/j.yebeh.2014.02.030.
100. Kemere, C., Carr, M.F., Karlsson, M.P. and Frank, L.M. (2013) Rapid and continuous modulation of hippocampal network state during exploration of new places. *PloS One*, 8(9), e73114. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0073114.
101. Kemppainen, E., Jari Nissinen and Asla Pitkänen (2006) Fear conditioning is impaired in systemic kainic acid and amygdala-stimulation models of epilepsy. *undefined*.
102. Kim, H., Paige, A. and Knowlton, R. (2010) Advances in Structural and Functional Neuroimaging. In: Rho, J.M., Sankar, R. and Stafstrom, C.E. (Eds.) *Epilepsy: Mechanisms, models, and translational perspectives / edited by, Jong M. Rho, Raman Sankar, Carl E. Stafstrom*. CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 257–282.
103. Kobulashvili, T., Kuchukhidze, G., Brigo, F., Zimmermann, G., Höfler, J. and Leitinger, M. *et al.* (2018) Diagnostic and prognostic value of noninvasive long-term video-electroencephalographic monitoring in epilepsy surgery: A systematic review and meta-analysis from the E-PILEPSY consortium. *Epilepsia*, 59(12), 2272–2283. Available at: doi:10.1111/epi.14598.
104. Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B.P., Voss, H.P., Remie, R. and van Zutphen, B.L. (2001) The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 40(1), 8–16.
105. Kubota, D., Laura Lee Colgin, Malcolm Casale, Fernando Brucher and Gary Lynch (2003) Endogenous waves in hippocampal slices. *undefined*.
106. Lamas, M., González-Mariscal, L. and Gutiérrez, R. (2002) Presence of claudins mRNA in the brain. *Molecular Brain Research*, 104(2), 250–254. Available at: doi:10.1016/S0169-328X(02)00328-5.

107. Lapray, D., Bergeler, J., Dupont, E., Thews, O. and Luhmann, H.J. (2008) A novel miniature telemetric system for recording EEG activity in freely moving rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 168(1), 119–126. Available at: doi:10.1016/j.jneumeth.2007.09.029.
108. Lee, K.R., Drury, I., Vitarbo, E. and Hoff, J.T. (1997) Seizures induced by intracerebral injection of thrombin: a model of intracerebral hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 87(1), 73–78. Available at: doi:10.3171/jns.1997.87.1.0073.
109. Leite, J.P., Bortolotto, Z.A. and Cavalheiro, E.A. (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14(4), 511–517. Available at: doi:10.1016/S0149-7634(05)80076-4.
110. Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N. and Cavalheiro, E.A. (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research*, 50(1-2), 93–103. Available at: doi:10.1016/S0920-1211(02)00072-4.
111. Lévesque, M., Avoli, M. and Bernard, C. (2016) Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *Journal of Neuroscience Methods*, 260, 45–52. Available at: doi:10.1016/j.jneumeth.2015.03.009.
112. Lieb, J.P., Walsh, G.O., Babb, T.L., Walter, R.D. and Crandall, P.H. (1976) A comparison of EEG seizure patterns recorded with surface and depth electrodes in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 17(2), 137–160. Available at: doi:10.1111/j.1528-1157.1976.tb03392.x.
113. Litt, B., Esteller, R., Echauz, J., D’Alessandro, M., Shor, R. and Henry, T. *et al.* (2009) Epileptic Seizures May Begin Hours in Advance of Clinical Onset: A Report of Five Patients*. In: Vachtsevanos, G.J. and Valavanis, K. (Eds.) *Applications of intelligent control to engineering systems: In honour of Dr. G.J. Vachtsevanos / Kimon P. Valavanis, editor*. Springer: Dordrecht, London, pp. 225–245.

114. Liu, Z., Mikati, M. and Holmes, G.L. (1995) Mesial temporal sclerosis: Pathogenesis and significance. *Pediatric Neurology*, 12(1), 5–16. Available at: doi:10.1016/0887-8994(94)00122-I.
115. Lopes, M.W., Lopes, S.C., Santos, D.B., Costa, A.P., Gonçalves, F.M. and Mello, N. de *et al.* (2016) Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 55, 92–100. Available at: doi:10.1016/j.yebeh.2015.12.001.
116. Luo, W., Wang, Y. and Reiser, G. (2007) Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Research Reviews*, 56(2), 331–345. Available at: doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.002.
117. Lüthi, A., van der Putten, H., Botteri, F.M., Mansuy, I.M., Meins, M. and Frey, U. *et al.* (1997) Endogenous Serine Protease Inhibitor Modulates Epileptic Activity and Hippocampal Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 17(12), 4688–4699. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.17-12-04688.1997.
118. Maggio, N., Cavaliere, C., Papa, M., Blatt, I., Chapman, J. and Segal, M. (2013) Thrombin regulation of synaptic transmission: implications for seizure onset. *Neurobiology of Disease*, 50, 171–178. Available at: doi:10.1016/j.nbd.2012.10.017.
119. Maggio, N., Shavit, E., Chapman, J. and Segal, M. (2008) Thrombin induces long-term potentiation of reactivity to afferent stimulation and facilitates epileptic seizures in rat hippocampal slices: toward understanding the functional consequences of cerebrovascular insults. *The Journal of Neuroscience*, 28(3), 732–736. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.3665-07.2008.
120. Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T. and Hernandez, N. *et al.* (2007a) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia*, 48(4), 732–742. Available at: doi:10.1111/j.1528-1167.2007.00988.x.

121. Marchi, N., Oby, E., Batra, A., Uva, L., Curtis, M. de and Hernandez, N. *et al.* (2007b) In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. *Epilepsia*, 48(10), 1934–1946. Available at: doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01185.x.
122. Mathern, G.W., Kuhlman, P.A., Mendoza, D. and Pretorius, J.K. (1997) Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56(2), 199–212. Available at: doi:10.1097/00005072-199702000-00011.
123. McHugh, S.B., Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P. and Bannerman, D.M. (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 118(1), 63–78. Available at: doi:10.1037/0735-7044.118.1.63.
124. Mitchel, SJ (1980) Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats. *undefined*.
125. Morin-Brureau, M., Lebrun, A., Rousset, M.-C., Fagni, L., Bockaert, J. and Bock, F. de *et al.* (2011) Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(29), 10677–10688. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.5692-10.2011.
126. Mosnier, L.O., Zlokovic, B.V. and Griffin, J.H. (2014) Cytoprotective-selective activated protein C therapy for ischaemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis*, 112(5), 883–892. Available at: doi:10.1160/TH14-05-0448.
127. Nadjat-Haiem, C., Ziv, K. and Osborn, I. (2009) Anesthesia for carotid and cerebrovascular procedures in interventional neuroradiology. *International Anesthesiology Clinics*, 47(2), 29–43. Available at: doi:10.1097/AIA.0b013e31819977e4.

128. Nagao, T., Alonso, A. and Avoli, M. (1996) Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience*, 72(2), 399–408. Available at: doi:10.1016/0306-4522(95)00534-X.
129. Natarov, R., Dyka, Z., Bohovyk, R., Fedoriuk, M., Isaev, D., Sudakov, O., Maksymyuk, O., Krishtal, O. and Langendörfer, P., 2020, June. Artefacts in EEG Signals Epileptic Seizure Prediction using Edge Devices. In 2020 9th Mediterranean Conference on Embedded Computing (MECO) (pp. 1-3). IEEE. DOI: 10.1109/MECO49872.2020.9134076
130. Neuwelt, E.A., Specht, H.D., Howieson, J., Haines, J.E., Bennett, M.J. and Hill, S.A. *et al.* (1983) Osmotic blood-brain barrier modification: clinical documentation by enhanced CT scanning and/or radionuclide brain scanning. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 141(4), 829–835. Available at: doi:10.2214/ajr.141.4.829.
131. Nirwan, N., Vyas, P. and Vohora, D. (2018) Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Reviews in the Neurosciences*, 29(7), 757–770. Available at: doi:10.1515/revneuro-2017-0086.
132. Obermeier, B., Daneman, R. and Ransohoff, R.M. (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–1596. Available at: doi:10.1038/nm.3407.
133. Olney, J.W., Gubareff, T. de and Labruyere, J. (1983) Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. *Nature*, 301(5900), 520–522. Available at: doi:10.1038/301520a0.
134. Olson, H.E. and Poduri, A. (2014) Epilepsy. In: Miller, J.W. and Goodkin, H.P. (Eds.) *Epilepsy*. Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex, pp. 159–166.
135. Pearl, P.L. (2009) New treatment paradigms in neonatal metabolic epilepsies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(2), 204–213. Available at: doi:10.1007/s10545-009-1045-8.

136. Pearson, T.S., Akman, C., Hinton, V.J., Engelstad, K. and Vivo, D.C. de (2013) Phenotypic spectrum of glucose transporter type 1 deficiency syndrome (Glut1 DS). *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13(4), 342. Available at: doi:10.1007/s11910-013-0342-7.
137. Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. and Briley, M. (1985) Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149–167. Available at: doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7.
138. Pernía-Andrade, A.J. and Jonas, P. (2014) Theta-gamma-modulated synaptic currents in hippocampal granule cells in vivo define a mechanism for network oscillations. *Neuron*, 81(1), 140–152. Available at: doi:10.1016/j.neuron.2013.09.046.
139. Petit, C.K., Schaefer, J.A. and Plum, F. (1977) Ultrastructural characteristics of the brain and blood-brain barrier in experimental seizures. *Brain Research*, 127(2), 251–267. Available at: doi:10.1016/0006-8993(77)90539-X.
140. Pitkänen, A., Löscher, W., Vezzani, A., Becker, A.J., Simonato, M. and Lukasiuk, K. *et al.* (2016) Advances in the development of biomarkers for epilepsy. *The Lancet Neurology*, 15(8), 843–856. Available at: doi:10.1016/S1474-4422(16)00112-5.
141. Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F.E. and Staley, K.J. (2015) Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(10). Available at: doi:10.1101/cshperspect.a022822.
142. Pompili, E., Nori, S.L., Geloso, M.C., Guadagni, E., Corvino, V. and Michetti, F. *et al.* (2004) Trimethyltin-induced differential expression of PAR subtypes in reactive astrocytes of the rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 122(1), 93–98. Available at: doi:10.1016/j.molbrainres.2003.12.001.
143. Priel, M.R. and Albuquerque, E.X. (2002) Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture. *Epilepsia*, 43 Suppl 5, 40–46. Available at: doi:10.1046/j.1528-1157.43.s.5.18.x.

144. Ramos, A. (2008) Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(10), 493–498. Available at: doi:10.1016/j.tips.2008.07.005.
145. Restrepo, D., Hellier, J.L. and Salcedo, E. (2014) Complex metabolically demanding sensory processing in the olfactory system: implications for epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 38, 37–42.
146. Rho, J.M., Sankar, R. and Stafstrom, C.E. (2010) Epilepsy: Mechanisms, models, and translational perspectives / edited by, Jong M. Rho, Raman Sankar, Carl E. Stafstrom. CRC Press: Boca Raton, FL.
147. Richardson, C.A. and Flecknell, P.A. (2005) Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 33(2), 119–127. Available at: doi:10.1177/026119290503300207.
148. Rigau, V., Morin, M., Rousset, M.-C., Bock, F. de, Lebrun, A. and Coubes, P. *et al.* (2007) Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain : a Journal of Neurology*, 130(Pt 7), 1942–1956. Available at: doi:10.1093/brain/awm118.
149. Russo, A., Soh, U.J.K. and Trejo, J. (2009) Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Molecular Interventions*, 9(2), 87–96. Available at: doi:10.1124/mi.9.2.8.
150. Rustay, N., Browman, K. and Curzon, P. (2009) Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco, J.J. and Buccafusco, J.J.M.o.b.a.i.n. (Eds.) *Methods of behavioral analysis in neuroscience*, 2nd edn. CRC Press: Boca Raton, London, pp. 19–37.
151. Scheffer, I.E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M.B., French, J. and Guilhoto, L. *et al.* (2017) ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. Available at: doi:10.1111/epi.13709.

152. Schmidt, D. and Löscher, W. (2005) Uncontrolled epilepsy following discontinuation of antiepileptic drugs in seizure-free patients: a review of current clinical experience. *Acta Neurologica Scandinavica*, 111(5), 291–300. Available at: doi:10.1111/j.1600-0404.2005.00408.x.
153. Schomburg, E.W., Fernández-Ruiz, A., Mizuseki, K., Berényi, A., Anastassiou, C.A. and Koch, C. *et al.* (2014) Theta phase segregation of input-specific gamma patterns in entorhinal-hippocampal networks. *Neuron*, 84(2), 470–485. Available at: doi:10.1016/j.neuron.2014.08.051.
154. Schuchmann, S., Schmitz, D., Rivera, C., Vanhatalo, S., Salmen, B. and Mackie, K. *et al.* (2006) Experimental febrile seizures are precipitated by a hyperthermia-induced respiratory alkalosis. *Nature Medicine*, 12(7), 817–823. Available at: doi:10.1038/nm1422.
155. Semenikhina, M.O., Bogovyk, R.I., M.P. Fedoriuk, O.V. Stasyshyn, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, *Fiziol. Zh.* 2018; 64(6): 17-22. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz64.06.017>.
156. Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S. and Dauchy, S. *et al.* (2011) Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Molecular Pharmaceutics*, 8(4), 1332–1341. Available at: doi:10.1021/mp200129p.
157. Shinnar, S., Berg, A.T., Moshe, S.L., O'Dell, C., Alemany, M. and Newstein, D. *et al.* (1996) The risk of seizure recurrence after a first unprovoked afebrile seizure in childhood: an extended follow-up. *Pediatrics*, 98(2 Pt 1), 216–225.
158. Sillanpää, M. and Schmidt, D. (2009) Early seizure frequency and aetiology predict long-term medical outcome in childhood-onset epilepsy. *Brain : a Journal of Neurology*, 132(Pt 4), 989–998. Available at: doi:10.1093/brain/awn357.
159. Siller-Matula, J.M., Michael Schwameis, Andrew D. Blann, Christine Mannhalter and Bernd Jilma (2011) Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects. *undefined*.

160. Smolders, I., Khan, G.M., Manil, J., Ebinger, G. and Michotte, Y. (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *British Journal of Pharmacology*, 121(6), 1171–1179. Available at: doi:10.1038/sj.bjp.0701231.
161. Somogyi, P., Katona, L., Klausberger, T., Lasztóczy, B. and Viney, T.J. (2014) Temporal redistribution of inhibition over neuronal subcellular domains underlies state-dependent rhythmic change of excitability in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1635), 20120518. Available at: doi:10.1098/rstb.2012.0518.
162. Spiel, A.O., Bartko, J., Schwameis, M., Firbas, C., Siller-Matula, J. and Schuetz, M. *et al.* (2011) Increased platelet aggregation and in vivo platelet activation after granulocyte colony-stimulating factor administration. A randomised controlled trial. *Thrombosis and Haemostasis*, 105(4), 655–662. Available at: doi:10.1160/TH10-08-0530.
163. Stafstrom, C.E. and Carmant, L. (2015) Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(6). Available at: doi:10.1101/cshperspect.a022426.
164. Stein, E.S., Itsekson-Hayosh, Z., Aronovich, A., Reisner, Y., Bushi, D. and Pick, C.G. *et al.* (2015) Thrombin induces ischemic LTP (iLTP): implications for synaptic plasticity in the acute phase of ischemic stroke. *Scientific Reports*, 5(1), 7912. Available at: doi:10.1038/srep07912.
165. Steinberg, S.F. (2005) The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Molecular Pharmacology*, 67(1), 2–11. Available at: doi:10.1124/mol.104.003103.
166. Strigow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P. and Breder, J. *et al.* (2001) Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *The European Journal of Neuroscience*, 14(4), 595–608. Available at: doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01676.x.

167. Sugano, K., Kansy, M., Artursson, P., Avdeef, A., Bendels, S. and Di, L. *et al.* (2010) Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9(8), 597–614. Available at: doi:10.1038/nrd3187.
168. Sutula, T.P. (2004) Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Research*, 60(2-3), 161–171. Available at: doi:10.1016/j.epilepsyres.2004.07.001.
169. Suzuki, M., Ogawa, A., Sakurai, Y., Nishino, A., Venohara, K. and Mizoi, K. *et al.* (1992) Thrombin activity in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 23(8), 1181–1182. Available at: doi:10.1161/01.str.23.8.1181.
170. Tang, X., Orchard, S.M., Liu, X. and Sanford, L.D. (2004) Effect of varying recording cable weight and flexibility on activity and sleep in mice. *Sleep*, 27(4), 803–810.
171. Thom, M., Mathern, G.W., Cross, J.H. and Bertram, E.H. (2010) Mesial temporal lobe epilepsy: How do we improve surgical outcome? *Annals of Neurology*, 68(4), 424–434. Available at: doi:10.1002/ana.22142.
172. Tomkins, O., Shelef, I., Kaizerman, I., Eliushin, A., Afawi, Z. and Misk, A. *et al.* (2008) Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 79(7), 774–777. Available at: doi:10.1136/jnnp.2007.126425.
173. Traynelis, S.F. and Trejo, J. (2007) Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Hematology*, 14(3), 230–235. Available at: doi:10.1097/MOH.0b013e3280dce568.
174. Turski, W.A., Cavalheiro, E.C. and Schwarz, M. (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*, 9, 315–335.
175. van der Meer, M.A.A. and Redish, A.D. (2011) Theta phase precession in rat ventral striatum links place and reward information. *The Journal of Neuroscience*, 31(8), 2843–2854. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.4869-10.2011.

176. van Vliet, E.A., Aronica, E. and Gorter, J.A. (2015) Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38, 26–34. Available at: doi:10.1016/j.semcdb.2014.10.003.
177. van Vliet, E.A., da Costa Araújo, S., Redeker, S., van Schaik, R., Aronica, E. and Gorter, J.A. (2007) Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain : a Journal of Neurology*, 130(Pt 2), 521–534. Available at: doi:10.1093/brain/awl318.
178. Vance, K.M., Rogers, R.C. and Hermann, G.E. (2015) PAR1-activated astrocytes in the nucleus of the solitary tract stimulate adjacent neurons via NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 35(2), 776–785. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.3105-14.2015.
179. Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P. and Venance, L. *et al.* (2014) Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(37), 13535–13540. Available at: doi:10.1073/pnas.1411233111.
180. Vanderwolf, C.H. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 26(4), 407–418. Available at: doi:10.1016/0013-4694(69)90092-3.
181. Varga, C., Golshani, P. and Soltesz, I. (2012) Frequency-invariant temporal ordering of interneuronal discharges during hippocampal oscillations in awake mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), E2726-34. Available at: doi:10.1073/pnas.1210929109.
182. Veilleux-Lemieux, D., Castel, A., Carrier, D., Beaudry, F. and Vachon, P. (2013) Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 52(5), 567–570.

183. Verrotti, A., Beccaria, F., Fiori, F., Montagnini, A. and Capovilla, G. (2012) Photosensitivity: epidemiology, genetics, clinical manifestations, assessment, and management. *Epileptic Disorders : International Epilepsy Journal with Videotape*, 14(4), 349–362. Available at: doi:10.1684/epd.2012.0539.
184. Vezzani, A., Lang, B. and Aronica, E. (2015) Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(2), a022699. Available at: doi:10.1101/cshperspect.a022699.
185. Vu, T.-K.H., Hung, D.T., Wheaton, V.I. and Coughlin, S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6), 1057–1068. Available at: doi:10.1016/0092-8674(91)90261.
186. Wada, A., Yokoo, H., Yanagita, T. and Kobayashi, H. (2005) Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*, 99(4), 307–321. Available at: doi:10.1254/jphs.crj05009x.
187. Washington Institute for Laboratory Animal Research (2011) Guide for the care and use of laboratory animals.
188. Wieser, H.-G. (2004) ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*, 45(6), 695–714. Available at: doi:10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x.
189. Wikenheiser, A.M. and Redish, A.D. (2015) Hippocampal theta sequences reflect current goals. *Nature Neuroscience*, 18(2), 289–294. Available at: doi:10.1038/nn.3909.
190. Williamson, P.D., French, J.A., Thadani, V.M., Kim, J.H., Novelly, R.A. and Spencer, S.S. *et al.* (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Annals of Neurology*, 34(6), 781–787. Available at: doi:10.1002/ana.410340605.

191. Wojtukiewicz, M.Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S.C. and Honn, K.V. (2015) Protease-activated receptors (PARs)--biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 34(4), 775–796. Available at: doi:10.1007/s10555-015-9599-4.
192. Xi, G., Reiser, G. and Keep, R.F. (2003) The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *Journal of Neurochemistry*, 84(1), 3–9. Available at: doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01268.x.
193. Xiu-Yu Shi, Ji-Wen Wang, Ge-Fei Lei and Ruo-Peng Sun (2007) Long-term effects of recurrent seizures on learning, behavior and anxiety: an experimental study in rats. *World Journal of Pediatrics*, 3(1).
194. Yamamoto, J., Suh, J., Takeuchi, D. and Tonegawa, S. (2014) Successful execution of working memory linked to synchronized high-frequency gamma oscillations. *Cell*, 157(4), 845–857. Available at: doi:10.1016/j.cell.2014.04.009.
195. Yang, J., Woodhall, G.L. and Jones, R.S.G. (2006) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(2), 406–410. Available at: doi:10.1523/JNEUROSCI.4413-05.2006.
196. Zheng, C. and Colgin, L.L. (2015) Beta and gamma rhythms go with the flow. *Neuron*, 85(2), 236–237. Available at: doi:10.1016/j.neuron.2014.12.067.
197. Боговик Р.І., Федорюк М.П., Перебейніс В.В., Натаров Р.М., Чернінський А.О., Максимюк О.П., Ісаєв Д.С. «Бездротовий пристрій з bluetooth передавачем для реєстрації електричних потенціалів головного мозку у щурів». Патент на корисну модель: 142040 12.05.2020.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Bogovyk R., Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Holmes G.L., Isaeva E. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy & Behavior* – 67:66-69; PMID: 28088683. (Особистий внесок здобувача: проведення поведінкових досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні результатів, оформлення результатів у вигляді статті).

2. М.О. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, O.V. Stasyshyn, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, *Fiziol. Zh.* 2018; 64(6): 17-22. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz64.06.017>. (Особистий внесок здобувача: Автором виконана розробка та адаптація поведінкової установки, розробка протоколу виконання тестів, впровадження системи автообробки експериментальних відеофайлів та статистичне опрацювання результатів дослідження).

Патенти:

1. Боговик Р.І., Федорюк М.П., Перебейніс В.В., Натаров Р.М., Чернінський А.О., Максимюк О.П., Ісаєв Д.С. «Бездротовий пристрій з bluetooth передавачем для реєстрації електричних потенціалів головного мозку у щурів». Патент на корисну модель: 142040 12.05.2020. (Особистий внесок здобувача: Розробка концепту пристрою, участь у проектуванні схеми та розробці алгоритмів роботи системи, проведення збірки пристрою та тестування).

2. Федорюк М.П., Боговик Р.І., Перебейніс В.В., Натаров Р.М., Пристрій для реєстрації електрокортикограми головного мозку у щурів: пат. 140101, Україна. № 201906705; заявл. 14.06.2019; опубл. 10.02.2020. (Особистий внесок здобувача: Розробка друкованої плати пристрою, участь у проектуванні схеми та розробці алгоритмів роботи системи, проведення збірки пристрою та тестування).

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

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

7. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Isaeva E. Inhibition of par1 affects on emotionally-modulated behaviour and synaptic plasticity in rat at lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, Україна, 2018.
8. Semenikhina M., Bogovyk R., Fedoriuk M., Nikolaienko O., Savotchenko A., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus, Oxford autumn school in neuroscience, Oxford, UK, 2018.
9. Р.І. Боговик, М.П. Федорюк Зміни ритмів гіпокампу, амігдали та нюхової цибулини під час розвитку епілептичного статусу у щурів при літій – пілокараїновій моделі епілепсії. XI Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біологічні дослідження – 2020», Житомир, Україна, 2020.
10. M.O. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat, International scientific and practical forum "Ukraine of the future", Berdyans'k, Ukraine, 2018.
11. Semenikhina M., Bogovyk R., Lunko O., Fedoriuk M., Isaev D., Krishtal O., Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 affect on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus, Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology, Kyiv, Ukraine, 2018.
12. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, Ruslan Bogovyk, Mykhailo Fedoriuk, Elena Isaeva Inhibition of protease-activated receptor 1 affects on the long-term synaptic plasticity following status epilepticus Scientific activity for forming Professional competence of future profession, Sumy – 2017, Sumy, Ukraine, 2017.
13. Marharyta Semenikhina, Alina Savotchenko, Ruslan Bogovyk, Mykhailo Fedoriuk and Elena Isaeva Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on the synaptic plasticity following status epilepticus in young adult rat, VII International Congress of Ukrainian Society for Neuroscience, Kyiv, Ukraine, 2017.