

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

ІСАЄВА Олена Валентинівна

УДК 612.82:576.54:577.3

**ВПЛИВ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ АКТИВНОСТІ
НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ**

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділах загальної фізіології нервової системи та фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Науковий консультант: академік НАН України, доктор біологічних наук
Кришталь Олег Олександрович
директор Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Макарчук Микола Юхимович
Навчально-науковий центр “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка
завідувач кафедри фізіології людини і тварин

академік АМН України, доктор медичних наук, професор
Цимбалюк Віталій Іванович
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМНУ»,
заступник директора
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця.
завідувач кафедри нейрохірургії

доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
завідувач відділу нейрохімії

Захист відбудеться «16» лютого 2016 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

Автореферат розісланий «14» січня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Любанова О. П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Епілепсія є поширеним психоневрологічним захворюванням, основним симптомом якого є спонтанні епілептичні напади різної інтенсивності, зумовлені надмірно синхронізованою активністю великої кількості нейронів мозку (Noebels et al., 2012). Епілептиформна активність (ЕФА) часто зустрічається у дітей і може обумовлюватися різноманітними причинами – бути спадковою або набутою, найчастіше в результаті пошкодження головного мозку різного генезу (Hauser, 1994; Sidhu et al., 2013). Приблизно у 30 % випадків наявність епілептичних нападів у дитячому віці спричиняє розвиток хронічної епілепсії у подальшому житті (Ronen et al., 2007). У переважній більшості випадків наявність електрографічної ЕФА в складі ЕЕГ пов'язана з серйозними хронічними когнітивними та поведінковими розладами (Bhise et al., 2010; Sogawa et al., 2011; Wei and Lee, 2015).

Епілептичні напади у новонароджених можуть істотно перешкоджати нормальному розвитку ЦНС, впливати на координацію і упорядкування синаптичних зв'язків під час онтогенезу і навіть призводити до загибелі великих популяцій нервових клітин (Holmes et al., 1998). Інтенсивність негативних впливів ЕФА на функціонування мозку значною мірою залежить від віку організму; вона справляє різну дію на незрілі нейрони з невеликою кількістю синапсів та на більш розвинені нейрони, що мають велику кількість функціональних синапсів (Lado et al., 2002). Ця особливість найбільш важлива щодо приматів, для яких характерна велика тривалість періоду розвитку головного мозку. Дозрівання різних структур мозку є гетерохронним. Першими закінчують своє формування стовбурові відділи, відповідальні за реалізацію природжених, безумовних рефлексів, тоді як дозрівання вищих відділів (таких, як великі півкулі головного мозку), котрі забезпечують контроль вищої нервової діяльності і відповідають за реалізацію індивідуально набутих умовних рефлексів, відбувається пізніше (Marsh et al., 2008). Як зазначалось вище, ЕФА в критичний період розвитку ЦНС може суттєво впливати на нормальний розвиток мозку, що спричиняє різноманітні поведінкові і когнітивні дефекти. Добре відомо, що такі фактори, як вік дитини, в якому відбувся перший епілептичний напад, тривалість та частота нападів, дози застосованих протиепілептичних препаратів, як правило, істотно впливають на загальний рівень когнітивних порушень у дітей з епілепсією (MacAllister and Schaffer, 2007). Для вивчення механізмів і наслідків епілептичних нападів у дитячому віці були розроблені експериментальні моделі на тваринах із моделюванням ЕФА, спричиненої різноманітними факторами (Mares, 2012). Проте, незважаючи на значну кількість фундаментальних та клінічних досліджень цієї проблеми, розуміння механізмів, які обумовлюють негативний вплив ЕФА на розвиток ЦНС, залишається обмеженим. Зокрема, подальшої деталізації потребує характеристика впливу ЕФА в неонатальний період на функції неокортекса. Питання, чи є неврологічні розлади наслідком наявності ЕФА, або вони є результатом впливу фармакологічного втручання, також значною мірою залишається відкритим. Тому дослідження впливів

ЕФА в період раннього розвитку на функціонування ЦНС є однією з найактуальніших проблем сучасної нейрофізіології.

У 30 – 40 % усіх випадків розвиток епілепсії може бути спровокований різноманітними пошкодженнями мозку, черепномозковими травмами, ішемічними інсультами, внутрішньомозковими крововиливами, інфекціями, пухлинами, корковою дисплазією, деякими нейродегенеративними захворюваннями, симптоматичними епілептичними нападами (такими, як складні фебрильні судоми) (Noebels et al., 2012). Незважаючи на велику різноманітність етіології, загальною ознакою відповідних розладів є наявність пароксизмальних змін збудливості ЦНС, що індукує подібні патологічні особливості: останні в кінцевому рахунку проявляються клінічно як епілептичне захворювання. Дослідження останніх років на різних експериментальних моделях набутої епілепсії значно розширили наше розуміння молекулярних і клітинних процесів, які відбуваються в перебігу епілептогенезу і можуть сприяти формуванню аномальних нейронних мереж, здатних до спонтанної генерації ЕФА (Goldberg and Coulter, 2013). Тим не менш, слід визнати: поки що немає надійної стратегії запобігання розвитку набутої епілепсії. Тому пошук нових молекулярних мішеней, залучених у епілептогенез, є одним з найпріоритетніших завдань сучасної нейрофізіології.

Відомо, що низька ушкоджень мозку різної етіології, які можуть стати причиною розвитку епілепсії, пов'язані з порушенням цілісності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) (Schoknecht et al., 2015). Як клінічні спостереження, так і дослідження на різних експериментальних моделях переконливо вказують на те, що дисфункція ГЕБ може бути важливим фактором ризику розвитку набутої епілепсії у подальшому житті (Gorter et al., 2015). Як вважають, підвищення проникливості ГЕБ може призводити до екстравазації клітин крові і білків плазми (таких, як альбумін, тромбін, плазміноген) у внутрішньомозкове середовище. Ці фактори здатні безпосередньо або опосередковано активувати різні патологічні процеси та призводити до формування епілептичного вогнища (van Vliet et al., 2015). Втім, незважаючи на значні досягнення в дослідженнях специфічних шляхів, що активуються у результаті порушень ГЕБ, і можуть брати участь у розвитку набутої епілепсії, на сьогодні зв'язок між відповідними процесами залишається значною мірою невивченим.

Існують докази того, що, окрім ключової ролі в коагуляції крові, білок сироватки тромбін задіяний у численні механізми, важливі для функціонування мозку, як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах (Xi et al., 2003). На можливе залучення тромбіну і його молекулярних рецепторів – протеазаактивованих рецепторів 1 (ПАР1) – у процес розвитку епілепсії вказують наступні спостереження: 1) інтрацеребральне введення тромбіну в базальні ганглії щурів викликає епілептичні напади; 2) тромбін, активуючи ПАР1, може ініціювати ушкодження нейронів, впливати на нейрогенез, викликати гліоз, запалення та інші процеси, які часто спостерігаються при епілептогенезі; 3) інгібування ПАР1 зумовлює нейропротекторні і протизапальні ефекти в умовах різних моделей ушкодження головного мозку; 4) ПАР1 бере участь у регуляції встановлених молекулярних мішеней анти-епілептогенної терапії (Turgeon et al., 2000; Xi et al.,

2003; Isaeva et al., 2012). Проте, незважаючи на значну кількість встановлених фактів, нині не має прямих досліджень участі тромбіну і ПАР1 в епілептогенезі.

У дисертаційній роботі на експериментальних моделях ЕФА в період раннього розвитку і класичній моделі скроневої епілепсії зі склерозом гіпокампа з використанням сучасних морфологічних, електрофізіологічних і нейроповедінкових методик ми досліджували наслідки впливу ЕФА різного генезу на функціонування ЦНС на клітинному рівні та рівні цілого організму, а також участь системи тромбін - ПАР1 в епілептогенезі, спровокованому епілептичним статусом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках наукових програм відділів загальної фізіології нервової системи і фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: "Молекулярні механізми інтегративної функції нервових клітин в нормі та при мозковій патології" (№ державної реєстрації 197U0009158), "Молекулярні механізми, відповідальні за специфіку функцій різних мозкових структур" (№ державної реєстрації 0100U002062), «Дослідження молекулярно-генетичних механізмів фізіологічних та патофізіологічних процесів та розробка методів їх корекції» (№ державної реєстрації: 0107U005336); «Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів» (№ державної реєстрації: 0107U010843); «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (№ державної реєстрації: 0110U004750); на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології – «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» (№ державної реєстрації UF45.2/001); в рамках проекту Українського науково-технологічного центру «Використання заряджених наночасток для регуляції збудливості нервових клітин: новий підхід до боротьби з епілепсією» (№ державної реєстрації 102/58).

Мета дослідження. Метою нашої роботи було встановлення характеристик морфологічних та електрофізіологічних змін у головному мозку щурів та змін поведінкових феноменів у цих тварин, спричинених індукцією ЕФА.

Завдання дослідження:

1. Встановити вплив неонатальних судомних нападів на поріг виникнення ЕФА у корі головного мозку дорослих щурів.
2. Ідентифікувати вплив неонатальних повторюваних судомних нападів на характеристики синаптичної передачі в нейронах різних відділів ЦНС у дослідах *in vitro*.
3. Визначити вплив ЕФА, виниклої під час раннього розвитку, на різні форми синаптичної пластичності в корі головного мозку дорослих щурів.
4. Охарактеризувати наслідки ЕФА, індукованої під час раннього розвитку, щодо параметрів поведінки дорослих щурів.

5. Описати морфологічні та електрофізіологічні зміни у головному мозку щурів, спровоковані епілептичним статусом.

6. Оцінити можливість залучення змін у системі тромбін - PAR1 у процес епілептогенезу з використанням літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії.

7. З'ясувати вплив модуляції активності PAR1 на розвиток епілепсії, спричинений епілептичним статусом.

Об'єкт дослідження – фізіологічні зміни в головному мозку щурів, викликані наявністю епілептиформної активності.

Предмет дослідження – показники електричної активності головного мозку, гістологічні параметри нейронів головного мозку, показники поведінкових феноменів.

Методи дослідження. Експериментальне моделювання різних типів ЕФА (дослідження впливу індукованої судомної і безсудомної ЕФА на функціонування різних ділянок ЦНС); петч-клемп-реєстрація постсинаптичних струмів (оцінка змін характеристик синаптичної передачі, спричинених ЕФА); мікроелектродна реєстрація мембранного потенціалу (визначення збудливості і синаптичної пластичності нейронних мереж, дослідження динаміки розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі); гістологічні методи (оцінка життєздатності та загибелі клітин, визначення рівня тромбіну і PAR1 у нервовій тканині), оцінка параметрів поведінкових феноменів у тварин (локомоторної активності, рівня тривожності, вмотивованості, поведінкової гнучкості, оперативної пам'яті, уваги та соціальної поведінки); оцінка впливів фармакологічних агентів, статистичний аналіз числових даних.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі представлені оригінальні результати морфофункціональних досліджень наслідків епілептиформної активності (ЕФА) у період раннього онтогенезу, а також механізмів розвитку епілепсії, спровокованої у зрілому віці епілептичним статусом (ЕС).

Продемонстровано, що наявність епілептичних нападів у ранній період життя щурів призводить до суттєвого зниження амплітуди гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС) у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа і не впливає на розвиток збуджувальної синаптичної передачі в цих нейронах. Отже, виявлено порушення балансу збудження/гальмування в гіпокампі, пов'язане з історією судом в період раннього розвитку.

Вперше встановлено, що повторювані неонатальні епілептичні напади, викликані інгаляцією флуротилу (ФТ), призводять до хронічного зниження порогу виникнення ЕФА в соматосенсорній корі (ССК) щурів. Підвищення збудливості нервових мереж може (принаймні частково) бути пов'язане з порушеннями функції гальмівної та збуджувальної синаптичної передачі у нейронах цієї ділянки кори головного мозку. Виявлене значне зниження амплітуди спонтанних ГПСС та

частоти мініатюрних ГПСС у пірамідних клітинах шарів 2/3 ССК, без змін амплітуди мініатюрних ГПСС у щурів експериментальної групи, вказує на пресинаптичний характер змін гальмівної синаптичної передачі. Вперше показано, що неонатальні судоми зумовлюють значні зміни амплітуди і частоти спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (ЗПСС) у нейронах ССК. Збільшення частоти мініатюрних ЗПСС у пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК у щурів з історією неонатальних епілептичних нападів, швидше за все, вказує на пресинаптичну природу змін глутаматергічної синаптичної передачі. Виявлено, що порушення функції збуджувальної синаптичної передачі в нейронах ССК таких тварин значною мірою зумовлена модифікацією стану НМДА-рецепторів.

Доведено, що неонатальні епілептичні напади призводять до хронічних змін гальмівної синаптичної передачі в пірамідних нейронах шару 5 медіальної зони префронтальної кори (мПФК) і не впливають на збуджувальну синаптичну передачу в цих нейронах.

Вперше детально проаналізовано вплив повторюваних неонатальних епілептичних нападів на синаптичну пластичність в ССК та мПФК щурів. Встановлено, що такі напади не впливають на вірогідність виникнення довготривалої потенціації, на депресію постсинаптичних потенціалів, викликану високочастотною стимуляцією, та на максимальну посттетанічну потенціацію постсинаптичних відповідей в синаптичних зв'язках шарів 2/3 і 4 ССК, але призводять до хронічного посилення феномену довготривалої потенціації в цих синапсах. Встановлено також, що епілептичні напади під час раннього розвитку призводять до хронічних змін короткотривалої пластичності при передачі між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК.

Для з'ясування впливу ЕФА, локалізованої в ПФК, на функціонування цієї зони кори розроблена нова експериментальна модель з використанням повторюваних інтрацеребральних мікроін'єкцій бікукуліну. Встановлено, що така індукція локальної ЕФА в період раннього розвитку викликає хронічні зміни короткотривалої пластичності синаптичної передачі в вищезгаданих шарах мПФК. Показано, що зміни посттетанічної потенціації мають той же напрямок, що і зміни, продемонстровані з використанням ФТ моделі неонатальних епілептичних нападів, але мають більш вибіркового характеру.

Доведено, що повторювана локальна ЕФА, спровокована ін'єкціями бікукуліну в мПФК в період раннього розвитку, не впливає на локомоторну активність, рівень тривожності, вмотивованість, поведінкову гнучкість і мПФК-залежний компонент оперативної пам'яті, але зумовлює значний дефіцит уваги і розлади соціальної поведінки піддослідних тварин.

З використанням літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії вперше продемонстровано роль тромбіну і протеазаактивованого рецептора 1 (ПАР1) в епілептогенезі, спровокованому ЕС. Встановлено, що ЕС, індукований ін'єкцією пілокарпіну, спричиняє підвищення рівня тромбіну і зниження щільності ПАР1 в зоні СА1 гіпокампа. З використанням специфічного антагоніста ПАР1 доведено, що пригнічення активності цих рецепторів призводить до значного зниження спричинених ЕС смертності і захворюваності тварин, відновлення експресії ПАР1 у

зоні CA1, зниження загибелі клітин в цій зоні, пригнічення інтеріктальної та іктальної активності, а також до зниження вірогідності виникнення спонтанних судом в подальшому житті, тобто забезпечує нейропротекторний і антиепілептогенний ефекти.

Практичне значення роботи. Результати дисертаційної роботи мають, насамперед, фундаментальне значення, оскільки помітно розширюють існуючі уявлення про вплив неонатальної ЕФА на розвиток ЦНС, про хронічні наслідки різних форм ЕФА у ранній період життя на нормальне функціонування різних ділянок ЦНС і про механізми, залучені у розвиток набутої епілепсії в дорослому віці. Отримані дані щодо впливу ЕФА на синаптичну передачу і пластичність синаптичних зв'язків в гіпокампі і неокортексі щурів можуть служити підґрунтям для розуміння механізмів хронічного підвищення збудливості ЦНС і дефектності поведінкових феноменів, що часто спостерігаються у пацієнтів з історією неонатальних епілептичних розладів і на експериментальних моделях епілепсії. Отримані дані сприятимуть винайденню нових специфічніших фармакологічних препаратів, що забезпечать відновлення рівноваги між процесами збудження і гальмування при лікуванні епілепсії.

Розроблена у дисертаційній роботі нова експериментальна модель ЕФА, локалізованої в ПФК, може стати ефективним інструментом у дослідженнях впливів парціальних епілептичних нападів на функціонування кори великих півкуль і сприяти з'ясуванню клітинних механізмів, що лежать в основі порушень уваги і соціальної поведінки у пацієнтів з епілепсією. Подальше дослідження механізмів, які лежать в основі дисфункцій, описаних у наших дослідженнях, може призвести до розробки нових терапевтичних підходів, спрямованих на поліпшення якості життя пацієнтів з історією парціальної ЕФА у дитинстві та пов'язаними з епілепсією супутніми психічними захворюваннями.

У дисертаційній роботі вперше отримані дані, щодо участі системи тромбін - PAR1 у епілептогенезі, спричиненому епілептичним статусом. Отримані дані щодо антиепілептогенного і нейропротекторного ефектів інгібування PAR1 вказують на те, що PAR1 може стати новою перспективною мішенню антиепілептогенної терапії.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто обрано і обґрунтовано напрямок і схему наукової роботи, проведено критичний аналіз літературних джерел у відповідності до сучасних уявлень про вплив епілептичних нападів на розвиток ЦНС і механізми розвитку набутої епілепсії. Сформульовані мета, основні завдання дисертаційної роботи, визначено репрезентативний об'єм наукових досліджень та комплекс методів, організовано і проведено основну частину експериментів, аналіз отриманих результатів, статистичну обробку фактичного матеріалу, його наукову інтерпретацію, узагальнення результатів і формулювання висновків. Особисто здобувачем була виконана більшість представлених у роботі експериментів на свіжоізолюваних зрізах мозку. Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: к.б.н. Д. С. Ісаєвим та к.б.н. А. В. Савотченко, зав. відділу неврології Медичної школи Дартмутського коледжу (ГанOVER, США) проф.

Г. Л. Холмсом та співробітником відділу неврології університету Вермонта, Берлінгтон, США, А. Хернан. Гістохімічні експерименти були проведені на базі відділу цитології (керівник д.б.н., проф. Г. Г. Скібо) спільно з к.б.н. І. В. Лушніковою.

Апробація результатів дисертації. Усі матеріали дисертації доповідались на семінарах Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, а також на наукових симпозіумах і з'їздах: конференції Фізіологічного товариства Великобританії (2000), щорічних конференціях Американського товариства нейронаук, (США, 2009, 2010), Американської епілептичної спілки (2006, 2007, 2009, 2010), Європейському конгресі епілептологів (2008, 2012), Міжнародній конференції “Molecular mechanisms of intracellular calcium signaling” (Київ, 2009), 5-й міжнародній конференції Українського фізіологічного товариства, присвяченій пам'яті П. Г. Костюка (Київ, 2011), а також на засіданнях сектору молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Публікації. За результатами дослідження опубліковано 36 наукових робіт, з яких 22 статті у вітчизняних і іноземних наукових журналах фахового спрямування і 14 тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису методик дослідження, опису отриманих результатів, їх обговорення, висновків, списку літературних джерел (473 найменувань). Обсяг дисертації складає 332 стор. Дисертаційна робота ілюстрована 115 рисунками і 9 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається із трьох підрозділів, в яких наведено сучасні уявлення про вплив ЕФА різної етіології на розвиток ЦНС, розглянуто патологічні процеси, пов'язані із розвитком скроневої епілепсії, охарактеризовано експериментальні моделі для вивчення механізмів епілептогенезу та негативних наслідків ЕФА у неонатальний період, представлено сучасні уявлення про роль тромбіну та PAR1 у функціонуванні ЦНС в нормі та при патологічних станах. Аналіз літературних відомостей свідчить, що клітинні зміни (особливо пластичні), спровоковані ЕФА в неонатальний період, досі охарактеризовані лише фрагментарно. Зокрема, надзвичайно актуальним є отримання детальної характеристики впливу ЕФА в неонатальний період на функції гіпокампа і неокортекса. Значну цікавість також викликають клітинні механізми розвитку набуті епілепсії, а саме з'ясування ролі тромбіну і PAR1 в епілептогенезі. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаних в дисертаційній роботі.

Матеріали і методи дослідження

Усі експерименти в роботі були виконані із дотриманням положень Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях та відповідно етичним вимогам до роботи з дослідними тваринами, прийнятими в установах Національної Академії наук України.

В експериментах використовували щурів ліній Спрейг-Доулі або Вістар. Впливи ЕФА, викликані в період раннього розвитку, визначали в гіпокампі, соматосенсорній корі (ССК) та префронтальній корі (ПФК) молодих і дорослих щурів. Дослідження впливу антагоніста ПАР1 на спровокований епілептичним статусом епілептогенез проводили в гіпокампі дорослих щурів. В роботі були використані експериментальні моделі набутої епілепсії та ЕФА, а саме модель повторюваних неонатальних судомних епілептичних нападів, спровокованих інгаляцією флуротилу (ФТ) (Hernan et al., 2013; Isaeva et al., 2006, 2010), модель повторюваної парціальної ЕФА, індукованої локальною інтрацеребральною ін'єкцією бікукуліну (Hernan et al., 2014), літій-пілокарпінова модель скроневої епілепсії (Gliem et al., 2001).

Електрофізіологічні дослідження *in vitro* проводили на свіжоізолюваних зрізах (400-500 мкм) мозку щурів. Дослідження постсинаптичних струмів (ПСС) в нейронах ССК 60-80- денних щурів і медіальній зоні ПФК (мПФК) проводили при кімнатній температурі (22-24°C). Інші *in vitro* електрофізіологічні дослідження виконували при температурі 32°C. Фокальні потенціали (потенціали поля) відводили від шарів 2/3 та 5/6 ССК у зрізах отриманих від тварин віком 20-30, 60-80 або 80-90 діб після народження. Для індукції ЕФА в зрізах мозку використовували чотири *in vitro* моделі. В двох із них ЕФА викликали додаванням до позаклітинного розчину специфічних блокаторів гальмівної синаптичної передачі габазину або бікукуліну. Для індукції ЕФА в низькомагнієвій моделі із позаклітинного розчину вилучали MgCl₂. Для індукції ЕФА в 4-амінопіридиновій моделі в цей розчин додавали блокатор калієвих каналів 4-амінопіридин (4-АП) в концентрації 50-100 мкМ.

Термін ЕФА використовували для опису іктально- або інтеріктальноподібної активності. Інтеріктальноподібна активність була визначена як короткі низькочастотні фокальні потенціали високої амплітуди, що спостерігали в ізоляції на тлі нормальної активності. Термін іктальноподібна активність використовували для опису високо синхронних розрядів із частотою більше ніж 1 с⁻¹ та тривалістю більш ніж 10 с. Під час іктальноподібної активності спостерігали тонічні та клонічні ритми. Тонічними ритмами була визначена повторювана низькоамплітудна високочастотна активність. Клонічними ритмами визначали високоамплітудні поодинокі або множинні спайки та поліспайк-хвильові розряди, що чергувалися з низькоамплітудними уповільненнями активності. Судомні епілептичні напади тривалістю понад 30 хв визначали як епілептичний статус.

Оцінку розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі проводили, досліджуючи ефекти додавання агоніста ГАМК_A-рецепторів ізогувацину на частоту потенціалів дії (ПД), відведених зовнішньоклітинно від зони СА3 пірамідного шару гіпокампа (Khazipov et al., 2004).

Вивчення впливів ЕФА на викликані постсинаптичні потенціали (ВПСП) та синаптичну пластичність здійснювали в зрізах ССК та мПФК. ВПСП відводили позаклітинно. В ССК подразнювали шар 4, а ВПСП відводили від шару 2 відповідної колонки. У мПФК подразнювали шари 5 або 2/3, а ВПСП відводили від шару 5. Для індукції короткотривалого полегшення постсинаптичних відповідей використовували протоколи парної стимуляції. Наявність посттетаничної потенціації (ПТП) визначали впродовж 5-10 хв після тетаничної стимуляції (10-15 стимулів з частотою 50-100 с⁻¹). Для індукції довготривалої потенціації (ДП) використовували протокол стимуляції описаний раніше (Diamond et al., 1988).

Гальмівні і збуджувальні постсинаптичні струми (ГПСС і ЗПСС) відводили від нейронів з використанням методу «петч-клемп» в конфігурації «ціла клітина». Спонтанні ГПСС (сГПСС) реєстрували при підтримуваному потенціалі (ПП) 0 мВ. Реєстрацію спонтанних ЗПСС (сЗПСС), опосередкованих активацією АМПА- або НМДА-рецепторів, здійснювали при відведенні від одного й того ж самого нейрона за присутності 15 мкМ бікукуліну або 10 мкМ габазіну в позаклітинному розчині та при ПП, відповідно, -80 і +40 мВ. В дослідженнях на нейронах мПФК ЗПСС вимірювали при ПП -65 мВ. Для реєстрації сЗПСС, обумовлених активацією НМДА-рецепторів, в позаклітинний розчин додавали антагоніст АМРА- та каїнатних рецепторів 6-ціано-7-нітрохіноксалін-2,3-діон (CNQX). Для реєстрації мініатюрних ГПСС та ЗПСС (мГПСС і мЗПСС) використовували таку саму методику, як і для реєстрації сПСС, але в позаклітинний розчин додавали блокатор потенціалкерованих натрієвих каналів тетродотоксин (ТТХ) для пригнічення синаптичних відповідей на надходження ПД. Для реєстрації локальних ПД від поодиноких нейронів ССК використовували метод «петч-клемп» в конфігурації «cell-attached».

Для електрофізіологічних досліджень *in vivo* імплантували систему ЕЕГ-електрод/канюля в мПФК (координати: AP = 3,0 мм; ML = 0,8 мм; DV = 2,5 мм). В окремій серії експериментів одночасно імплантували систему ЕЕГ-електрод/канюля в мПФК правої півкулі та ЕЕГ-електрод в мПФК лівої півкулі або в ССК (AP = 3,0 мм; ML = 4,9 мм; DV = 2,5 мм). Для *in vivo* досліджень на гіпокампі шурів, імплантували відповідний електрод в зону СА1 дорсальної частини гіпокампа (AP = -3,7 мм; ML = 2,5 мм; DV = 2,0 мм). Референсний електрод імплантували в мозочок. Електроди або системи електрод/канюля кріпили на черепі за допомогою протакрилу. Ефекти інтрацеребральних ін'єкцій бікукуліну щодо вірогідності виникнення ЕФА та судом, реєстрували, відводячи ЕЕГ локально (на відстані 100-200 мкм від місця ін'єкцій) після кожної ін'єкції бікукуліну в ПФК, протягом 30 хв. Одночасну реєстрацію масових потенціалів в ПФК обох півкуль головного мозку, а також реєстрацію таких потенціалів у ССК здійснювали протягом перших 24 год після останньої ін'єкції бікукуліну. Відведення потенціалів від зони СА1 гіпокампа (60 хв на добу) проводили протягом двох діб перед індукцією епілептичного статусу (ЕС), а потім кожну добу протягом 14-ти діб. З метою відстеження судомних епілептичних нападів відеомоніторинг тварин проводили у режимі реального часу під час ЕЕГ-реєстрацій, а також протягом одного тижня (12 год на добу) через 3,0 - 3,5 місяця після індукції ЕС.

Імуногістохімічні дослідження проводили на напівтонких зрізах (30-50 мкм) дорсальної частини гіпокампа з використанням конфокальної мікроскопії та первинних антитіл: анти-тромбін-НС поліклональних антитіл кози (1:100); поліклональних антитіл кролика щодо PAR1(1:100); анти-NeuN-моноклональних антитіл (клон A60, 1:1000); моноклональних антитіл щодо гліального фібрилярного кислого білка (GFAP) (клон GA5, 1:1000); та вторинних антитіл: Alexa 568 (1:800), Alexa 647 (1:800) і Alexa 488 (1:800). Для забарвлення ядер клітин препарати додатково обробляли розчином DAPI (4,6-діамідіно-2-феніліндол). Візуалізацію нервових клітин пірамідного шару зони CA1 гіпокампа здійснювали за допомогою світлової мікроскопії та тіонінового забарвлення.

Дослідження поведінкових реакцій тварин здійснювали з використанням наступних тестів: «відкрита арена» (оцінка локомоторної активності і рівня тривожності), тест на поведінкову гнучкість (оцінка вмотивованості і поведінкової гнучкості), «затриманий-невідповідний-до-проби (ЗНВП)»-тест (оцінка уваги та ПФК-залежного компонента оперативної пам'яті) і тест «перегородка» (оцінка соціальної поведінки тварин).

Для обробки та аналізу числових результатів використовували програми Clampfit 9 (Axon Instruments, США), MiniAnalysis 6.0.7 (Synaptosoft, США), Origin 7.5 (OriginLab, США), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, США). У перебігу аналізу вибірок визначали середнє, похибки середнього. Для визначення статистичної вірогідності міжгрупових розбіжностей у більшості випадків використовували двосторонній тест Фішера. Двобічний *t*-тест Ст'юдента та ANOVA-тест використовували для визначення достовірності різниці щодо експериментальних груп, котрі відповідали нормальному розподілу. Вірогідними вважались розбіжності при $P < 0,05$. Числові дані наводяться нижче, як середнє \pm похибка середнього.

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз літературних даних показав, що неонатальні рекурентні судомні напади, спровоковані інгаляцією ФТ, призводять до підвищення збудливості нервових мереж та порушення поведінкових і когнітивних реакцій, пов'язаних з функціонуванням гіпокампа (Huang et al., 1999; Karnam et al., 2009; de Rogalski Landrot et al., 2001). Для дослідження клітинних механізмів, що можуть лежати в основі цих змін, в першій серії експериментів визначали вплив повторюваних неонатальних нападів, викликаних інгаляцією ФТ, на розвиток гальмівної та збуджувальної синаптичної передачі в пірамідних нейронах гіпокампа щурів. В дослідженнях використовували щурів контрольної ($n = 35$) і ФТ груп (дослідження розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі: $n = 24$, ініціація судом з 1-ї по 10-у добу після народження, 5 разів на добу, інші дослідження: $n = 16$; ініціація судомних епілептичних нападів з 1-ї по 5-у добу після народження, 5 разів на добу, загалом виникнення 25-ти судом).

Вплив неонатальних рекурентних судомних епілептичних нападів на синаптичну активність нейронів гіпокампа. Спонтанні постсинаптичні струми (сПСС) відводили від нейронів зони СА3 гіпокампа 8-10- та 15-17-денних щурів контрольної групи та щурів з попередніми повторюваними неонатальними судомними нападами. В табл. 1 наведено узагальнені результати аналізу вікових змін та впливу неонатальних судом на характеристики сГПСС і сЗПСС в нейронах контрольної та ФТ-груп. Частота сГПСС та АМПА- і НМДА-сЗПСС, а також амплітуда АМПА- і НМДА-сЗПСС значно збільшувались протягом дослідженого

Таблиця 1. Вплив неонатальних судомних епілептичних нападів на характеристики спонтанних постсинаптичних струмів (сПСС) в пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа

Вік (доба)	сПСС	Частота (с ⁻¹)		Амплітуда (пА)		Час наростання (мс)		Напівширина (мс)	
		контр	ФТ	контр	ФТ	контр	ФТ	контр	ФТ
8-10	ГАМК _A	3.1 ± 0.7 (17)	2.7 ± 0.4 (21)	49.8 ± 8.1	48.2 ± 7.4	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	9.3 ± 0.3	9.6 ± 0.7
	АМПА	0.7 ± 0.1 (24)	0.6 ± 0.1 (22)	30.7 ± 2.4	35.8 ± 2.6	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2
	НМДА	0.4 ± 0.1 (24)	0.7 ± 0.1 (22)	30.4 ± 2.3	35.9 ± 2.3	10.2 ± 0.6	10.8 ± 0.5	56.5 ± 4.8	63.2 ± 5.3
15-17	ГАМК _A	7.0 ± 0.6 (21)	6.5 ± 0.6 (25)	70.6 ± 6.7	51.8 ± 5.4***	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	10.2 ± 0.4	9.7 ± 0.4
	АМПА	1.4 ± 0.2 (22)	1.8 ± 0.3 (22)	47.1 ± 3.6	50.9 ± 3.6	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.1
	НМДА	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.3	50.1 ± 2.6	47.8 ± 3.8	4.3 ± 0.3	5.1 ± 0.5	22.9 ± 1.8	26.8 ± 2.9
<i>Кількість реєстрацій в контрольній (контр) і дослідній (ФТ) групах представлено в дужках, ***P < 0,005.</i>									

періоду постнатального розвитку без істотних відмінностей у цих показниках між досліджуваними групами. Амплітуда сГПСС у нейронах гіпокампа 15-17-денних щурів ФТ-групи була значно меншою порівняно з такою в контрольній групі відповідного віку. Усереднені значення часу наростання та напівширини сГПСС та АМПА-сЗПСС в обох групах не змінювались протягом дослідженого періоду. Час наростання та напівширина сЗПСС, викликаних активацією НМДА-рецепторів, значно зменшувалися протягом другого та третього тижня життя в обох досліджених групах (час наростання $P < 0,05$; напівширина $P < 0,005$). Відомо, що зміни в кінетиці НМДА-сЗПСС опосередковані зміною складу субодиниць НМДА-рецепторів під час раннього постнатального розвитку (Monyer et al., 1994). Аналіз усереднених даних показав, що кінетичні характеристики сГПСС та сЗПСС у досліджуваних групах не розрізнялись.

У дорослому мозку ГАМК є основним гальмівним нейромедіатором, що відіграє ключову роль у генерації фізіологічних патернів активності і запобіганні виникненню та поширенню пароксизмальної активності (Freund et al., 1996). Тим не менш, під час раннього розвитку активація ГАМК_A-рецепторів може зумовлювати подвійну (збуджувальну та гальмівну) дію в залежності від контексту активації таких рецепторів (Ben-Ari et al., 2002; Khazipov et al., 2004; Isaev et al., 2007). Ця

властивість гальмівної синаптичної передачі пов'язана з тим, що в незрілому мозку внутрішньоклітинна концентрація іонів хлору є відносно вищою, ніж у зрілому мозку, у зв'язку з розвитком та змінами в експресії різноманітних транспортерів, залучених у регуляцію внутрішньоклітинного Cl^- (Rivera et al., 1999). Для дослідження впливу неонатальних нападів на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі використовували неінвазивний метод позаклітинного відведення ПД від десятківсотень нейронів, розташованих у безпосередньої близькості від відповідного електрода. Для активації ГАМК_A-рецепторів застосовували селективний агоніст цих рецепторів, ізогувацин. Попередні дослідження (Khazipov et al., 2004) показали, що ізогувацин викликає короткочасне підвищення активності нервових мереж у зрізах гіпокампа новонароджених щурів та зменшує активність таких мереж в зрізах гіпокампа дорослих щурів.

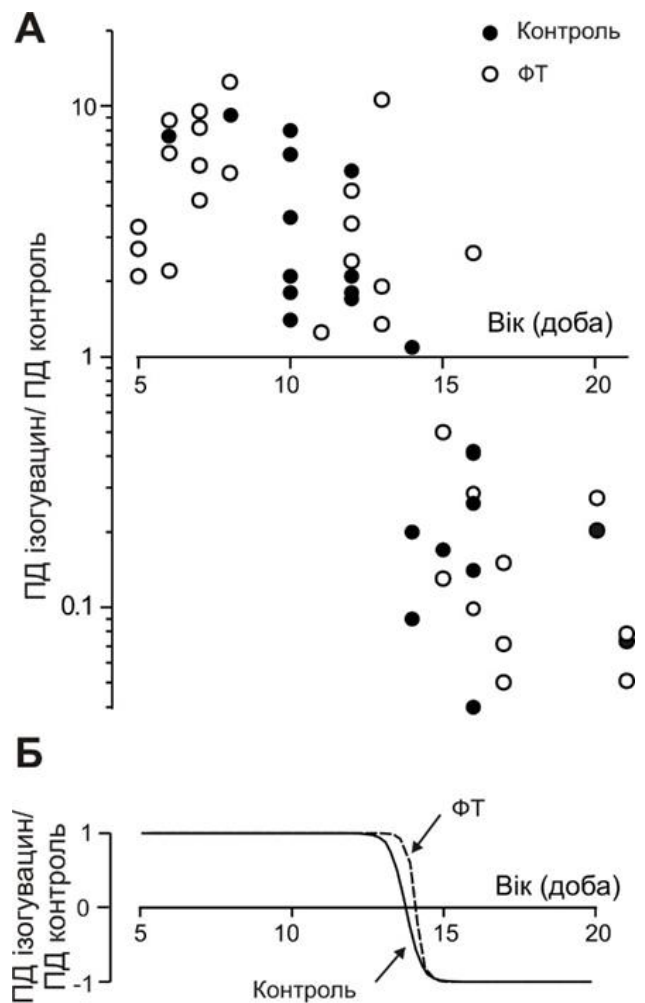


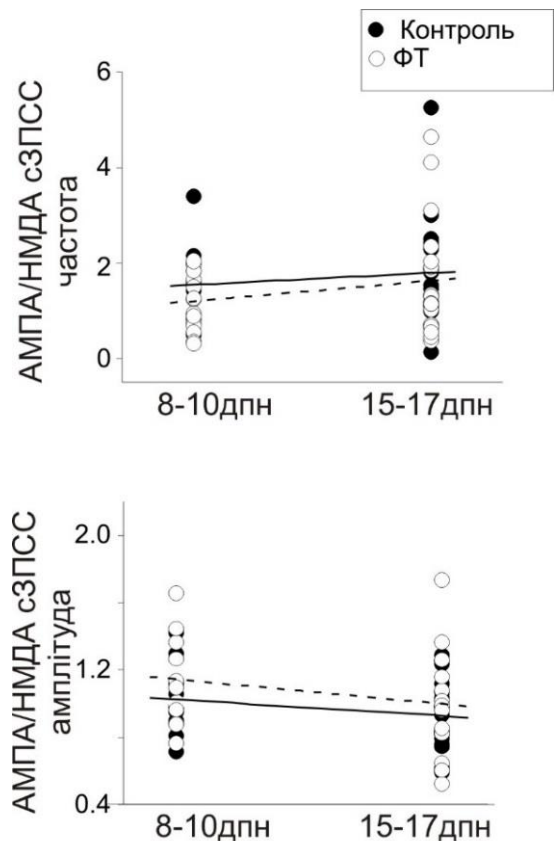
Рис. 1. Вплив неонатальних судом на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

На рис. 1А представлено результати дослідів вікової залежності впливу активації ГАМК_A-рецепторів на максимальну частоту ПД у відповідь на аплікацію ізогувацину, нормовану щодо частоти ПД перед аплікацією цього агоніста. Вік, при якому в половині зрізів ізогувацин викликав збільшення частоти ПД, а в іншій половині – зменшення цього показника на рис. 1Б визначено як середнє значення кривої Больцмана. В контрольних зрізах це значення становило в середньому $13,5 \pm 0,4$ діб після народження тварин ($n = 19$). В ФТ-групі середнє значення кривої Больцмана становило $14,1 \pm 0,7$ діб ($n = 24$, $P = 0,8$). Отже, неонатальні напади не впливали істотно на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Відомо, що в період раннього постнатального розвитку в більшості глутаматергічних синапсів синаптична передача опосередкована активацією НМДА-рецепторів (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995; Durand et al., 1996). Формування функціональних АМПА-рецепторів відбувається пізніше та регулюється механізмами залежними та незалежними від активності нервових мереж (Gros et al., 2003; Liao et al., 1995). В наступній серії експериментів ми досліджували вплив

неонатальних нападів на розвиток співвідношення АМПА- та НМДА-рецепторів. Для кожної окремої клітини оцінювали відношення частоти і амплітуди сЗПСС, викликаних активацією АМПА-рецепторів, до частоти і амплітуди сЗПСС, викликаних активацією НМДА-рецепторів. На рис. 2 показано, що ці показники не змінювались протягом другого та третього тижнів постнатального розвитку як у контрольній групі щурів, так і у щурів ФТ-групи. У досліджуваних групах ці показники не розрізнялися.

Рис. 2. Вплив неонатальних судомних нападів на розвиток співвідношення АМПА- та НМДА-рецепторів в нейронах гіпокампа (дні-доба після народження).



Отже, результати наших дослідів показали, що неонатальні судоми призводять до вибіркового пригнічення амплітуди ГАМК-ергічних синаптичних відповідей в нейронах гіпокампа. Це свідчить про наявність змін балансу збудження і гальмування в гіпокампі у тварин з історією судом в період раннього розвитку і може бути підґрунтям підвищеної чутливості цієї ділянки мозку у таких щурів до дії проепілептичних агентів, що було описано в попередніх роботах (Holmes, 1998).

Вплив неонатальних судом на активність нейронів ССК щурів. Як зазначалось вище, епілептичні напади в неонатальному віці зумовлюють високий ризик появи небезпечних неврологічних ускладнень у подальшому житті. Генез ранніх нападів, як правило, є неокортексальним, проте наші уявлення про наслідки неонатальних епілептичних нападів на функції неокортекса залишаються в значній мірі обмеженими. В наступній серії експериментів досліджували довготривалі наслідки епілептичних судом, викликаних інгаляцією ФТ у щурів в неонатальний період, на активність нейронів ССК. В експериментах використовували щурів контрольної ($n = 63$) і ФТ ($n = 74$) груп. Вплив неонатальних судомних нападів на синаптичну пластичність досліджували з ініціацією судом з 1-ї по 15-у добу після народження, 5 разів на добу, загалом 75 судом. Інші дослідження проводили на тваринах з ініціацією судом з 1-ї по 10-у добу після народження, 5-6 разів на добу, загалом 58-60 судом.

Вплив неонатальних судом на чутливість ССК щурів до аплікації проепілептичних агентів. Відведення потенціалів здійснювали позаклітинно від шарів 2/3 або 5/6 ССК дорослих щурів. Результати відведення від зрізів мозку щурів, які зазнали неонатальних судом порівнювали з даними, отриманими від

контрольних тварин аналогічного віку. На зрізах мозку тварин контрольної і ФТ-груп спонтанної ЕФА не було виявлено. Аплікації 4-амінопіридину або розчину з низькою концентрацією магнію також не призводили до виникнення ЕФА в зрізах мозку щурів обох досліджених груп. Аплікація блокатора гальмівної синаптичної передачі бікукуліну (5 мкМ) спричиняла ЕФА в ССК в чотирьох з 11 контрольних зрізів (36,4 %). На зрізах мозку щурів ФТ-групи спостерігалася значно вища вірогідність реєстрації ЕФА в ССК (78 %, $n = 9$). Аплікація іншого блокатора гальмівної синаптичної передачі габазіну (10 мкМ) призводила до виникнення інтеріктальноподібної ЕФА в шарах 2/3 та 5/6 ССК контрольних тварин та щурів ФТ-групи у вікових інтервалах 20-30 та 60-80 днів після народження. Виникнення іктальноподібної активності спостерігалось лише в одному зрізі мозку ізольованому у щура ФТ-групи.

На рис. 3 показано, що вірогідність виникнення ЕФА в ССК щурів ФТ-групи у відповідь на аплікацію габазіну була достовірно вищою ніж у зрізах тварин контрольної групи. В обох досліджуваних групах ймовірність виникнення ЕФА знижувалася з віком тварин, але різниця між ймовірностями виникнення ЕФА в цих групах з віком тварин підвищувалася (рис. 3). Аналіз усереднених значень амплітуди і частоти ЕФА, а також процесу поширення габазін-індукованої ЕФА в шарах 2/3 та 5/6 ССК не виявив істотної міжгрупової різниці цих характеристик ЕФА. В експериментах з одночасним відведенням ПД від поодиноких інтернейронів або пірамідних нейронів з використанням методу петч-клемп в конфігурації «cell-attached» та позаклітинних потенціалів поля в шарах 2/3 ССК ми не знайшли міжгрупових відмінностей у внеску згаданих типів нейронів в індукцію та підтримання ЕФА.

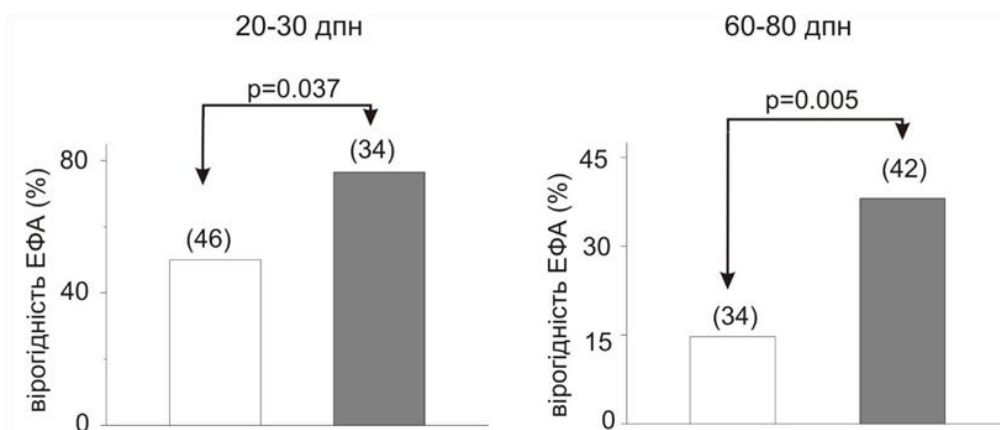


Рис. 3. Вплив неонатальних судомних нападів на вірогідність виникнення ЕФА в шарах 2/3 ССК у відповідь на аплікацію 10 мкМ габазіну на зрізи мозку 20-30- і 60-

80-денних щурів контрольної (білий) та ФТ (сірий) груп. Кількість зрізів, використаних для аналізу, вказана в дужках.

Отримані результати вказують на те, що повторювані судомні напади, спровоковані інгаляцією ФТ впродовж перших днів постнатального розвитку, призводять до хронічного підвищення вірогідності виникнення ЕФА в ССК.

Вплив повторюваних неонатальних судом на гальмівну і збуджувальну синаптичну передачу в пірамідних нейронах ССК.

В табл. 2 наведено результати аналізу впливу неонатальних судом на амплітуду, частоту і кінетичні характеристики сГПСС і мГПСС в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК 20-30- та 60-80-денних щурів контрольної та ФТ-груп.

Таблиця 2. Вплив неонатальних судом на характеристики ГПСС в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК.

Вік (доба)	ГПСС	Частота (с ⁻¹)		Амплітуда (пА)		Час наростання (мс)		Напівширина (мс)	
		контр	ФТ	контр	ФТ	контр	ФТ	контр	ФТ
20-30	сГПСС	36.9 ± 0.5 (14)	36.6 ± 0.7 (15)	87.9 ± 0.9	64.9 ± 0.5**	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.1	8.4 ± 0.4	7.7 ± 0.6
	мГПСС	7.0 ± 0.1 (16)	6.1 ± 0.1* (20)	35.8 ± 0.5	36.9 ± 0.5	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	10.1 ± 0.8	8.6 ± 0.6
60-80	сГПСС	5.3 ± 0.1 (16)	5.2 ± 0.1 (18)	51.5 ± 0.7	47.7 ± 0.6**	2.9 ± 0.5	2.2 ± 0.4	15.1 ± 1.9	16.4 ± 2.3
	мГПСС	2.8 ± 0.1 (12)	2.4 ± 0.1* (14)	18.2 ± 0.1	18.5 ± 0.2	-	-	-	-

*В дужках кількість реєстрацій в контрольній (контр) і дослідній (ФТ) групах
*P<0,05, **P<0,01.*

Значно нижчі значення амплітуди сГПСС без змін інших характеристик сГПСС спостерігали у ФТ-групі порівняно з величинами зареєстрованими в контрольній групі. Частота мГПСС статистично вірогідно розрізнялася між групами. Амплітуда, час наростання та напівширина мГПСС у досліджуваних групах не демонстрували вірогідних різниць.

В табл. 3 представлено дані щодо впливу неонатальних судом на збуджувальну синаптичну передачу в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК. сЗПСС вимірювали у зрізах мозку 60-80-денних щурів контрольної та ФТ груп при підтримуваному потенціалі -80 мВ в умовах присутності в позаклітинному розчині блокатора гальмівної синаптичної передачі габазіну (10 мкМ). Середні амплітуда і частота сЗПСС, опосередкованих активацією АМПА- та НМДА- рецепторів, були значно більшими в нейронах ФТ-групи порівняно з контролем. Аналіз характеристик мЗПСС, опосередкованих активацією АМПА- та НМДА- рецепторів вказав на статистично вірогідно вищі значення частоти мЗПСС без змін в амплітуді цих струмів. У присутності в позаклітинному розчині блокатора НМДА рецепторів D-APV (50 мкМ) амплітуда і частота сЗПСС і мЗПСС, опосередкована активацією АМПА-рецепторів, у досліджуваних групах не розрізнялася.

Таким чином, представлені дані вказують на хронічне зниження ефективності гальмівної синаптичної передачі в нейронах шарів 2/3 ССК у щурів з повторюваними неонатальними судомними епілептичними нападами. Дані щодо

впливу таких судом на збуджувальну синаптичну передачу свідчать, що на відміну від ситуації в нейронах гіпокампа, описаному у попередньому розділі, повторювані

Таблиця 3. Вплив неонатальних судом на характеристики ЗПСС в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК					
ЗПСС	Рецептори	Частота (с ⁻¹)		Амплітуда (пА)	
		контр	ФТ	контр	ФТ
сЗПСС	АМПА+НМДА	2.1 ± 0.2 (8)	2.7 ± 0.1**(9)	33.0 ± 0.6	39.9 ± 0.7**
	АМПА	1,7 ± 0,2 (13)	1.8 ± 0.3 (15)	31,8 ± 0,5	31.5 ± 1.2
мЗПСС	АМПА+НМДА	1.9 ± 0.2 (21)	2.3 ± 0.2**(14)	16.1 ± 0.2	16.3 ± 0.2
	АМПА	1.8 ± 0.2 (10)	1.9 ± 0.2 (14)	15.3 ± 0.2	15.2 ± 0.1
<i>В дужках кількість реєстрацій в контрольній (контр) і дослідній (ФТ) групах. **P<0,01.</i>					

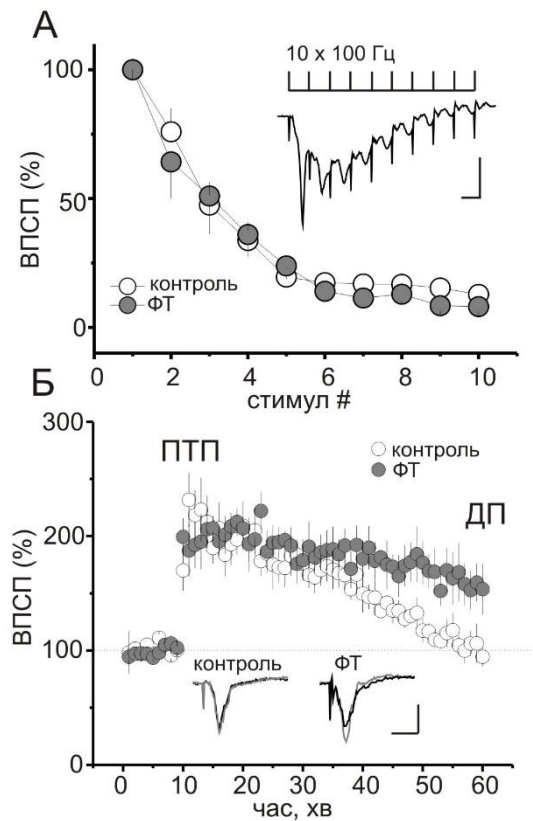
судоми в період раннього розвитку призводять до хронічних змін збуджувальної синаптичної передачі в пірамідних

нейронах шарів 2/3 ССК. Експерименти з додаванням D-APV в позаклітинний розчин вказують на внесок НМДА-рецепторів у різницю між характеристиками ЗПСС у досліджуваних групах. Зміни у частоті мГПСС і мЗПСС в нейронах ССК головного мозку щурів з історією неонатальних судомних нападів порівняно з контролем, швидше за все, віддзеркалюють дефекти впресинаптичній ланці синаптичної передачі.

Вплив неонатальних епілептичних нападів на синаптичну пластичність у ССК щурів. Підвищення збудливості нервових мереж і хронічні зміни балансу збудження / гальмування синаптичної передачі в ССК, описані в попередньому розділі, можуть впливати на такі важливі процеси в цій ділянці головного мозку, як синаптична пластичність. В наступній серії експериментів ми досліджували вплив неонатальних епілептичних нападів, спровокованих інгаляцією ФТ, на феномен синаптичної пластичності в цій зоні кори. В експериментах використовували протокол високочастотної стимуляції шару 4 ССК в зрізах мозку тварин контрольної та ФТ-груп, описаний раніше (Diamond et al., 1988).

Після подразнення шару 4 ССК, ВПСП відводили від шарів 2/3 відповідного стовпчика ССК протягом однієї години. Встановлено, що судомні напади, індуковані інгаляцією ФТ в межах неонатального періоду, не впливали на депресію ВПСП впродовж високочастотної стимуляції (рис. 4А) та посттетанічну потенціацію (ПТП) таких ВПСП (рис. 4Б). В той же час такі напади зумовлювали хронічне підвищення довготривалої потенціації (ДП) ВПСП, індукованої високочастотною стимуляцією (рис. 4Б).

Рис. 4. Вплив неонатальних судом на синаптичну пластичність у ССК. (А) Динаміка змін амплітуди ВПСР впродовж високочастотної стимуляції. (Б) Синаптична пластичність у відповідь на високочастотну стимуляцію. Нормовані амплітуди ВПСР до і після стимуляції. Приклади оригінальних записів ВПСР у шарах 2/3 ССК до (чорний) і через 50 хв після стимуляції (сірий). Шкала 0,3 мВ, 10 мс.



Вплив неонатальних судом на активність нейронів мПФК щурів. В попередніх дослідках було показано, що наявність неонатальних нападів має істотний вплив на збуджувальну та гальмівну синаптичну передачу в гіпокампі і ССК головного мозку щурів. Ще однією важливою ділянкою кори, де розвертаються ефекти стресової ситуації є ПФК, яка залучена у реалізацію численних функцій: регуляцію емоцій, процеси планування, прийняття рішень, формування оперативної пам'яті, уваги, контроль соціальної поведінки і міжіндивідуальних взаємодій.

Розвиток ПФК у перебігу онтогенеза є досить тривалим. Так у людини дозрівання ПФК триває до 20-річного віку (Toga et al., 2006; Paus et al., 2005; Bunge et al., 2007; Jernigan et al., 1991), що співвідноситься з тим, що вищі психічні функції, безпосередньо пов'язані з роботою ПФК, досягають свого повного розвитку приблизно в цьому віці (Fuster et al., 2008). Якщо взяти до уваги винятково важливу роль ПФК в організації психічної діяльності людини та тривалий онтогенез цієї ділянки порівняно з іншими структурами мозку, видається вірогідним, що ЕФА в період раннього розвитку може спричинити негативний вплив на розвиток функції цієї структури і, як наслідок, зумовити появу когнітивних та поведінкових порушень в подальшому житті. Це припущення підтверджується попередніми дослідженнями. Так, з використанням ФТ-моделі неонатальних судом було показано, що епілептичні напади в період раннього розвитку призводять до різноманітних тривалих змін ПФК-залежних поведінкових феноменів (Kleen et al., 2011). Клітинні механізми негативного впливу неонатальних судом на функцію ПФК поки залишаються в значній мірі невивченими. Тому в наступній серії експериментів ми досліджували вплив неонатальних судомних нападів у щурів на активність, пов'язану з функціонуванням ПФК. В дослідках використовували щурів контрольної і ФТ груп (ініціація судом з 6-ї по 16-у добу після народження, 5 - 6 разів на добу, загалом 62 - 65 судом).

Вплив неонатальних судомних нападів на синаптичну передачу в нейронах мПФК. Вплив неонатальних судомних нападів на синаптичну передачу вивчали в

пірамідних нейронах шару 5 мПФК щурів контрольної і ФТ-груп віком 47-60 діб після народження. Характеристики мГПСС реєстрували при ПП 0 мВ в умовах присутності ТТХ в позаклітинному розчині. Реєстрації мЗПСС проводили при ПП - 65 мВ у присутності ТТХ і блокатора гальмівної синаптичної передачі, габазіну.

В табл. 4 представлено усереднені дані ефекту ФТ-індукованих нападів на параметри мГПСС і мЗПСС. Спостерігалось статистично достовірне зниження частоти мГПСС (27,3 %) в нейронах мПФК ФТ-групи у порівнянні з контролем без змін амплітуди і кінетичних характеристик цих струмів. Порівняльний аналіз характеристик мЗПСС у пірамідних нейронах шару 5 мПФК контрольних та ФТ щурів не виявив різниці жодних з досліджуваних параметрів мЗПСС між вищезгаданими групами. Отже, неонатальні напади не впливають істотно на глутаматергічну синаптичну передачу в цих нейронах (табл. 4).

Таблиця 4. Вплив неонатальних судом на характеристики мініатюрних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах шару 5 мПФК								
мПСС	Частота (с ⁻¹)		Амплітуда (пА)		Час наростання (мс)		Напівширина (мс)	
	контр	ФТ	контр	ФТ	контр	ФТ	контр	ФТ
мГПСС	2.2 ± 0.1 (14)	1.6 ± 0.5 (16)*	16.7 ± 3.2	15.2 ± 1.5	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	10.9 ± 0.4	10.4 ± 0.6
мЗПСС	1.3 ± 0.1 (11)	1.3 ± 0.1 (10)	21.6 ± 2.2	19.9 ± 2.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	7.2 ± 0.8	8.0 ± 0.5
<i>В дужках кількість реєстрацій використаних для аналізу в контрольній (контр) і дослідній (ФТ) групах. *P < 0,05</i>								

Пірамідні нейрони шару 5 мПФК є основними вихідними нейронами мПФК, що мають проєкції як на інші клітини кори, так і на нейрони низки підкіркових структур. Підвищення активності пірамідних нейронів ПФК, котра спостерігається під час фази затримки при виконанні поведінкових тестів, вказує на те, що дані нейрони можуть бути залучені у кодування інформації в оперативній пам'яті (Goldman-Rakic et al., 1995). Наведені в даному розділі дані показують, що повторювані судомні напади під час раннього розвитку призводять до стійкого зменшення частоти гальмівних синаптичних відповідей в пірамідних нейронах шару 5 мПФК. Наслідком цього можуть бути хронічні зміни у синаптичній пластичності і балансі збудження/гальмування в цій ділянці мозку. Такі зрушення можуть бути підґрунтям модифікацій ПФК-залежних поведінкових реакцій, описаних з використанням ФТ-моделі в попередніх публікаціях (Kleen et al., 2011). В наступній серії експериментів ми досліджували вплив неонатальних судом на короткотривалу синаптичну пластичність у мПФК.

Вплив неонатальних судом на короткотривалу синаптичну пластичність у мПФК. Відомо, що апікальні дендрити пірамідних клітин шару 5 мПФК отримують велику кількість збуджувальних входів від пірамідних клітин шарів 2/3 (Kuroda et al., 1998, 2004). Показано також, що нейрони шару 5 іннервують сусідні нейрони,

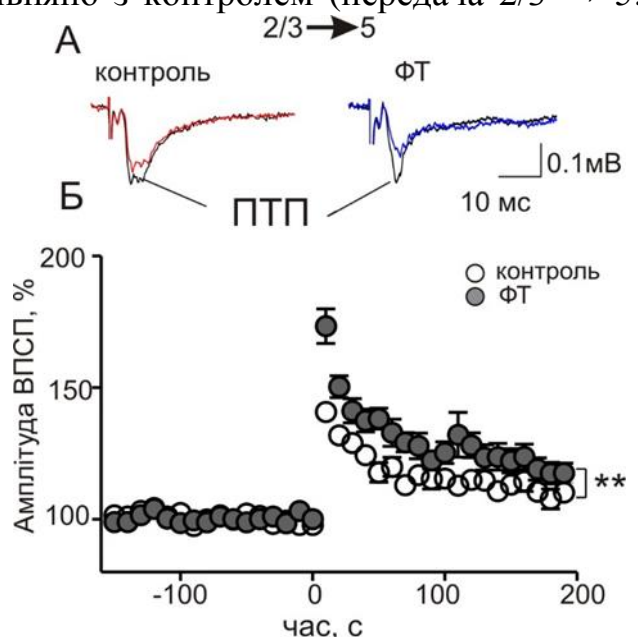
формуючи локальну мережу взаємопов'язаних пірамідних нейронів у глибоких шарах неокортекса (Kritzer et al., 1995). В наступній серії експериментів було досліджено вплив повторюваних неонатальних нападів на амплітуду і синаптичну пластичність ВПСР при передачі між шарами 2/3 і 5, а також в межах шару 5 мПФК.

Стимуляція шарів 2/3 або 5 мПФК викликала ВПСР в шарі 5 цієї ділянки кори у всіх зрізах мозку тварин контрольної і ФТ-груп. Середня амплітуда ВПСР становила в контрольній групі $172,6 \pm 14,2$ мкВ ($n = 40$) при передачі між шарами 2/3 і 5 і $159,2 \pm 14,2$ мкВ ($n = 32$) в шару 5. У ФТ-групі відповідні значення дорівнювали $163,1 \pm 10,6$ мкВ ($n = 36$) та $167,6 \pm 14,2$ мкВ ($n = 30$). Амплітуда ВПСР у досліджуваних групах не розрізнялась вірогідно ($P > 0,05$ у всіх випадках).

Для дослідження впливу повторюваних неонатальних нападів на найкоротшу форму синаптичної пластичності – фасилітацію – використовували протокол парної стимуляції. Встановлено, що викликане парною стимуляцією збільшення амплітуди другого ВПСР не розрізнялося в досліджуваних групах як при стимуляції шарів 2/3 (контроль $n = 53$; ФТ-група $n = 31$, $P > 0,05$), так і шару 5 мПФК (контроль $n = 40$, ФТ-група $n = 24$, $P > 0,05$).

В наступній серії експериментів було досліджено вплив неонатальних нападів на посттетаничну потенціацію (ПТП) ВПСР при синаптичній передачі в шарах 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК. Відомо, що під час затримки оперативної пам'яті нейрони мПФК отримують сигнали від сусідніх нейронів у діапазоні частоти 20 – 60 с^{-1} . Для імітації таких умов в наших дослідах для індукції короткотривалої потенціації ВПСР в шарі 5 мПФК використовували коротку тетаничну стимуляцію шарів 2/3 або 5 (15 прямокутних поштовхів стимулу тривалістю 0,1 с і частотою 50 с^{-1}) (Fénelon et al., 2011). Така високочастотна стимуляція викликала короткотривале (4 – 10 хв) збільшення амплітуд ВПСР в усіх досліджуваних групах. Рівень потенціації постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК на подразнення шарів 2/3 або 5 був істотно більшим у ФТ-групі порівняно з контролем (передача 2/3 \rightarrow 5: контроль $n = 42$, ФТ-група $n = 32$, $P < 0,01$, рис. 5; передача 5 \rightarrow 5: контроль $n = 31$, ФТ-група $n = 26$, $P < 0,01$).

Рис. 5. Вплив неонатальних епілептичних нападів на посттетаничну потенціацію (ПТП) ВПСР у мПФК. (А) Приклади оригінальних записів ВПСР у шарі 5 мПФК до і після високочастотної стимуляції шарів 2/3. (Б) Нормовані амплітуди ВПСР до і після стимуляції. ** $P < 0,01$.



Виміри амплітуд ВПСР в синапсах 2/3 \rightarrow 5 впродовж високочастотної стимуляції вказали на статистично достовірне зниження рівня потенціації ВПСР впродовж

періоду стимуляції у ФТ-групі ($n = 29$) порівняно з таким у контрольній групі ($n = 49$, $P < 0,01$). В синапсах $5 \rightarrow 5$ збільшення амплітуди ВПСР впродовж стимуляції не демонструвало міжгрупової різниці ($P = 0,4$).

Отже, показано, що наявність неонатальних судомних нападів у ранньому віці призводить до суттєвих змін короткотривалої синаптичної пластичності в синапсах нейронів мПФК, що може бути підґрунтям змін ПФК-залежних поведінкових реакцій у тварин з історією неонатальних судом. Судомні напади, спровоковані інгаляцією ФТ, є генералізованими, тобто їх генерація охоплює весь мозок. Тому питання, чи є описані хронічні зміни функціонування мПФК результатом змін у проекціях до цієї ділянки мозку (наприклад, у гіпокампальних проекціях), або такі зміни визначені модифікаціями локальної мережевої активності в мПФК, залишається значною мірою не визначеним. У наступній серії експериментів ми розробили експериментальну модель повторюваної ЕФА, локалізованої в межах ПФК, та досліджували тривалі наслідки індукції такої локальної ЕФА на синаптичну пластичність і поведінкові феномени.

Вплив повторюваної ЕФА, локалізованої в межах ПФК, на синаптичну пластичність в мПФК і поведінкові феномени.

Модель локальної ЕФА в ПФК щурів. Для моделювання локальної повторюваної ЕФА в період раннього розвитку проводили повторювані мікроін'єкції бікукуліну (БК) в ПФК молодих щурів. Кількість щурів у контрольній та БК групах складала, відповідно, 12 та 13 (рис. 6).

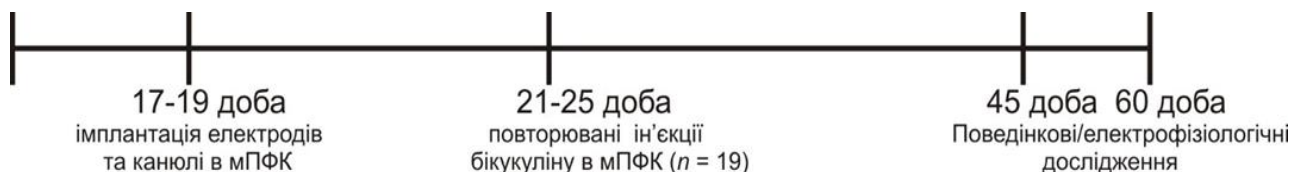
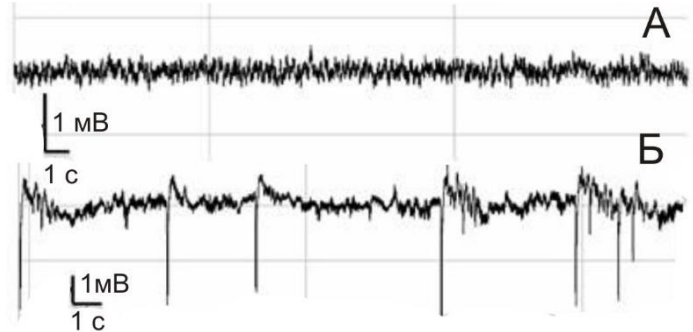


Рис. 6. Схема експерименту.

Ювенільним щурам (віком 17-19 діб після народження) імплантували систему ЕЕГ-електрод/канюля в ПФК. В окремій серії експериментів одночасно імплантували згадану систему в праву ПФК та ЕЕГ-електрод в ліву ПФК або ССК. Починаючи з 2-4-ї доби після операції щурам БК-групи починали вводити інтрацеребрально бікукулін (0,5 мкл, розчин 200 мкМ) 3-4 рази на добу (загалом 19 ін'єкцій). Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі. Вірогідність появи поведінкових судом і ЕФА в корі вимірювали з використанням ЕЕГ-реєстрації і відеомоніторингу відразу після кожної ін'єкції протягом 30 хв. В контрольній групі тварин, які отримували ін'єкції фізіологічного розчину, судомних нападів і електрографічних проявів ЕФА не було виявлено (рис. 7А).

У двох з 13-ти тварин БК-групи була зареєстрована іктальна активність, яка звичайно тривала менше ніж 15 с і не супроводжувалася видимими змінами у поведінці тварин. Відразу після ін'єкції БК у всіх тварин БК-групи спостерігали інтеріктальну активність. Інтеріктальні розряди мали вигляд поодиноких або множинних спайків (рис. 7Б).

Рис. 7. Епілептиформна активність, спровокована локальними ін'єкціями бікукуліну в ПФК. Приклади позаклітинного відведення потенціалів у ПФК щурів контрольної (А) і БК (Б) груп.

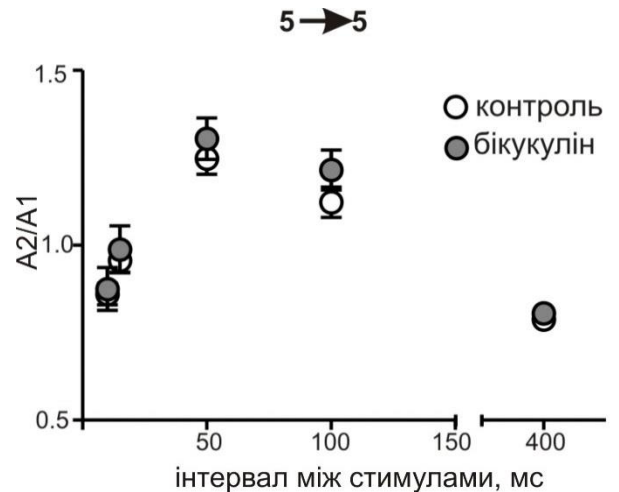


Аналіз частоти інтеріктальних розрядів показав, що вона була вищою в перші 15-30 с після ін'єкції БК із подальшим поступовим спадом. Така ЕФА зникла протягом 20-25 хв після ін'єкції БК у тварин в період неспання, але відновлювалася під час сну із частотою приблизно $0,2 \text{ с}^{-1}$. Довготривалі (72 год) реєстрації ЕЕГ показали, що під час сну ЕФА можна було спостерігати протягом приблизно 24 год після останньої ін'єкції БК. Виявилося також, що у трьох тварин БК-групи ЕФА спостерігалася під час повільно-хвильового сну. Поширення ЕФА у контрлатеральну півкулю реєстрували в експериментах, де унілатеральні ін'єкції БК проводили протягом білатеральної реєстрації потенціалів. Ми не спостерігали ЕФА на записах ЕЕГ, відведених від ССК, що свідчить про суто локальний характер ефекту ін'єкцій БК. Через два тижні після останньої ін'єкції БК наявності ЕФА на реєстраціях ЕЕГ не спостерігалось.

Вплив локальної ЕФА в період раннього розвитку на синаптичну пластичність у мПФК. Вплив повторюваної ЕФА, індукованої в межах ПФК, на амплітуду ВПСР і феномен синаптичної пластичності при передачі між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК досліджували на щурах контрольної та БК груп віком 45-60 днів після народження. Середня амплітуда ВПСР у контрольній групі становила $367,7 \pm 31,5 \text{ мкВ}$ ($n = 24$) в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ та $425,9 \pm 40,3 \text{ мкВ}$ ($n = 23$) в синапсах $5 \rightarrow 5$. В БК-групі щурів середнє значення даного показника дорівнювало $342,6 \pm 14,7 \text{ мкВ}$ ($n = 25$) в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ та $379,6 \pm 27,4 \text{ мкВ}$ ($n = 22$) в синапсах $5 \rightarrow 5$. Аналіз отриманих даних показав, що середні значення амплітуд ВПСР у досліджуваних групах вірогідно не розрізнялися ($P > 0,05$ в усіх випадках). Синаптична пластичність, викликана парною стимуляцією, у досліджуваних групах також не розрізнялася (в синапсах $2/3 \rightarrow 5$: контроль $n = 22$, БК- група $n = 22$, $P > 0,05$; в синапсах $5 \rightarrow 5$: контроль $n = 23$, БК- група $n = 23$, $P > 0,05$, рис. 8). Синаптична пластичність ВПСР впродовж високочастотної стимуляції (15 стимулів частотою 50 с^{-1}) також не демонструвала істотних міжгрупових розбіжностей в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ (контроль $n = 24$, БК-група $n = 25$, $P > 0,05$) та в синапсах $5 \rightarrow 5$ (контроль $n = 23$, БК-група $n = 22$, $P > 0,05$). Інтенсивність потенціалізації постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК у відповідь на високочастотну стимуляцію шарів 2/3 або 5 була

істотно більшою у БК групі порівняно з таким у контролі (в синапсах 2/3 → 5: контроль $n = 42$, БК-група $n = 32$, $P < 0,01$; в синапсах 5 → 5: контроль $n = 31$, БК-група $n = 26$, $P < 0,01$). Збільшення ПТП синаптичних відповідей в БК-групі було значним в мПФК обох півкуль, як іпсі-, так і контрлатерально щодо ін'єкцій бікукуліну.

Рис. 8. Епілептиформна активність, індукована інтрацеребральними ін'єкціями бікукуліну не впливає на синаптичну пластичність, викликану парною стимуляцією у мПФК. Залежність співвідношення амплітуди ВПСП викликаного другим стимулом (A2) до амплітуди ВПСП викликаного першим стимулом (A1) під час парної стимуляції, від інтервала між стимуляціями.



Хронічні зміни синаптичної пластичності в мПФК, визначені в умовах БК-моделі ЕФА, відбувалися у тому ж напрямку, що і зміни, продемонстровані з використанням моделі судомних нападів, викликаних інгаляцією ФТ, але мали явно більш вибіркового характеру. Ці дані вказують на те, що вплив епілептичних нападів в період раннього розвитку на функціонування мПФК може бути результатом як змін у проєкціях до цієї ділянки кори мозку, так і модифікацій локальної мережевої активності мПФК.

У деяких дитячих епілептичних синдромах, таких як генерація безперервних спайк-хвиль під час повільного сну або синдром Ландау-Клеффнера, частота епілептичних нападів є відносно низькою. Тим не менш, у пацієнтів з цими синдромами спостерігаються епілептиформні зміни ЕЕГ у вигляді частих мультифокальних спайков і комплексів спайк-хвиля. Прояви когнітивного та поведінкового дефіциту у дітей з безсудомними епілептичними синдромами досить подібні до таких у дітей з частими судомними нападами (Gordon et al, 1997, 2010; Praline et al., 2003). Вивчення механізмів негативного впливу безсудомної ЕФА на функціонування головного мозку було досить обмеженим за відсутністю адекватної експериментальної моделі, яка могла би відтворити описані електрографічні та поведінкові розлади. Як було показано в попередньому розділі розроблена нами БК-модель є моделлю безсудомної ЕФА, відмінною рисою якої є часті інтеріктальні розряди при низькому рівні появи електрографічних епілептичних нападів. Хронічні зміни синаптичної пластичності у мПФК щурів з історією повторюваної локальної ЕФА в період раннього розвитку є подібними до змін синаптичної пластичності в цій ділянці мозку, які спостерігалися в експериментах з використанням ФТ-моделі і можуть служити підґрунтям для дослідження можливих змін поведінкових реакцій щурів БК-групи. Для тестування цієї гіпотези в наступній

серії експериментів ми використовували низку поведінкових тестів, які здатні надати інформацію по цілому ряду ПФК-залежних і незалежних форм поведінки.

Вплив безсудомної ЕФА в період раннього розвитку на поведінкові реакції. Для дослідження рівня поведінкової гнучкості тварин БК- та контрольної груп піддавали тестуванню, протокол якого проілюстровано на рис. 9.

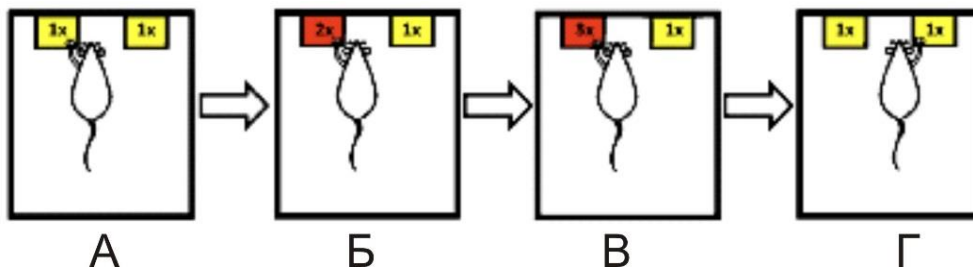


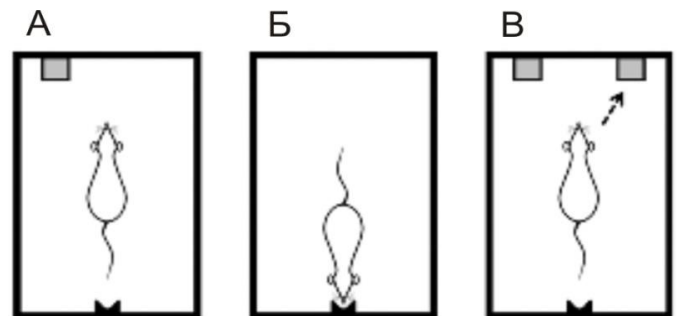
Рис. 9. Протокол тестування рівня поведінкової гнучкості (А) Тварина отримує винагороду, натиснувши будь-

який з двох запропонованих важелів. (Б, В) Якщо тварина віддає перевагу одному з двох важелів, їй, щоб отримати винагороду (їжу), потрібно виконати декілька додаткових натискань. (Г) Для того, щоб уникнути ускладнення завдання, тварина повинна одноразово натиснути протилежній важіль.

Загальна кількість здобутих винагород та загальна кількість натискань на важелі вказують на загальний рівень активності та мотивації під час виконання завдання. Аналіз даних не виявив відмінностей в цих характеристиках, вказуючи на те, що обидві групи тварин були приблизно однаково активні та мотивовані. Для міжгрупового порівняння рівня поведінкової гнучкості ми оцінювали: кількість «перемикань» з одного важеля на другий протягом однієї сесії, перевагу вибору одного важеля щодо іншого, ефективність натискань (середню кількість натискань для отримання однієї винагороди). Аналіз кількісних даних не виявив істотних міжгрупових відмінностей ($P > 0,05$ для всіх показників). Отже, наявність безсудомної ЕФА під час раннього розвитку не впливала помітно на рівень поведінкової гнучкості тварин при виконанні описаних тестів.

Для дослідження можливих змін ПФК-залежного компонента оперативної пам'яті у щурів з історією безсудомної ЕФА в період раннього розвитку ми використовували ЗНВП-тест. Протокол цього тесту проілюстровано на рис. 10.

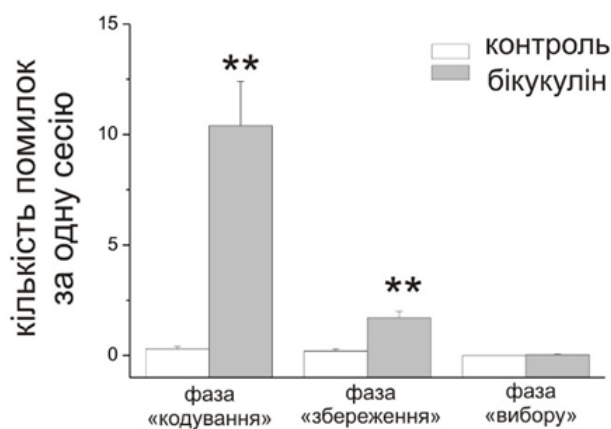
Рис. 10. Протокол ЗНВП-тесту. А) Фаза кодування: тварина повинна навчитися натискати «референсний» важіль. Б) Фаза збереження, під час якої тварина повинна перегородити носом отвір на протилежній стінці камери з різною тривалістю затримки. Під час цієї фази експериментальна



тварина повинна утримувати в пам'яті «референсний» об'єкт. Відомо, що утримування в пам'яті дії або об'єкту тривалий час (> 10 с) забезпечується гіпокампом, тому в наших дослідках, щоб диференціювати ПФК-залежну поведінку,

ми використовували затримку не більше 10 с. В) Фаза вибору, під час якої тварина, щоб отримати винагороду, повинна з двох запропонованих важелів («референсний» та «новий») вибрати саме «новий».

Для успішного виконання ЗНВП-тесту експериментальна тварина повинна запам'ятати та розпізнати «референсний» об'єкт, вміти порівнювати «новий» об'єкт з «референсним» та цілеспрямовано робити вибір на користь саме «нового» об'єкту. Під час проведення ЗНВП-тесту, кількість днів до завершення кожного блоку підготовчого тренування та ЗНВП-тесту (вимір компонента, який є пов'язаним саме з оперативною пам'яттю) у досліджуваних групах не розрізнявся ($P > 0,05$). Ми також не знайшли жодної істотної відмінності в точності виконання завдання в межах будь-якого з блоків. Ці факти свідчать про те, що безсудомна ЕФА



під час раннього розвитку не впливає істотно на ПФК-залежний компонент оперативної пам'яті, залучений у виконання ЗНВП-тесту.

Попередні дослідження показали, що помилки, допущені під час виконання ЗНВП-тесту, свідчать про дефіцит уваги (Dalley et al., 2004; Risbrough et al., 2002). В наших дослідях тварини БК-групи робили помітно більше помилок впродовж сесій, ніж контрольні тварини впродовж всіх 28 днів тестування.

Рис. 11. Залежність кількості помилок за одну сесію від фази ЗНВП-тесту.

Помилки в значній мірі були пов'язаними з пропуском фази «кодування» (відсутністю натискання «референсного» важеля) з середньою кількістю помилок допущених за одну сесію $0,3 \pm 0,1$ в контролі та $10,4 \pm 2,0$ в БК-групі, а також з фазою «збереження». Кількість помилок зроблених твариною під час виконання останньої складала $0,2 \pm 0,1$ за сесію у контролі та $1,7 \pm 0,3$ у БК-групі (рис. 11). Фазу вибору обидві групи тварин виконували практично без помилок (0 помилок в контрольній групі, $0,04 \pm 0,02$ помилок за сесію в БК-групі). Також було встановлено, що кількість допущених помилок не залежало від блоку ЗНВП-тесту. Отже, безпосередньо вони не зумовлені змінами компонента завдання пов'язаного з використанням оперативної пам'яті. Скоріше за все вони є ознакою порушень рівня уваги або концентрації останньої у тварин БК-групи.

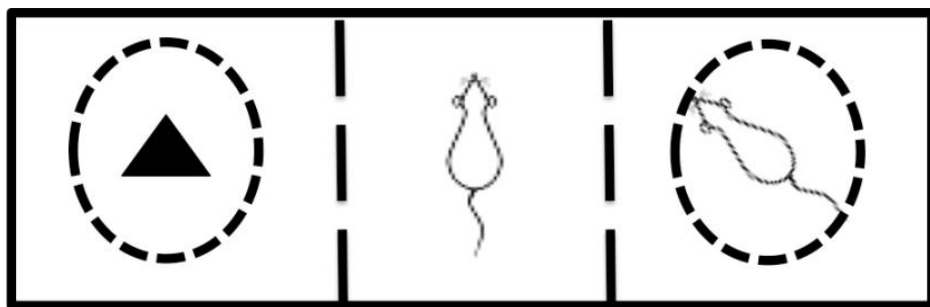
Щоб глибше зрозуміти причини помилок під час виконання ЗНВП-тесту, з експериментальними тваринами проводили поведінковий тест «відкрита арена». Цей тест дозволяє кількісно оцінити локомоторну активність щурів, а також дослідити окремі аспекти емоційної поведінки, такі як тривожність та гіперактивність. Під час виконання тесту «відкрита арена» ми не знайшли істотних

відмінностей середніх значень загальної дистанції, яку тварина долала протягом 10-хвилинного сеансу знаходження в арені (корелят рівня локомоторної активності, контроль: $48,0 \pm 2,2$ м ($n = 5$) та БК-група: $66,9 \pm 14,0$ м ($n = 5$), $P > 0,05$) або співвідношень між часом, проведеним у центрі арени та часом, знаходження на периметрі кругової арени (вимір рівня тривожності тварини, $P > 0,05$). Отже, можна зробити висновок, що безсудомна ЕФА індукована у перебігу раннього розвитку не впливає на поведінку щурів під час виконання тесту «відкрита арена».

Для дослідження ще однієї ПФК-залежної форми поведінки (соціальної поведінки) використовували тест «перегородка» (рис. 12).

Рис. 12. Протокол тесту «перегородка».

Піддослідна тварина була переміщена в центральну камеру трьохкамерного боксу, бічні камери якої були відокремлені від



центральної камери перегородками. В правій бічній камері знаходився щур такого ж віку, як і вік піддослідної тварини. Цей щур був ізолюваний в круговій прозорій клітці, що виключало його пересування під час експерименту, а також зіткнення з експериментальною особиною. В лівій бічній камері вміщувався об'єкт, ізолюваний в круговій прозорій клітці. Після п'ятихвилинного періоду адаптації тварини в центральній камері, перегородки між камерами видаляли і протягом 10 хв вимірювали час, проведений піддослідною твариною поряд з об'єктом або щуром. Для дослідження соціальної поведінки оцінювали час, проведений з піддослідною твариною з щуром відносно часу проведеного поряд з об'єктом.

Аналіз результатів отриманих із використанням цього тесту показав, що хоча обидві групи досліджених тварин проводили більше часу поряд з щуром ніж з об'єктом, контрольні тварини проводили значно більше часу поряд саме з щуром, порівняно з тваринами з історією безсудомної ЕФА в період раннього розвитку ($P < 0,05$). Контрольні тварини проводили $65,7 \pm 4,7$ % загального часу поряд з щуром та лише $34,3 \pm 4,7$ % часу з об'єктом. Тварини БК-групи проводили $58,8 \pm 6,1$ % часу з щуром та $41,2 \pm 6,1$ % часу з об'єктом (рис. 13). Ці дані вказують на те, що безсудомна ЕФА під час періоду раннього розвитку призводить до значного дефіциту проявів соціальної поведінки тварин.

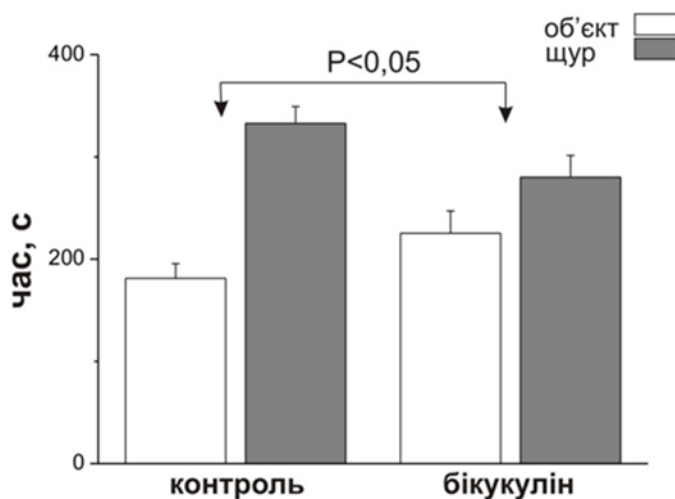


Рис. 13. Вплив безсудомної ЕФА, локалізованої в ПФК, на динаміку поведінки тварин під час виконання тесту «перегородка». Контрольні тварини проводили значно більше часу поряд з щуром ніж об'єктом порівняно з щурами БК-групи.

Таким чином, наведені вище дані вказують на те, що індукція безсудомної ЕФА, локалізованої в ПФК, протягом періоду раннього розвитку може призводити до цілої

низки стабільних порушень поведінки щурів. Поведінкові розлади описані у тварин БК-групи корелюють із розладами у дітей з безсудомною ЕФА. Це робить описану модель привабливим інструментом для подальших досліджень, причому як впливу локальної неонатальної ЕФА на функції ЦНС, так і таких поведінкових розладів, як дефіцит уваги і дефекти соціальної поведінки. Подальше дослідження механізмів, що лежать в основі описаних в наших дослідженнях дисфункцій може бути корисним для розробки нових терапевтичних підходів, спрямованих на поліпшення якості життя пацієнтів з історією безсудомної ЕФА в дитинстві та пов'язаних з нею супутніх психічних захворювань.

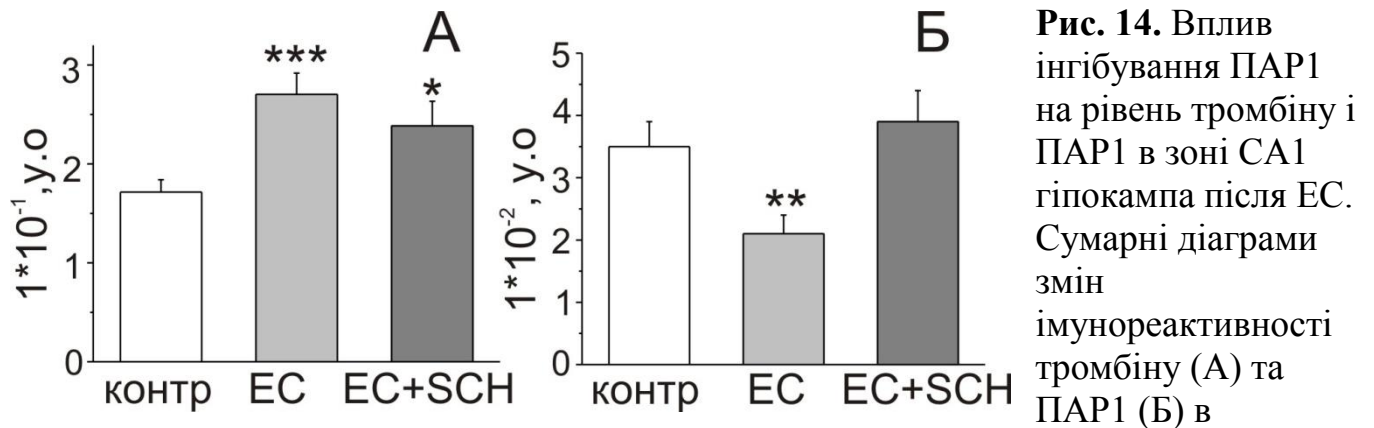
Морфологічні, електрофізіологічні і поведінкові зміни під час епілептогенезу, спровокованому формуванням епілептичного статусу, та роль тромбіну і PAR1 в цих процесах. Незважаючи на роки інтенсивних клінічних та фундаментальних досліджень, розуміння механізмів, залучених у розвиток набутої епілепсії, залишається значною мірою обмеженим. У багатьох випадках епілептогенез є спровокованим черепномозковою травмою, інсультом, запаленням, пухлиною мозку, формуванням епілептичного статусу (ЕС) і т. д. Безпосередньо за травматизуючою подією наявний так званий латентний період тривалістю від декількох днів або тижнів (в експериментальних моделях) до років (у людини), коли зміни на анатомічному, мережевому, клітинному та молекулярному рівнях в кінцевому підсумку призводять до розвитку хронічних рецидивуючих епілептичних нападів. Проте зовсім не будь-яка серйозна травматична подія призводить до перетворення "нормального" мозку на «епілептичний». Різноманітні фактори, які супроводжують травматичну подію, можуть відігравати важливу роль у розвитку епілепсії. Клінічні спостереження та дослідження на різних моделях набутої епілепсії у тварин послідовно вказують на те, що важливим фактором ризику розвитку спонтанних епілептичних нападів може бути порушення ГЕБ. Залучені до такого розвитку сигнальні шляхи поки що залишаються в значній мірі нез'ясованими. Вірогідною мішенню при дослідженнях молекулярних механізмів, залучених у посттравматичний епілептогенез, який супроводжується порушеннями ГЕБ, є PAR1– рецептори, що активуються тромбіном і які є широко експресованими

в клітинах ЦНС. Відомо, що тромбін і PAR1 відіграють важливу роль в патофізіології наслідків неврологічних травм (Xi et al., 2003). Виявлено, що пригнічення активації PAR1 забезпечує певний нейропротекторний ефект в експериментальних моделях травми мозку та моделях ішемії (Karabiyikoglu et al., 2004; Olson et al., 2004; Rohatgi et al., 2004). Також відомі наступні факти: 1) ін'єкція тромбіну може підсилювати і навіть провокувати розвиток ЕФА через модуляцію активності ТТХ-чутливих перзистентних натрієвих струмів і впливи на збуджувальну та гальмівну синаптичну передачу; 2) активація PAR1 може призводити до ушкодження нейронів, інтенсифікації нейрогенезу та астрогліозу, викликати запалення і хронічну дисфункцію ГЕБ – процеси, які часто спостерігаються при епілептогенезі; 3) фармакологічне інгібування PAR1 забезпечує нейропротекторний і протизапальний ефекти у різних експериментальних моделях ішемії мозку; 4) PAR1 беруть участь у регуляції функцій ідентифікованих мішеней антиепілептогенної терапії (Rohatgi et al., 2004; Nicole et al., 2005; Chapman, 2006; Luo et al., 2007; Chen et al., 2012; Isaeva et al., 2012; Maggio et al., 2013). Ці спостереження призвели до припущення, що PAR1 можуть бути залученими у посттравматичний епілептогенез, який супроводжується порушеннями ГЕБ; пригнічення PAR1 у межах латентного періоду забезпечувати нейропротекторну та антиепілептогенну дії. Правомірність цієї гіпотези була досліджена в наступній серії експериментів з використанням літій-пілокарпінової моделі епілептогенезу, спричиненого формуванням ЕС, тестуванням селективного антагоніста PAR1 (SCH79797) та застосуванням низки морфологічних та електрофізіологічних методик. В дослідженні було використано вісімдесят щурів віком 50-70 діб після народження (в гістологічних експериментах $n = 12$, в електрофізіологічних $n = 28$, в поведінкових тестах $n = 40$).

З використанням імуногістохімічних методів забарвлення зрізів гіпокампа було виявлено значну експресію PAR1 в пірамідній зоні CA1 гіпокампа. Подвійне імуногістохімічне забарвлення з використанням астроцитспецифічних (анти-GFAP) або нейронспецифічних (анти-NeuN) антитіл з анти-PAR1-антитілами показало, що в зоні CA1 гіпокампа переважна більшість PAR1-імунопозитивних клітин є пірамідними клітинами. Імуногістохімічне дослідження зрізів гіпокампа з використанням антитіл щодо тромбіну показало, що в зоні CA1 гіпокампа тварин контрольної групи спостерігався вельми незначний базовий рівень тромбіну (Рис. 14А). Для дослідження розподілу тромбіну в різних ділянках вказаної зони проводили візуалізацію ядер нейронів з використанням DAPI-забарвлення. Розподіл тромбіну у ділянках *stratum pyramidale*, *stratum radiatum* і *stratum oriens* був майже однорідним.

В попередніх дослідженнях з використанням пілокарпінової моделі епілепсії і імуногістохімічного забарвлення імуноглобуліна G (IgG) було показано, що розвиток ЕС спричинений ін'єкціями пілокарпіну, пов'язаний зі значним пошкодженням ГЕБ (Ncode-Ekane et al., 2010). Максимальне підвищення IgG-імунореактивності в гіпокампі спостерігалось через 48 год після припинення ЕС. Беручи до уваги, що пошкодження ГЕБ може призводити до підвищення рівнів

низки компонентів крові, у тому числі і тромбіну, у внутрішньоцеребральному середовищі, ми досліджували вплив ЕС на рівень тромбіну в зрізах мозку щурів через 48 год після припинення даного стану. Рівень тромбіну в зоні СА1 гіпокампа у цьому часовому інтервалі був значно підвищеним ($P < 0,001$) (Рис. 14А).



досліджуваних групах. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ порівняно з контролем.

Ін'єкції SCH 79797 (25 мкг/кг, через 20-30 хв і 24 год після припинення ЕС) не впливали на збільшення рівня тромбіну після ЕС (рис. 14А). Таке збільшення корелювало зі зниженням імунореактивності щодо PAR1 в пірамідному шарі СА1 гіпокампа (рис. 14Б). Введення SCH 79797 призводило до відновлення рівня PAR1 в дослідженій зоні гіпокампа ($P = 0,4$ порівняно з контролем, рис.14Б). Зниження імунореактивності PAR1 після ЕС може бути обумовленим різними причинами – підвищенням активності PAR1 внаслідок підвищення рівня тромбіну в позаклітинному середовищі (відомо, що при активації PAR1 швидко інтерналізуються в клітини та деградують (Macfarlane et al., 2001)), певним зниженням експресії PAR1 в нервових клітинах, та загибеллю нервових клітин, спричиненою ЕС. Пілокарпінову модель вважають класичною моделлю скроневої епілепсії зі склерозом гіпокампа. В наших дослідках ми спостерігали значну втрату клітин у зоні СА1 гіпокампа через 48 год після припинення ЕС (рис. 15А1–2). Ін'єкції блокатора PAR1 призводили до суттєвого зниження спровокованої ЕС загибелі клітин (рис. 15А3,Б). Роль тромбіну, як важливого модулятора життєздатності клітин була встановлена в центральних та периферичних нейронах на різноманітних моделях патологій нервової системи *in vivo* та *in vitro* (Fujimoto et al., 2007; Donovan et al., 1997; Choi et al., 2003; Chen et al., 2012). Відомо, що тромбін в низьких концентраціях виявляє нейропротекторну дію; навпаки, високий рівень тромбіну ініціює процес нейродегенерації (Striggow et al., 2000). Механізм дії тромбіну в нервовій тканині в значній мірі опосередкований активацією основних рецепторів тромбіну в головному мозку – PAR1. Попередні дослідження на моделях травми головного мозку та гіпоксично-ішемічних уражень довели, що за умов відсутності PAR1 у нокаутних тварин або фармакологічного блокування PAR1 спостерігалася підвищення стійкості нервових клітин до впливу несприятливих чинників (Wang et al., 2012; Junge et al., 2003; Chen et al., 2012; Manaenko et al., 2013). Наскільки нам відомо, наше дослідження є першим, в якому було

продемонстровано нейропротекторну дію пригнічення функції PAR1 після епілептичних нападів.

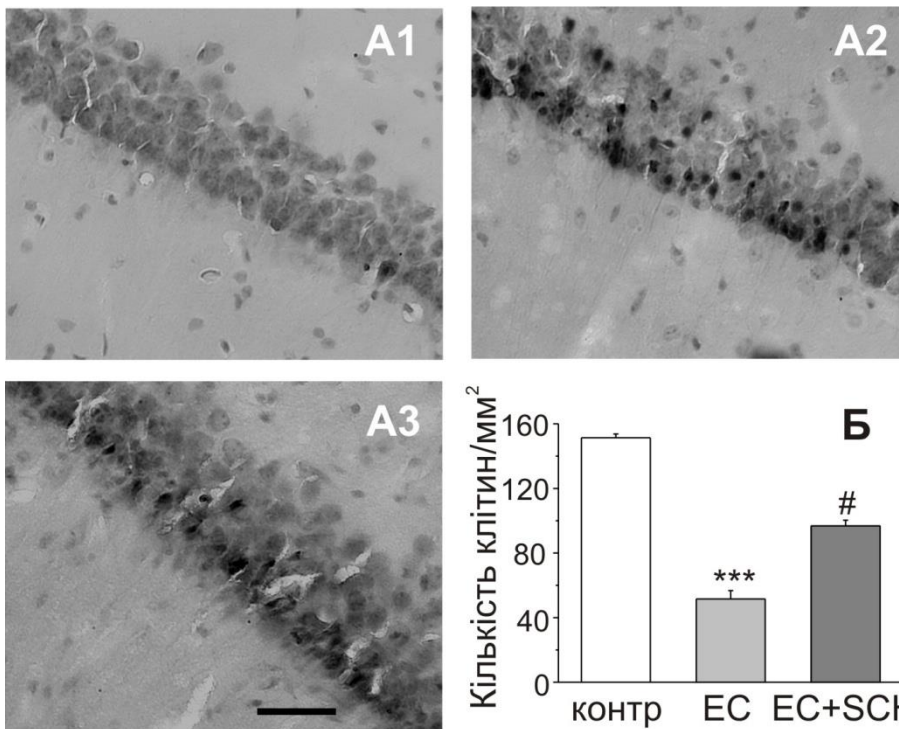


Рис. 15. Вплив інгібування PAR1 на забарвлення тіоніном в зоні CA1 гіпокампа після ЕС. Забарвлення тіоніном (А, масштаб 200 мкм) в контрольній групі (1), через 48 год після припинення ЕС в групах ЕС + розчинник (2) та ЕС + SCH (3). (Б) Забарвлення зрізів з використанням тіоніну виявило значну втрату клітин в зоні CA1 пірамідного шару гіпокампа через 48 год

після ЕС. Введення SCH 79797 призводило до зниження ЕС-індукованої загибелі клітин. *** $P < 0,001$ порівняно з контролем; # $P < 0,01$ порівняно з групою ЕС + розчинник.

Різноманітні клінічні спостереження на пацієнтах з діагнозом епілепсія та дані, отримані на експериментальних моделях цього захворювання показали, що впродовж перших двох тижнів після ЕС є певна вірогідність раптової смерті (DeLorenzo et al., 2009; Jiang et al., 2013; Levin et al., 2013). В наших досліджах всім тваринам, що пережили первинний ЕС, вводили антагоніст PAR1 або для контролю розчинник протягом 10 діб після ЕС. У групі «ЕС + розчинник», 11 з 23 тварин (47,8 %) загинули протягом перших двох тижнів після ЕС. У групі ж «ЕС + SCH» рівень виживаності тварин становив 93,8 % (15 з 16 тварин, рис.16А). Крім того, у групі

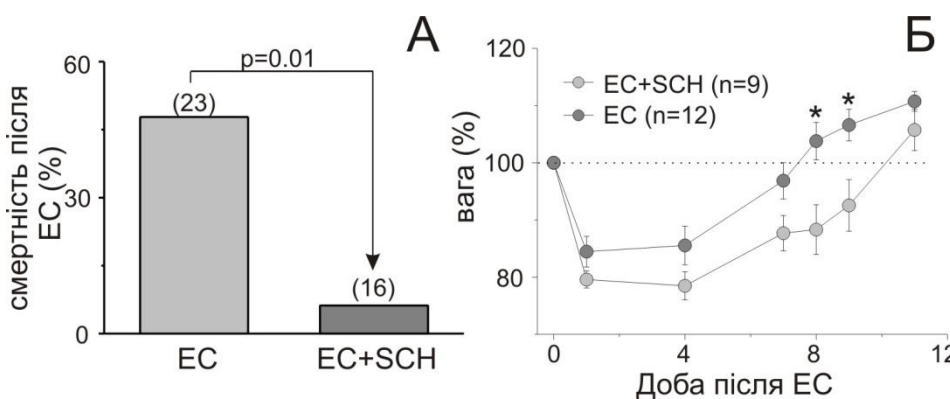


Рис. 16. Ефект інгібування PAR1 на смертність тварин та на відновлення ваги у тварин після ЕС. Ін'єкції антагоніста PAR1 призводили до значного зниження смертності тварин після ЕС (А) та значно

прискорювали відновлення втраченої ваги (Б). Кількість тварин, використаних для аналізу, вказана в дужках.

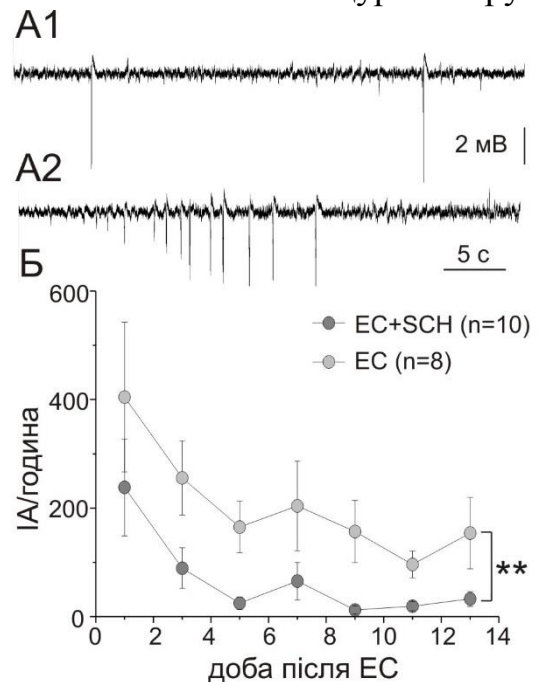
ЕС + SCH спостерігалось значне прискорення відновлення втраченої ваги у тварин після ЕС (рис. 16Б).

Таким чином, ін'єкції антагоніста ПАР1 невдовзі після ЕС значно знижували вірогідність смерті тварин ($P = 0,01$). Підвищення рівня виживаності було також продемонстровано в недавніх дослідженнях, у котрих делеція гена циклооксигенази-2 (COX-2) в нейронах, інгібування простагландинових рецепторів EP2 і використання препаратів з протизапальними ефектами призводили до зниження відтермінованої смертності після ЕС (Marchi et al., 2011; Levin et al., 2012; Jiang et al., 2013; Sierra-Marcos et al., 2014). Ці дані вказують на залучення запальних процесів в механізми відтермінованої смертності після ЕС. Відомо, що ПАР1 грають значну роль у розвитку запальних процесів (Vergnolle et al., 2001). Також показано, що тромбін інтенсифікує експресію COX-2 і вивільнення простагландину E2, причому це опосередкується активацією ПАР1 (Lo et al., 2009). З урахуванням цих даних можна припустити, що ефект інгібування ПАР1 щодо відтермінованої смертності тварин після ЕС можна щонайменше частково пояснити інгібуванням індукції та розвитку запалення.

В попередніх дослідженнях електрографічні прояви нападів та інтеріктальна активність (ІА) спостерігалися в гіпокампі тварин у перебігу епілептогенезу, спровокованому ЕС (Isaev et al., 2011; Staley et al., 2011; Chauvière et al., 2012; Mazzuferi et al., 2012; Salami et al., 2014). Було встановлено позитивну кореляцію між наявністю ІА під час латентного періоду та розвитком хронічної епілепсії (Salami et al., 2014; Chauvière et al., 2012). У наступній серії експериментів, ми проводили *in vivo* відведення потенціалів від зони СА1 гіпокампа щурів в групах «ЕС + розчинник» (контроль) та «ЕС + SCH» протягом двох тижнів після ЕС.

Аналіз результатів таких досліджень показав, що у перший день після ЕС ІА реєстрували в усіх щурів ($n = 8$) групи «ЕС + розчинник» та у 6 з 10 щурів групи «ЕС + SCH». Інтеріктальні розряди виникали у цих тварин нерегулярно або формували кластери різної тривалості (рис. 17А).

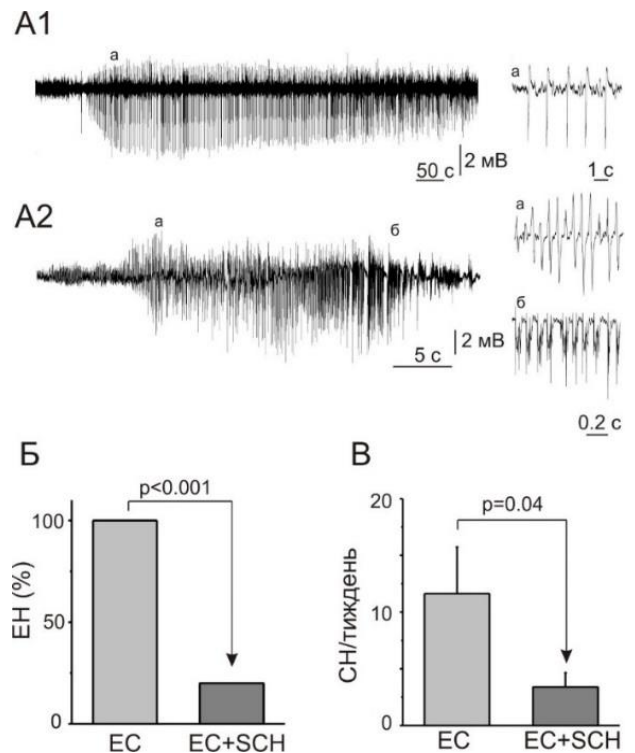
Рис. 17. Вплив пригнічення функції ПАР1 на інтеріктальну активність (ІА) в зоні СА1 гіпокампа впродовж перших двох тижнів після епілептичного статусу. Приклади реєстрації поодиноких інтеріктальних розрядів (А1) і кластера ІА (А2). (Б) Динаміка змін частоти ІА після епілептичного статусу в групах «ЕС + розчинник» і «ЕС + SCH». У дужках кількість тварин використаних для аналізу. $**P < 0,01$.



На рис. 17Б представлені результати аналізу щоденних реєстрацій позаклітинних потенціалів впродовж двох тижнів після ЕС. Поступове зниження частоти ІА протягом першого тижня після ЕС спостерігалось в обох досліджуваних групах. Ін'єкції антагоніста ПАР1 призводили до значного пригнічення ІА у межах двох тижнів після ЕС ($P < 0,01$).

В реєстраціях потенціалів впродовж окресленого вище періоду спостерігали два типи електрографічних проявів епілептичних нападів (ЕН): тривалі низькочастотні осциляції (Тип І, максимальна частота 1-3 Гц, тривалістю сотні секунд, рис. 18А1) та короткі високочастотні осциляції (Тип ІІ, максимальна частота більше 10 Гц), що складались з фаз тонічної та клонічної активності (рис. 18А2). Обидва типи ЕН можна було спостерігати окремо або разом протягом години запису позаклітинних потенціалів від однієї тварини. На рис. 18Б показано, що пригнічення функції ПАР1 призводило до значного зниження вірогідності виникнення ЕН в зоні СА1 гіпокампа впродовж перших тижнів після ЕС.

Рис. 18. Вплив антагоніста ПАР1 на електрографічні і судомні напади після епілептичного статусу. (А) Приклади запису тривалих низькочастотних (А1) і коротких високочастотних осциляцій (А2) у відведеннях від зони СА1 гіпокампа щурів. Приклади тонічної (а) та клонічної (б) активності показано на подовженій шкалі часу (праворуч). Пригнічення функції ПАР1 знижує вірогідність реєстрації епілептичних нападів (ЕН, Б) впродовж двох тижнів після ЕС і судомних нападів (СН, В) на хронічній стадії експериментальної моделі скроневої епілепсії.



В усіх щурів групи «ЕС + розчинник» та у 6 з 10 щурів групи «ЕС + SCH» спостерігали судомні напади впродовж одного тижня відеомоніторингу (12 год/добу) проведеного через 3,0-3,5 місяців після ЕС (хронічна стадія літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії). На рис. 18В показано, що інгібування ПАР1 призводило до значного зниження вірогідності спостереження судомних нападів в межах згаданого періоду («ЕС + розчинник» $n = 8$, «ЕС + SCH» $n = 10$, $P = 0,04$).

Отже, отримані дані вказують на те, що тромбін і ПАР1 приймають участь в епілептогенезі, спричиненому ЕС, в експериментальній моделі скроневої епілепсії. Незважаючи на те, що клітинний механізм ефекту блокування ПАР1-залежної сигналізації потребує майбутніх детальних досліджень, значний нейропротекторний, а також антиепілептогенний ефекти інгібування ПАР1 на фоні істотного зниження відтермінованої смертності тварин вказують на те, що ПАР1

може стати новою перспективною молекулярною мішенню для лікування набутої епілепсії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено детальний аналіз морфологічних та електрофізіологічних змін у головному мозку щурів та змін поведінкових феноменів у цих тварин, спричинених епілептиформною активністю (ЕФА). Встановлені деякі загальні закономірності і механізми пластичних змін синаптичної передачі, спровокованих дією ЕФА в період раннього розвитку; виявлені особливості модуляції збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі, показані тривалі зміни збудливості нервових мереж і синаптичної пластичності у щурів з наявністю ЕФА в неонатальний період. Досліджено вплив ЕФА, локалізованої в префронтальній корі (ПФК), на різні форми поведінки дорослих щурів. Вперше досліджено роль тромбіну і його молекулярних рецепторів, протеазаактивованих рецепторів типу 1 (ПАР1), в епілептогенезі спровокованому епілептичним статусом; встановлено ефекти інгібування цих рецепторів. За матеріалами дисертаційної роботи зроблено наступні висновки:

- 1) Неонатальні рекурентні судомні напади, спровоковані інгаляцією флуротилу, призводять до істотного зниження амплітуд гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС) у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа щурів; при цьому частота і кінетичні характеристики спонтанних ГПСС не змінюються;
- 2) Рекурентні епілептичні напади, спровоковані в неонатальний період, не впливають на жоден з досліджуваних параметрів збуджувальних постсинаптичних струмів (ЗПСС) у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа, а саме амплітуду і частоту спонтанних ЗПСС, відношення амплітуд і частот АМПА- і НМДА-опосередкованих компонентів цих струмів і на кінетику цих компонентів;
- 3) Неонатальні судомні напади не призводять до розвитку типової хронічної епілепсії, але зумовлюють хронічне зниження порогу виникнення ЕФА в соматосенсорній корі (ССК) щурів;
- 4) Епілептичні напади, спровоковані інгаляцією флуротилу в неонатальний період, призводять до значного зниження амплітуди спонтанних ГПСС і частоти відповідних мініатюрних струмів в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК, без змін амплітуди останніх струмів, що вказує на пресинаптичний характер змін гальмівної синаптичної передачі в ССК;
- 5) Неонатальні рекурентні епілептичні напади зумовлюють значні зміни амплітуди і частоти спонтанних ЗПСС в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК щурів. Збільшення частоти мініатюрних ЗПСС в цих нейронах, швидше за все, свідчить про пресинаптичну природу змін збуджувальної синаптичної передачі. Експерименти з аплікаціями блокатора НМДА-рецепторів вказують на істотний внесок НМДА-

рецепторів в порушення функції збуджувальної синаптичної передачі в нейронах ССК щурів з історією неонатальних судомних нападів;

6) Неонатальні судомні напади не впливають на амплітуду викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) при передачі від шару 4 до шарів 2/3 ССК, на вірогідність виникнення довготривалої потенціації, депресію ВПСП та посттетанічну потенціацію ВПСП в цих синапсах, але призводять до посилення довготривалої потенціації ВПСП, викликаной високочастотною стимуляцією;

7) Неонатальні судомні напади зумовлюють хронічні зміни гальмівної синаптичної передачі в пірамідних нейронах шару 5 медіальної зони ПФК (мПФК). Спостерігається значне зниження частоти мініатюрних ГПСС в цих нейронах у тварин з наявністю епілептичних судом в неонатальний період, без змін амплітуди та кінетичних характеристик мініатюрних ГПСС, що вказує на пресинаптичну природу впливу згаданого фактору на гальмівні синапси в досліджених нейронах. Повторювані судомні напади в період раннього розвитку не впливають на збуджувальну синаптичну передачу в досліджених нейронах мПФК;

8) Судомні напади, індуковані флуротилом під час раннього розвитку, призводять до хронічного підвищення посттетанічної потенціації синаптичної передачі між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК;

9) З використанням розробленої нами моделі парціальної ЕФА показано що, індукція ЕФА в ранній період життя локалізованої в ПФК, зумовлює хронічне підвищення посттетанічної потенціації в синапсах між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК, без змін синаптичної пластичності, викликаной парною стимуляцією, та синаптичної пластичності впродовж тетанічної стимуляції в згаданих синапсах. Зміни посттетанічної потенціації синаптичних відповідей відбуваються в тому ж напрямку, що і в моделі судомних епілептичних нападів, індукованих флуротилом;

10) Повторювана ЕФА, індукована інтрацеребральними ін'єкціями бікукуліну в період раннього розвитку, не впливає на рівень рухової активності і тривожності, вмотивованість, поведінкову гнучкість та ПФК-залежний компонент оперативної пам'яті тварин у відповідних тестах; але зумовлює значний дефіцит уваги і розлади соціальної поведінки піддослідних тварин;

11) З використанням літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії показано, що епілептичний статус, спровокований ін'єкціями пілокарпіну, спричиняє високу смертність і захворюваність піддослідних тварин. При цьому виявлено підвищення рівня тромбіну, зниження експресії PAR1 і загибель нейронів в зоні CA1 гіпокампа. У піддослідних тварин спостерігається розвиток спонтанних судом в подальшому житті;

12) Ін'єкції селективного антагоніста PAR1 впродовж перших десяти днів після епілептичного статусу призводять до значного зниження смертності і захворюваності тварин; нормалізації експресії PAR1 в зоні CA1 гіпокампа; зниження загибелі клітин в цій зоні; пригнічення інтеріктальної та іктальної ЕФА в

даній зоні гіпокампа впродовж перших двох тижнів після епілептичного статусу; а також зниження вірогідності розвитку спонтанних судомних нападів. Отримані дані дозволяють стверджувати, що зрушення в системі тромбін – ПАР1 істотно задіяні в епілептогенез, зумовлений формуванням епілептичного статусу. Пригнічення активності ПАР1 забезпечує нейропротекторний і антиепілептогенний ефекти, що вказує на те, що ПАР1 може стати новою перспективною мішенню "антиепілептогенної" терапії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Isaeva E. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizures/ E. Isaeva, D. Isaev, R. Khazipov, G.L. Holmes // Eur. J. Neurosci. – 2006. – 23, № 6. – P.1559-66. *(Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів).*
2. Isaeva E. Long-term consequences of recurrent neonatal seizures on neocortical function / E. Isaeva, D. Isaev, R. Khazipov, G. L. Holmes // Annual Meeting of American Neuroscience Society.–Chicago, IL, October 17-21, 2009. – 438.16/N12. *(Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді).*
3. Isaeva E. Long-term suppression of GABAergic activity by neonatal seizures in rat somatosensory cortex / E. Isaeva E., D. Isaev, R. Khazipov, G. L. Holmes // Epilepsy Research – 2009. – 87, №2-3. – P.286-9 *(Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, формулювання висновків, узагальнення результатів).*
4. Isaeva E. Long-term effects of flurothyl-induced neonatal seizures on seizure susceptibility in the somatosensory cortex / E. Isaeva, D. Isaev, H. Karnam, G. L. Holmes // 61st Annual Meeting of American Epilepsy Society – Philadelphia, PA, USA, 2007.– Epilepsia.– Abstract Book. – T.3.059 *(Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, виступ з доповіддю на з'їзді).*
5. Isaeva E. Recurrent neonatal seizures result in long-term increase of neonatal network excitability in the rat neocortex / E. Isaeva, D. Isaev, A. Savrasova, R. Khazipov, G. L. Holmes // Eur. J. Neurosci. – 2010. –31,№ 8. – P.1446-55 *(Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів).*
6. Ісаєва О.В. Вплив неонатальних епілептичних нападів на активність нейронів неокортекса / Д. С. Ісаєв, О. В. Ісаєва, А. В. Саврасова, Г. Л. Холмс // Нейрофізіологія – 2011. – 43, № 3. – С. 258-260 *(Внесок дисертанта: планування експериментального дослідження, статистична обробка даних, узагальнення результатів).*
7. Isaeva E. Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis/ D. Isaev, I. Lushnikova, O. Lunko, O. Zapukhliak, O. Maximyuk, A. Romanov, G. G. Skibo, C. Tian, G. L. Holmes, E. Isaeva // Neurobiol. Dis. – 2015. –

78. – P.68-76 (*Внесок дисертанта: планування експериментального дослідження, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
8. Isaeva E. Altered short-term plasticity in the prefrontal cortex after early life seizures/ A. E. Hernan, G. L. Holmes, D. Isaev, R. C. Scott, E. Isaeva // *Neurobiol. Dis.* – 2013. –50. – P.120-6. (*Внесок дисертанта: планування і проведення експериментального дослідження, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
9. Isaeva E. Focal epileptiform activity in the prefrontal cortex is associated with long-term attention and sociability deficits / A. E. Hernan, A. Alexander, K. R. Jenks, J. Barry, P. P. Lenck-Santini, E. Isaeva, G. L. Holmes, R.C. Scott // *Neurobiol. Dis.* – 2014. –63. – P.25-34 (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
10. Isaeva E. Interaction between bicuculline and GABA in cultured rat hippocampal neurons / E. Isaeva, S. A. Fedulova, N. S. Veselovsky // *The Physiological Society of UK, King's College London Meeting – London, 2000. – PC74* (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
11. Isaeva E. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons / S. A. Fedulova, D.V. Vasilyev, E.V. Isaeva, S.G. Romanyuk, N.S Veselovsky // *Neuroscience* – 1999. – 92, №4, – P.1217-1230 (*Внесок дисертанта: планування експериментального дослідження, статистична обробка результатів*).
12. Ісаєва О. В. Пресинаптична модуляція блокаторами калієвих каналів гальмівної синаптичної передачі в нейронах гіпокампа щурів / Д. В. Васильєв, О. В. Ісаєва, С. А. Федулова, М. С. Веселовський // *Нейрофізіологія* – 1998. – 30, № 4/5. – С. 336 - 340 (*Внесок дисертанта: статистична обробка результатів, узагальнення результатів*).
13. Isaeva E. V Metabolic regulation of Ca²⁺ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres/ E. V. Isaeva, N. Shirokova // *J. Physiol.*– 2003. – 547.– P. 453 - 462 (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
14. Isaeva E. Anticonvulsant action of GABA in the high potassium-low magnesium model of ictogenesis in the neonatal rat hippocampus in vivo and in vitro / D. Isaev, E. Isaeva, R. Khazipov, G. L. Holmes // *J. Neurophysiol.* – 2005.–94, № 4.–P.2987-92 (*Внесок дисертанта: планування експериментального дослідження, статистична обробка результатів*).
15. Isaeva E. Long-term modulation of the synaptic plasticity in somatosensory area of neocortex by recurrent flurothyl seizures induced early in life / E. Isaeva, G. L. Holmes – *Annual Meeting of American Epilepsy Society.*– San Antonio, TX, USA. – December 3–7, 2010. – S.1.030 (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
16. Isaeva E. V. Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle / E. V. Isaeva, V. M. Shkryl, N. Shirokova // *J. Physiol.*– 2005. – 565. –

- Р. 855 - 872 (*Внесок дисертанта: статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
17. Isaeva E. The effect of early life seizures on synaptic plasticity in the prefrontal cortex later in life / A. Hernan, G. Holmes, E. Isaeva // Annual Meeting of American Epilepsy Society.— San Antonio, TX, USA.— December 3-7, 2010. — 2.373 (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
 18. Isaeva E. Anesthetic and postanesthetic effects of isoflurane on neuronal activity in the rat hippocampus/ E. Isaeva, D. Isaev, G. L. Holmes // Neurophysiology — 2007. — 39, № 4/5. — P.371-373. (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів*).
 19. Isaeva E. Effects of isoflurane on hippocampal seizures at immature rats in vivo / E. Isaeva // Fiziol. Zh.— 2008.— 54, № 5.— P. 40 - 45 (*Внесок дисертанта: планування і проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
 20. Isaeva E. Influence of enhanced sialylation on synaptic plasticity in rat hippocampus / A. Savrasova, O. Isaeva, D. Isaev // The 5th International Congress Ukrainian Society for Neuroscience in Memory of Platon Kostyuk.— Kiev, 6 - 10 June, 2011. — P.23 (*Внесок дисертанта: статистична обробка даних*).
 21. Isaeva E. Mechanism of antiseizure effect of isoflurane in the immature rat hippocampus/ E. Isaeva // Fiziol. Zh.— 2009. — 55, № 1,— P. 57-60 (*Внесок дисертанта: планування і проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
 22. Isaeva E. The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus / A.V. Savrasova, I.V. Lushnikova, E.V. Isaeva, G.G. Skibo, D.S. Isaev, P.G. Kostyuk // Fiziol. Zh. — 2010. —56, № 4. — P.14-18 (*Внесок дисертанта: планування експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
 23. Isaeva E. The role of endogenous neuraminidase in control of neuronal and network excitability / E. Isaeva, D. Isaev, G. L. Holmes // 8th European Congress of Epileptology.— Berlin, Germany. — 2008. — e21. (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
 24. Isaeva E. Anaesthetic and postanaesthetic effect of isoflurane on the multiple-unit activity of the immature rat hippocampus / E. V. Isaeva, D. S. Isaev// Fiziol. Zh.— 2011.— 57, № 1.— P.17-20. (*Внесок дисертанта: планування експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
 25. Isaeva E. Effect of neuraminidase treatment on persistent epileptiform activity in the rat hippocampus / E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova, G. Skibo, G. L. Holmes, D. Isaev // Pharmacol. Rep. — 2011.— 63, № 3.— P. 840-4 (*Внесок дисертанта: статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
 26. Talnov A.N. Electrolyte therapy reduces spike-and-wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy / A. N. Talnov, E. Isaeva, A.V. Savotchenko, G.V. Dovgalets, J.G. Ochoa, G.L. Holmes, D. Isaev // Epilepsy Behav.— 2012.— 24, № 4.— P.

- 399-402 (*Внесок дисертанта: статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
27. Isaeva E. Effect of neuraminidase blocker on neuronal activity and formation of hippocampal synapses // A.V. Savrasova, I. Lushnikova, E. Isaeva, G. Skibo, D. Isaev // International Conference "Molecular mechanisms of intracellular calcium signaling".– Kiev, Ukraine, October 11 – 13, 2009. – P. 23 (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень*).
 28. Isaeva E. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current / E. Isaeva, A. Hernan, D. Isaev, G. L. Holmes // Ann. Neurol.– 2012. – 72, № 2.– P.192 - 8. (*Внесок дисертанта: планування експериментальних досліджень, узагальнення результатів*).
 29. Isaeva E. Neuraminidase inhibition primes short-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in the rat hippocampus // A. Savotchenko, A. Romanov, D. Isaev, O. Maximyuk, V. Sydorenko, G. L. Holmes, E. Isaeva / Neural. Plast. –2015.–2015:908190. (*Внесок дисертанта: планування і проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів*).
 30. Isaeva E. Effects of volatile anesthetic isoflurane on the GABAergic signaling in the CA1 pyramidal cells of immature rat hippocampus / E. Isaeva, D. Isaev, R. Khazipov, G. L. Holmes // 60st Annual Meeting of American Epilepsy Society.– San Diego, CA, USA, 2006.– Epilepsia. –Abstract Book.– 2.181 (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
 31. Isaeva E. Phenothiazine class antipsychotics inhibit the function of the human $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor / O. Isaeva, A. Ashour, K.-H. Yang, S. Nurulain, G. Petroianu, M. Hasan, M. Oz // Annual Meeting of Society for Neuroscience.– San Diego, CA, USA.– Nov. 13-17, 2010.– 880.22/NN13. (*Внесок дисертанта: статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
 32. Isaeva E. Alteration of synaptic plasticity by neonatal seizures in rat somatosensory cortex / E. Isaeva, D. Isaev, G. L. Holmes // Epilepsy Res.– 2013.– 106, № 1-2.– P. 280 – 3. (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
 33. Isaeva E. Effect of neonatal seizures on spontaneous and miniature inhibitory postsynaptic currents in rat somatosensory cortex / E. Isaeva, D. Isaev, G. L. Holmes // Annual Meeting of American Epilepsy Society.– Boston, MA, USA, December 4 - 8, 2009.– P. 3.343. (*Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді*).
 34. Isaeva E. Blockade of endogenous neuraminidase leads to alteration of long- and short-term plasticity in rat hippocampus / A.V. Savrasova, O.V. Isaeva, D. S. Isaev // Development and plasticity of cortical representation.– FENS-IBRO Summer School.–

Bertinoro, Italy, June 05 - 10, 2011. – P.56. *(Внесок дисертанта: статистична обробка даних, узагальнення результатів).*

35. Isaeva E. Thrombin facilitates seizures through activation of neuronal persistent sodium current: a new mechanism of seizure developed during intracerebral hemorrhage / E. Isaeva, A. Hernan, D. Isaev, G. L. Holmes // 10th European Congress on Epilepsy. – London, UK, 2012.– P.825 *(Внесок дисертанта: планування експериментальних досліджень, узагальнення результатів, виступ з доповіддю на з'їзді).*
36. Isaeva E. The effect of early life seizures on synaptic plasticity in the prefrontal cortex later in life / A. E. Hernan, G. L. Holmes, E. Isaeva // Gordon conference: mechanisms of epilepsy and neuronal synchronization. – Colby College, Waterville, ME, USA. – 8-13 August, 2010. – e17 *(Внесок дисертанта: проведення експериментальних досліджень, статистична обробка даних, узагальнення результатів).*

АНОТАЦІЯ

Ісаєва О. В. Вплив епілептиформної активності на функціонування головного мозку щурів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

У дисертаційній роботі представлені результати морфофункціональних досліджень наслідків епілептиформної активності в період раннього розвитку на функціонування головного мозку щурів, а також механізмів розвитку набуті епілепсії, спровокованого формуванням епілептичного статусу. Проведено детальний аналіз морфологічних та електрофізіологічних змін у головному мозку щурів та змін поведінкових феноменів у цих тварин, спричинених впливами епілептиформної активності. Встановлені деякі загальні закономірності і механізми пластичних змін синаптичної передачі у тварин з історією неонатальної епілептиформної активності. Виявлені особливості модуляції збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі, показані тривалі зміни збудливості нервових мереж і синаптичної пластичності у щурів з наявністю епілептиформної активності в період раннього розвитку. Досліджено вплив епілептиформної активності, локалізованої в префронтальній корі, на різні форми поведінки дорослих щурів. Вперше досліджено роль тромбіну і його молекулярних рецепторів, протеазаактивованих рецепторів 1, в епілептогенезі спровокованому формуванням епілептичного статусу. Встановлено нейропротекторний та антиепілептогенний ефекти інгібування цих рецепторів.

Ключові слова: епілепсія, епілептиформна активність, епілептогенез, розвиток нервової системи, синаптична пластичність, поведінкові розлади, тромбін.

АННОТАЦИЯ

Исаева Е. В. Влияние эпилептиформной активности на функционирование головного мозга крыс. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

В диссертационной работе представлены результаты морфофункциональных исследований последствий индукции эпилептиформной активности (ЭФА) в период раннего развития на функционирование головного мозга крыс, а также механизмов развития эпилепсии, спровоцированного эпилептическим статусом. Исследования, проведенные на различных участках головного мозга крыс в условиях *in vitro*, показали, что повторяющиеся судорожные припадки, вызванные ингаляцией флуротила в раннем возрасте, приводят к существенному хроническому снижению порога возникновения ЭФА в соматосенсорной коре крыс, хроническим нарушениям тормозной синаптической передачи в нейронах гиппокампа, соматосенсорной коры и медиальной зоны префронтальной коры, а также к расстройствам возбуждающей синаптической передачи в нейронах соматосенсорной коры. Результаты исследования влияний индуцированной генерализованной и парциальной ЭФА на феномен синаптической пластичности в синапсах соматосенсорной коры и медиальной зоны префронтальной коры крыс показали, что ЭФА, спровоцированная в период раннего развития, приводит к хроническому усилению долговременной потенциации вызванных постсинаптических потенциалов в соматосенсорной коре и существенным изменениям кратковременной пластичности в синапсах медиальной зоны префронтальной коры крыс. С использованием разработанной нами экспериментальной модели индукции ЭФА, локализованной в префронтальной коре, исследовано влияние парциальных эпилептических приступов в раннем возрасте на различные формы поведенческих феноменов у взрослых крыс. Показано, что повторяющаяся ЭФА, спровоцированная внутрицеребральными инъекциями бикакуллина в префронтальную кору в период раннего развития, не приводит к существенным нарушениям локомоторной активности, уровня тревожности, мотивации, поведенческой гибкости и зависимость от функции префронтальной коры компонента оперативной памяти животных. В то же время она обуславливает значительный дефицит внимания и дефектность социального поведения животных. Впервые исследована роль тромбина и его молекулярных рецепторов, протеазаактивированных рецепторов 1 (ПАР1) в эпилептогенезе, спровоцированном индукцией эпилептического статуса. Показано, что инъекции селективного антагониста ПАР1 в течение первых десяти дней после эпилептического статуса приводят к значительному снижению смертности и заболеваемости животных, нормализации экспрессии данных рецепторов в зоне СА1 гиппокампа, уменьшению интенсивности гибели клеток в этой зоне, угнетению генерации ЭФА в данной зоне гиппокампа в течение первых двух недель после эпилептического статуса, а также к снижению вероятности развития спонтанных судорожных поведенческих припадков. Полученные данные в значительной степени

расширяют существующие представления о влиянии неонатальной ЭФА на ряд аспектов функционирования головного мозга и о механизмах развития приобретенной эпилепсии.

Ключевые слова: эпилепсия, эпилептиформная активность, эпилептогенез, развитие нервной системы, синаптическая пластичность, поведенческие расстройства, тромбин

SUMMARY

Isaeva E. V. The impact of epileptiform activity on rat brain functioning. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of biological sciences, specialty 03.00.13 – human and animal physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kiev, 2016.

We investigated the effects of early-life epileptiform activity on the brain functioning and mechanisms of the development of acquired epilepsy provoked by status epilepticus. Studies conducted on different models of epileptiform activity during development reveal the long-term changes in the excitability of neuronal networks and synaptic plasticity in different brain regions of rats with neonatal seizures. Using a new model of epileptiform activity localized in prefrontal cortex, we found substantial behavioral changes in attention and sociability in animals with a history of early-life epileptiform activity. Finally, the role of thrombin and its molecular receptor in the brain, protease-activated receptor 1, on the development of temporal lobe epilepsy was investigated. Our data suggests that thrombin-dependent signaling pathway contributes to epileptogenesis following status epilepticus and that the inhibition of protease-activated receptor 1 results in neuroprotective and anti-epileptogenic effects.

Keywords: epilepsy, epileptiform activity, epileptogenesis, the development of the nervous system, synaptic plasticity, behavioral disorders, thrombin