

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

ФЕДОРЮК МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧ

УДК 577.352:612.014:612.825.1:611.813:591.512:
591.513:599.323.45:616.853

**РОЛЬ ПРОТОН-ЧУТЛИВИХ ІОННИХ КАНАЛІВ
В ЕЛЕКТРИЧНІЙ АКТИВНОСТІ ГІПОКАМПА ТА ПОВЕДІНЦІ ЩУРІВ
У МОДЕЛІ ІНДУКОВАНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ**

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2020

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук, академік НАН України
Кришталь Олег Олександрович
зав. відділом фізико-хімічної біології клітинних мембран,
директор Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН
України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики
ННЦ “Інститут біології та медицини”
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка

кандидат медичних наук, доцент
Крилова Вікторія Юрївна
кафедра неврології
Національний медичний університет імені О.О.
Богомольця

Захист відбудеться 20 жовтня 2020 р. о 16 годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Академіка Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4 та на сайті: http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий 18 вересня 2020 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



Любанова О. П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. З моменту відкриття “рецепторів до протонів”, які згодом були клоновані групою французьких дослідників і отримали назву ASICs (acid-sensing ion channels), пройшло більше ніж три десятиліття, проте повна картина їх функціональної ролі у периферичній та центральній нервовій системі досі залишається не з’ясованою (Krishtal & Pidoplichko, 1980; Waldmann et al., 1997).

ASICs широко розповсюджені як в периферичній (ПНС) так і в центральній нервовій системі (ЦНС) хребетних тварин. Щільність експресії тих чи інших субодиниць суттєво відрізняється в залежності від їх локалізації. Так, субодиниці ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b частіше зустрічаються в ЦНС, в таких областях мозку як гіпокамп, мигдалевидне тіло, мозочок, смугасте тіло, кора великих півкуль і нюхові цибулини, тоді як субодиниці ASIC1b та ASIC3 переважають в ПНС, і їх можна зустріти у чутливих нейронах задніх корінців спинного мозку, трійчастого і блукаючого нервів (Wemmie et al., 2003).

Активація ASICs спричиняє транзйентний іонний трансмембранний струм, що знижується внаслідок процесу десенситизації. Останні дослідження вказують на те, що зміна активності даних каналів задіяна у багатьох неврологічних та психічних розладах, отже, фармакологічний вплив на них є перспективним шляхом корекції таких патологій. Проте пошук штучних селективних лігандів цих каналів, котрі можна було б застосувати як терапевтичні агенти, ще триває (Chu XP, Xiong ZG, 2013; Grunder S, Chen X, 2010; Wemmie et al., 2006). Поряд з цим, ASICs залучені до нормальних фізіологічних процесів пам’яті, навчання тощо, а отже потенційний фармакологічний агент має змінювати функції ASIC-каналів за умов патології, при цьому не впливаючи на їх функцію у нормі (Wemmie et al., 2006; Benarroch EE, 2014). Раніше було розроблено селективний ортостеричний антагоніст ASIC1a-каналів – сполуку 5b, що пригнічує їх активність у субмікромолярному концентраційному діапазоні (Buta et al., 2015; Sukach et al., 2011). Активність 5b на три порядки вища, коли ASIC-струми активуються незначним закисленням (pH 6.7; подібні значення спостерігаються в осередках епілептичної активності та при умовах фокальної ішемії), порівняно з активацією сильним закисленням (pH 5.0; може виникати у синаптичній щілині внаслідок нейронної активності).

Дослідження з використанням експериментальних моделей епілепсії показали, що епілептичні напади призводять до закислення міжклітинного середовища (Somjen G.G., 1984, Xiong et al., 2000). Зниження pH головного мозку під час інтенсивного збудження або епілептиформної активності нейронів може вказувати на те, що активація ASIC1a може відігравати певну роль у генерації та підтримці епілептичних нападів (Chen et al., 2005; Lv et al., 2011).

Епілепсія може супроводжуватися супутніми розладами, серед яких є депресивні та тривожні стани (Hingray et al., 2019). У той же час, вивчення таких супутніх симптомів та пошук шляхів їх корекції наразі є недостатніми (Yogarajah et al., 2019).

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

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

Мета дослідження. Мета роботи полягає у дослідженні ролі протон-чутливих іонних каналів в регуляції електричної активності гіпокампа та поведінці щурів у експериментальній моделі епілепсії.

Завдання дослідження. Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Розробити пристрій для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів у поведінкових моделях.
2. Визначити роль протон-чутливих іонних каналів у формуванні спонтанної активності клітин гіпокампа у каїнатній моделі індукованої епілепсії.
3. Оцінити гіпокампальний тета-ритм та такі поведінкові реакції щурів, як локомоторна активність та тривожність в умовах блокади протон-чутливих іонних каналів.
4. Визначити роль протон-чутливих іонних каналів у формуванні поведінкових реакцій щурів у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії.

Об'єкт дослідження – електрична активність нейронів гіпокампа та поведінкові реакції щурів.

Предмет дослідження – зміни активності нейронів гіпокампа та поведінкових реакцій щурів в умовах блокади ASICs.

Методи дослідження. Експериментальне моделювання епілепсії з використанням літій-пілокарпінової та каїнатної моделей, електрофізіологічна реєстрація потенціалів нейронів гіпокампа *in vivo* за допомогою імплантованих реєструючих електродів, оцінка змін поведінкових параметрів у тестах “відкрите поле” та “піднятий хрестоподібний лабіринт” (локомоторна активність, тривожність, просторова пам'ять), оцінка ефекту фармакологічної блокади ASIC-каналів, статистична обробка результатів.

Наукова новизна роботи. Вперше показано, що блокада провідності ASIC за допомогою новітнього антагоністу 5b пригнічує епілептиформну активність нейронів зони CA1 гіпокампа *in vivo* в умовах каїнатної моделі епілепсії.

Для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів під час поведінкових тестів було розроблено бездротовий пристрій, який має значні переваги у порівнянні з аналогами.

Вперше продемонстровано, що блокування активності ASIC-каналів призводить до зниження домінуючої частоти тета-ритму та загального рівня локомоторної активності в тесті “відкрите поле”, а також певну нормалізацію поведінки тварин після індукції епілепсії у тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт” та нормалізації емоційнозумовленого навчання, зниженого внаслідок

епілепсії.

Теоретичне та практичне значення роботи. Результати, отримані в роботі, мають здебільшого фундаментальне значення, оскільки демонструють залучення ASIC-каналів до регуляції надмірної синхронної активності нейронів гіпокампа.

Практичне застосування результатів цієї роботи може допомогти у розробці антиепілептичних препаратів, а також у проектуванні пристроїв моніторингу та реєстрації електроенцефалограми у тварин.

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

Апробація результатів дисертації. Результати дослідження були представлені на VII Міжнародному конгресі Українського біофізичного товариства (Київ, 2018), The Inaugural Workshop of UNESCO/UNITWIN Network on PhD Education and Research in Biophysics, Biotechnology and Environmental Health, (Garni, Armenia, 2018), 20-му з'їзді Українського фізіологічного товариства (Київ, 2019), 35-му симпозіумі Ернста Кленка з молекулярної медицини (Кельн, 2019), Міжнародному симпозіумі “100 years of microglia” (Lausanne, 2019), VIII-му з'їзді Українського біофізичного товариства, (Київ, 2019), 8-а Міжнародна конференція з кібер-фізичних систем та інтернет-речей «CPS & IoT'2020» (Будва, 2020), 9-ій середземноморській конференції з вбудованих систем «MECO'2020» (Будва, 2020).

Публікації. За результатами роботи було опубліковано дві статті у фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, у тому числі одна стаття у науковому виданні, віднесеному до першого квартилю відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, шість тез доповідей на конференціях та два патенти.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів досліджень, обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел із 121 посилання, 1 додатку та 44 рисунків. Загальний обсяг дисертації становить 124 сторінки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Літературний огляд. Розглянута історія відкриття та дослідження протон-чутливих іонних каналів, їх структура та розподіл в тканинах, описане функціонування і роль у нормі та при патології.

Методологія.

Об'єкт дослідження. Досліди були проведені на лабораторних щурах лінії Wistar віком 60 діб на момент початку експерименту. Тварин утримували в приміщенні із контрольованими температурою та циклом освітлення (22°C, світла фаза починалася о 20:00 і тривала 12 год), їжа і вода були доступні *ad libitum*. Експерименти та тести виконували під час темної фази. Досліди

проводили згідно з існуючими міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин, зокрема Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV.

Методи дослідження.

Реєстрація електричної активності гіпокампа у іммобілізованих щурів.

Тварин анестезували за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції уретану 1,5 г/кг і лише при повній відсутності рефлексів проводили хірургічну операцію по імплантації електродів для реєстрації позаклітинних потенціалів у пірамідальний клітинний шар зони CA1 гіпокампа (3.8 мм *posterior*, 2.5 мм *lateral* від брегми та 2.0 мм *below dura*) та канюлі для внутрішньогіпокампальної ін'єкції каїнату або блокатора ASIC-каналів. Референсний та заземлюючий електроди імплантували в мозочок. Після стабілізації сигналу (5–10 хв) проводили реєстрацію електричної активності. Електричні сигнали підсилювали (до 1000 разів), фільтрували у межах 0,1–5000 Гц за допомогою диференційного підсилювача (AM Systems, Carlsborg, WA, США) та оцифровували на 10 кГц за допомогою АЦП перетворювача (NI USB-6009, National Instruments, Austin, TX, США). Аналіз електрограми гіпокампа проводили з використанням Clampfit (Molecular Devices, San Jose, CA, США) та Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, США).

Реєстрація електричної активності гіпокампа у щурів під час поведінкових тестів. Хірургічну операцію здійснювали під загальним наркозом, який робили за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції анестетику (суміші кетаміну та ксилазину 80 та 8 мг/кг відповідно). Підготовку до закріплення у стереотаксисі та хірургічного втручання проводили, як зазначено вище. Електроди імплантували через просвердлений отвір у лівий гіпокамп (*posterior* 3.5 мм, *lateral* 1.8 мм, *below dura* 2.9 від брегми). Референтний електрод розташовували у мозочку. Кінці електродів під'єднували до масиву контактів, які потім фіксували спеціальним полімером (Протакрил-М, «СТОМА», Харків, Україна). Розріз шкіри зашивали шовковою ниткою або склеювали медичним клеєм Бф-6 (ВАТ «Лубнифарм», Лубни, Україна). Термін відновлення після операції становив не менше, ніж один тиждень. Реєстрацію електричної активності гіпокампа проводили за допомогою бездротових пристроїв – Neurologger (NewBehavior AG, Zürich, Швейцарія) та спеціально розробленим разом із колегами приладом (патент 140101, Україна). Аналіз електричної активності гіпокампа здійснювався за допомогою пакета Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA).

Каїнатна та літій-пілокарпінова моделі індукованої епілепсії. Каїнатну модель епілепсії робили на уретано-анестезованих щурах. Через імплантовану канюлю робили ін'єкції каїнату (1 мкмоль) в гіпокамп (область CA1). Після другої ін'єкції каїнату викликалась епілептиформна активність.

Літій-пілокарпінову модель епілепсії робили наступним чином. Для індукції епілепсії (IE) за 20–22 години до введення пілокарпіну щурам вводили внутрішньочеревно хлорид літію (127 мг/кг). Перша доза пілокарпіну становила 30 мг/кг, а через кожні 30 хв вводили дози 10 мг/кг доки не розвивались судомні напади (стадія Racine IV-V, епілептичний статус (ЕС)). Якщо після введення

загального об'єму 60 мг/кг пілокарпіну у щурів не виникали напади, то їх виключали з експерименту. Напади припиняли ін'єкцією діазепаму (40 мг/кг) через годину після ЕС. Поведінкові тести проводили через два тижні після ІЕ.

Поведінковий тест “відкрите поле”. Експериментальна установка тесту являла собою квадратне поле (100 см x 100 см x 30 см), умовно розділене на внутрішній та зовнішній периметри. Межа між сегментами була визначена на відстані 20 см від стінок установки. Тварину поміщали в центр поля і здійснювали відеореєстрацію її поведінки за допомогою ІР (Internet Protocol) камери (Intervision, Україна) протягом 5 хв. Отримані відеозаписи аналізували за допомогою автоматизованої процедури AutoTyping, реалізованої в середовищі Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA).

Поведінковий тест “піднятий хрестоподібний лабіринт”. Експериментальна установка являє собою підняте хрестоподібне поле з двома протилежними відкритими рукавами (50 см x 10 см) та двома закритими рукавами (50 см x 10 см x 30 см). Вся установка піднята на висоту 50 см від підлоги. Центральна частина перехрестя являє собою квадрат зі сторонами 10 см у який, обличчям до відкритого рукава, розташовується тварина на початку теста. Дослід записували та аналізували аналогічно до тесту “відкрите поле”.

Поведінковий тест на дослідження пам'яті, що зумовлена страхом. Тварин за день до тестування адаптували до тестової системи. Експериментальна установка являла собою плексигласовий бокс (50x40x40 см) з непрозорими стінками, який розташовували у звукоізолюваній кімнаті з освітленням 600 Лм. За допомогою контролера на платформі Arduino (Arduino SRL, Італія) автоматично подавали звуковий та електричний стимули. Звуковий сигнал (10 кГц, 75 дБ, 20 с) надходив через під'єднаний до Arduino динамік (1 Вт, 8 Ом), розташований у верхній частині боксу. Підлога боксу – металева решітка, на яку подається електричний стимул (0.5 мА, 0.5 с). Експеримент проводили два дні: навчання та тестування пам'яті відповідно. У перший день після поміщення тварини у тестовий бокс через хвилину роздавався звуковий сигнал, одразу по закінченні якого надходив електричний розряд. Зазначена пара стимулів повторювалась тричі з інтервалом 1 хв. На другий день процедуру проводили без електричної стимуляції. Поведінку тварин записували за допомогою ІР камери, після чого аналізували відеозаписи.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Залучення протон-чутливих іонних каналів до регуляції епілептиформної активності у гіпокампі щурів.

Семи уретано-анестезованим щурам через імплантовану канюлю робили ін'єкції каїнату в гіпокамп (область СА1) та реєстрували електричну активність цієї ділянки.

Каїнат або каїнова кислота являє собою агоніст АМРА та каїнатних рецепторів і також є доволі потужним епілептогенним засобом. Місцеве введення каїнату у гіпокамп *in vivo* викликає складну епілептиформну активність (ЕА) високої частоти (20–80 Гц) і після латентного періоду призводить до

розвитку морфологічних та функціональних змін у всій лімбічній системі, починаючи з гіпокампа, так як саме у цій структурі даний рецептор експресується дуже щільно (Dudek et al., 2002; Khazipov, 2003). Ці зміни призводять до появи спонтанних нападів характерних для скроневої епілепсії.

Після другої ін'єкції каїнату викликалась ЕА, яка тривала щонайменше 80 хв (Рис. 1) . Кожна послідовна ін'єкція викликала подібну активність.

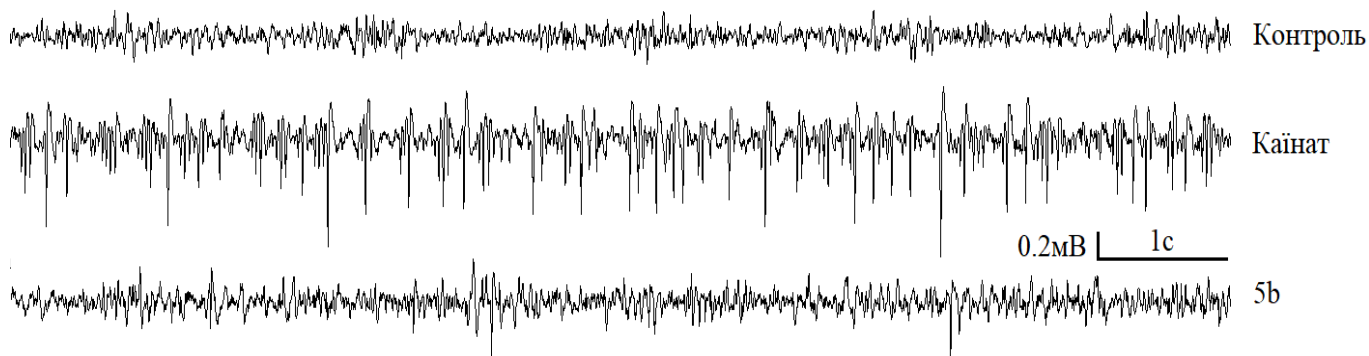


Рис. 1. Сполука 5b зменшує епілептиформну активність у гіпокампі, індуковану ін'єкцією каїнату *in vivo*.

Використовуючи антагоніст ASIC-каналів – сполуку 5b – ми намагалися з'ясувати можливу роль цих каналів у формуванні спонтанної активності гіпокампа.

Ін'єкцією каїнату ми викликали довготривалу ЕА. Застосування 4 мкл розчину, який містив сполуку 5b (1 мкмоль), після 20 хв стійкої ЕА призвело до зменшення частоти епілептиформних розрядів (5.6 ± 0.4 Гц проти 1.38 ± 0.4 Гц, в умовах ЕА та при 5b відповідно, $p = 0.002$, $n = 7$, рис. 2).

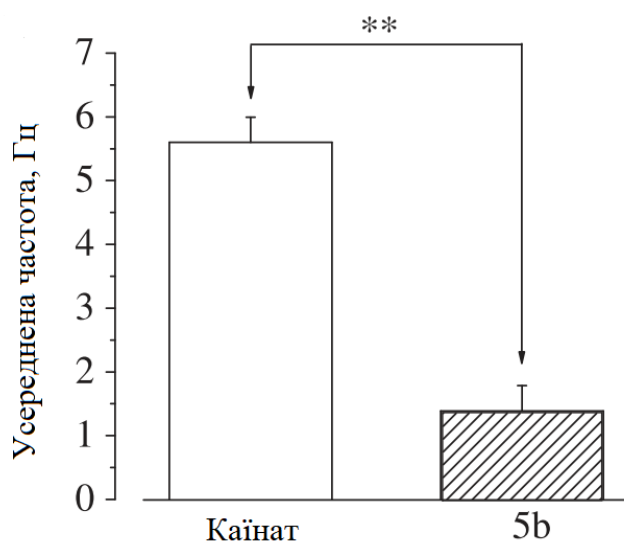


Рис. 2. Вплив сполуки 5b на частоту індукованих каїнатом нападів у гіпокампі щурів (** $p < 0.005$, $n=7$). Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

Як свідчать дані, в усіх випадках ін'єкція сполуки 5b в тканини гіпокампа в значній мірі зменшувала частоту ЕА, викликану ін'єкцією кайнату.

2. Роль протон-чутливих іонних каналів у електричній активності гіпокампа щурів у поведінковій моделі “відкрите поле”.

Двадцять тварин, яким було зроблено операції по вживленню реєструючих електродів, після адаптації розділили на дві групи по 10 у кожній: контрольну та дослідну. На початку експерименту всі тварини знаходились в домашніх клітках. Кожній тварині приєднали до електродів на голові бездротовий пристрій та розпочали реєстрацію електричної активності гіпокампа. Через 20 хв після цього шурам робили внутрішньочеревинну ін'єкцію фізіологічного розчину або антагоніста ASIC1a-каналів сполуки 5b (10 мкмоль/кг). Ще через 20 хв після ін'єкції проводили тест “відкрите поле” (ВП).

Зміни у локомоторній активності щурів під дією блокатора ASICs.

Поведінковий тест ВП дозволяє оцінити локомоторну активність тварини, рівень тривожності, дослідницької діяльності та ін. Локомоторна активність оцінюється за сумарною пройденою дистанцією. Менша пройдена дистанція може вказувати на низьку функцію моторної системи мозку, а більша, в свою чергу, на підвищену активність моторної системи.

Для порівняння пов'язаних вибірок використовували непараметричний критерій Вілкоксона, для незалежних вибірок – критерій Манна-Уїтні. Результати представлені у вигляді Me [LQ; HQ], де Me – медіана, LQ – нижній кuartиль, HQ – верхній кuartиль розподілу.

Аналіз поведінки тварин у ВП виявив, що сполука 5b істотно впливала на загальний рівень локомоторної активності.

Так, сумарний пройдений шлях становив 29.8 [26.3; 31.8] м у контрольних та 13.0 [10.7; 23.3] м у тварин під дією 5b ($p < 0.01$) (Рис. 3). Значущих відмінностей інших параметрів поведінки в тесті ВП не виявлено.

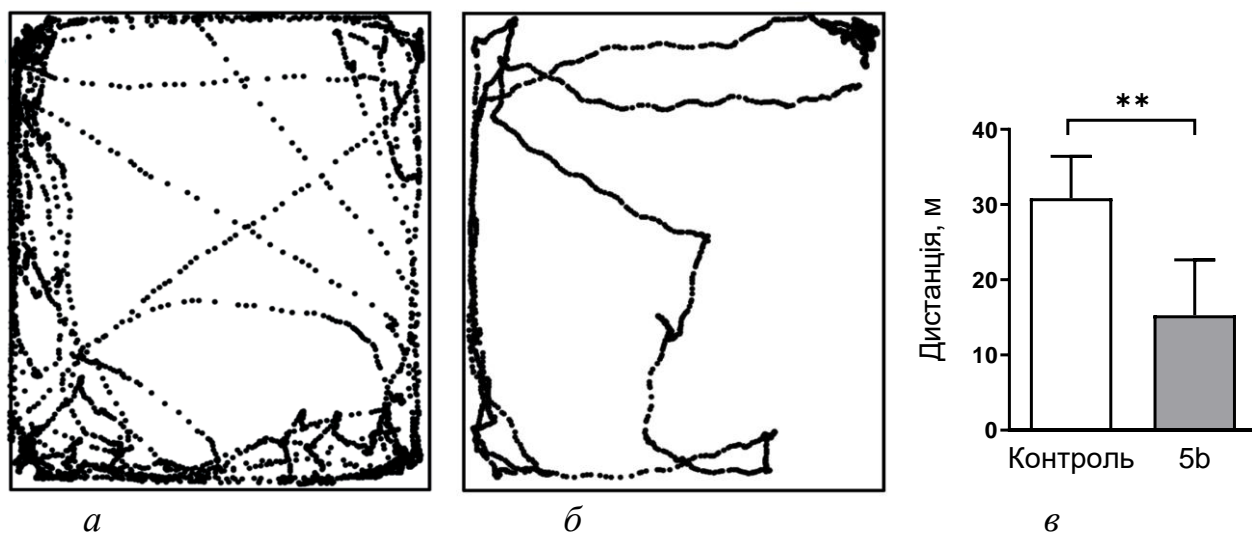


Рис. 3. Локомоторна активність щурів у тесті ВП: а – репрезентативна траєкторія переміщення контрольної тварини, б – репрезентативна траєкторія переміщення тварини під дією сполуки 5b, в – сумарна пройдена шурами дистанція (контроль $n=10$, 5b $n=10$, $p < 0.01$).

Тривалість часу, проведеного у зовнішній частині тесту, становила 284 [267; 286] с у контрольних та 299 [282; 300] с у дослідних тварин ($p = 0.06$); тривалість часу, проведеного в центральній частині арени – 17 [14; 33] с та 1 [0; 18] с відповідно ($p = 0.06$). Такі зміни у локомоторній активності є характерними для седативних речовин, що потенціюють гальмівну систему мозку, зокрема, бензодіазепінів (Djeridane et. al., 2005; Prut and Belzung, 2003).

Зміни у електричній активності гіпокампа під дією блокатора ASICs.

Відомо, що головним молекулярним механізмом гальмування у нейронних мережах гіпокампа є активація ГАМК-рецепторів. Наші експерименти з епілептиформною активністю, викликаною каїнатом, показали, що пригнічення активності ASIC-каналів підвищує гальмівну синаптичну передачу та зменшує частоту виникнення епілептиформних явищ. Такий результат дає змогу зробити висновок, що ASIC-канали в гіпокампі виконують збуджувальну функцію на системному рівні. ГАМК-провідність відіграє істотну роль у генерації тета-ритму, який, в свою чергу, пов'язаний із особливостями дослідницької діяльності тварин (Hoeller et. al., 2013). Особливість зв'язку ASIC-каналів та ГАМК-рецепторів дала можливість висунути гіпотезу про те, що зменшення активності ASIC у гіпокампі може суттєво впливати на профіль електричної активності цієї структури (Takács et. al., 2018). У зв'язку з цим, було вирішено проаналізувати зміни електричної активності гіпокампа під впливом антагоніста ASIC-каналів сполуки 5b. Для аналізу були доступні електричні реєстрації 8 щурів у кожній з груп (Рис. 4, 5).

Порівняння гіпокампальної електричної активності під час перебування у домашній клітці перед початком поведінкового тесту не виявило статистично значущої різниці між тваринами контрольної та дослідної груп.

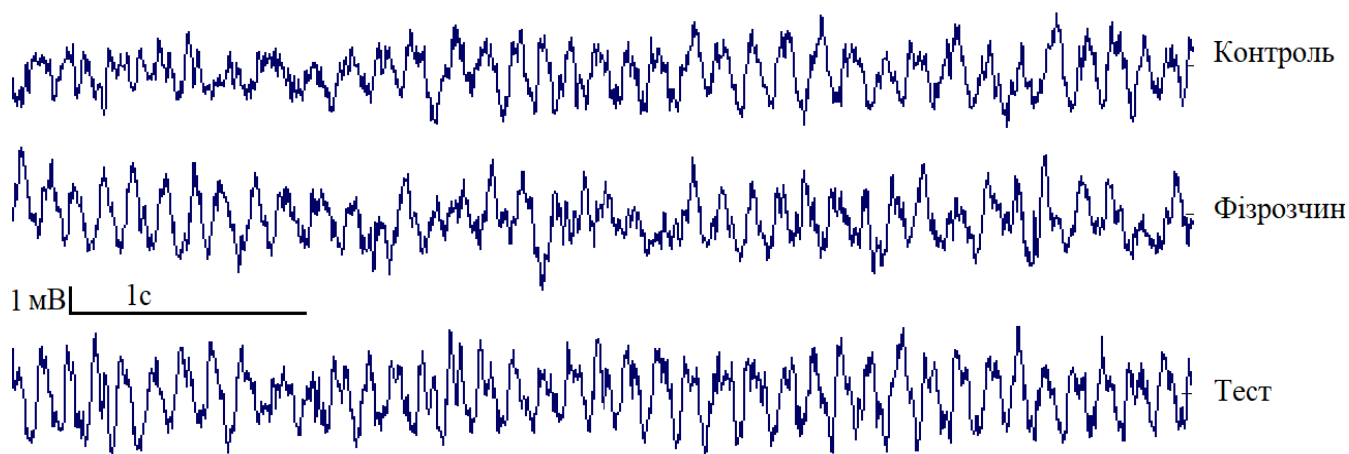


Рис. 4. Електрична активність гіпокампа щура контрольної групи під час знаходження у домашній клітці (Контроль), після ін'єкції фізрозчину у домашній клітці (Фізрозчин) та під час поведінкового тесту ВП (Тест).

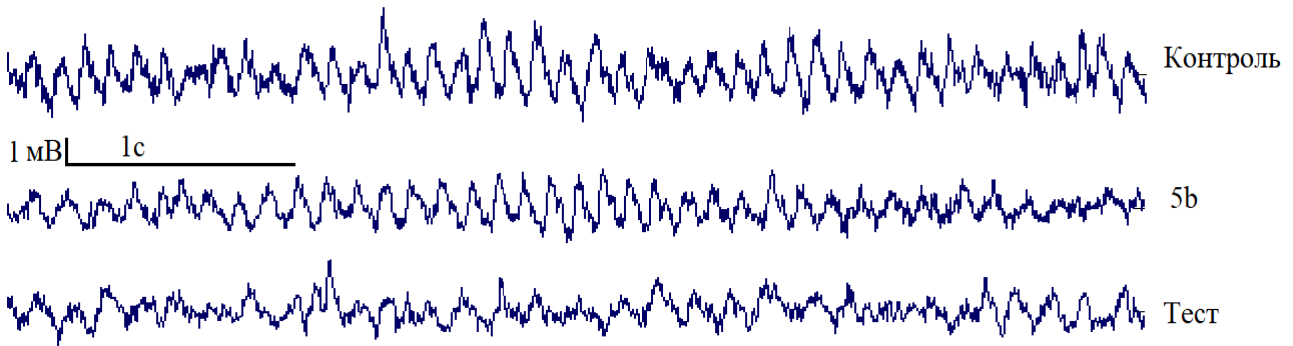


Рис. 5. Електрична активність гіпокампа щура дослідної групи під час знаходження у домашній клітці (Контроль), після ін'єкції сполуки 5b у домашній клітці (5b) та під час поведінкового тесту ВП (Тест).

Так, у щурів обох груп електрична активність гіпокампа характеризувалася домінуванням тета-активності із частотою 7.9 [6.6; 8.0] Гц та 7.3 [6.5; 8.1] Гц ($p = 0.54$; рис. 6) у контрольній та дослідній групі відповідно. Сумарна потужність тета-діапазону становила у контрольній групі 1267 [756; 3644] мкВ² та у дослідній 1905 [1098; 4835] мкВ² ($p = 0.79$).

Під час виконання тесту ВП вона залишилася однаковою у тварин обох груп: 1345 [656; 5263] мкВ² у контрольних та 3004 [1094; 4553] мкВ² у тварин під дією сполуки 5b ($p = 0.84$). Натомість істотно знизилася частота тета-активності: 7.9 [7.6; 8.1] Гц у контрольних тварин та 6.1 [6.0; 6.3] Гц на фоні дії 5b ($P=0.0043$; рис. 4б). Зниження частоти тета-ритму, незалежно від клітинного механізму його генерації, є характерним маркером для речовин, що мають анксиолітичну дію, таких як опіоїди, барбітурати, бензодіазепіни та селективні блокатори зворотного захоплення серотоніну (McNaughton et. al., 2007).

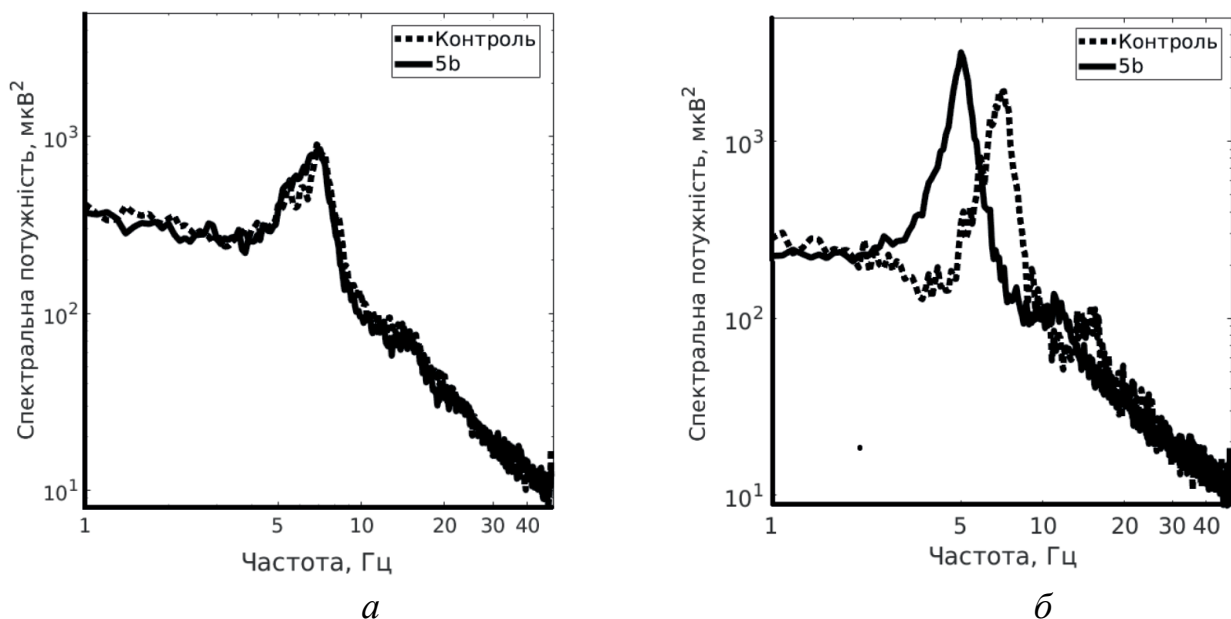


Рис. 6. Усереднені спектри потужності електричної активності гіпокампа у щурів контрольної та дослідної (під дією сполуки 5b) груп: а - під час перебування в домашній клітці на початку експерименту, б - під час перебування у ВП.

3. Залучення протон-чутливих іонних каналів до змін у поведінкових реакціях тварин з індукованою епілепсією.

Експеримент проводили через два тижні після ІЕ наступним чином: частина контрольних тварин та тварин з ІЕ за 20 хвилин до поведінкового тестування отримувала ін'єкцію сполуки 5b (1 мкмоль/кг), а інші – еквівалентну кількість фізіологічного розчину, потім проводили поведінковий тест ВП, ПХЛ або тест на пам'ять зумовлену страхом. Таким чином, кількість тварин різних груп у тестах становила відповідно: контроль (І) - 9/9/14, контроль+5b (ІІ) - 10/7/9, ІЕ (ІІІ) - 10/6/10, ІЕ+5b (ІV) - 8/7/10.

Для порівняння незалежних вибірок використовували критерій Манна-Уїтні, а для пов'язаних – критерій Вілкоксона (програмний пакет GraphPad Prism). Відмінності вважалися вірогідними при $p < 0,05$

Відкрите поле.

Аналіз поведінки тварин у ВП виявив, що поведінка тварин із ІЕ характеризувалась більшою варіабельністю параметрів локомоторної активності та часу знаходження у зовнішньому периметрі (Рис. 7).

Так тварини з ІЕ проводили менше часу в зовнішньому периметрі порівняно із контрольними (контроль 299 [296; 300] с, ІЕ 286 [275; 295] с, $p < 0.01$, рис. 8), а значущої різниці у сумарному переміщенні виявлено не було (контроль 24.6 [21.1; 30] м, ІЕ 29.8 [23.9; 48.8] м).

Сполука 5b збільшувала сумарну пройдену відстань (контроль 24.6 [21.1; 30.0] м, контроль+5b 34.9 [29.7; 41.8] м, $p < 0.05$) та зменшувала час перебування в зовнішньому секторі (контроль 299 [296; 300] с; контроль+5b 288 [287; 294] с, $p < 0.001$) у контрольних тварин.

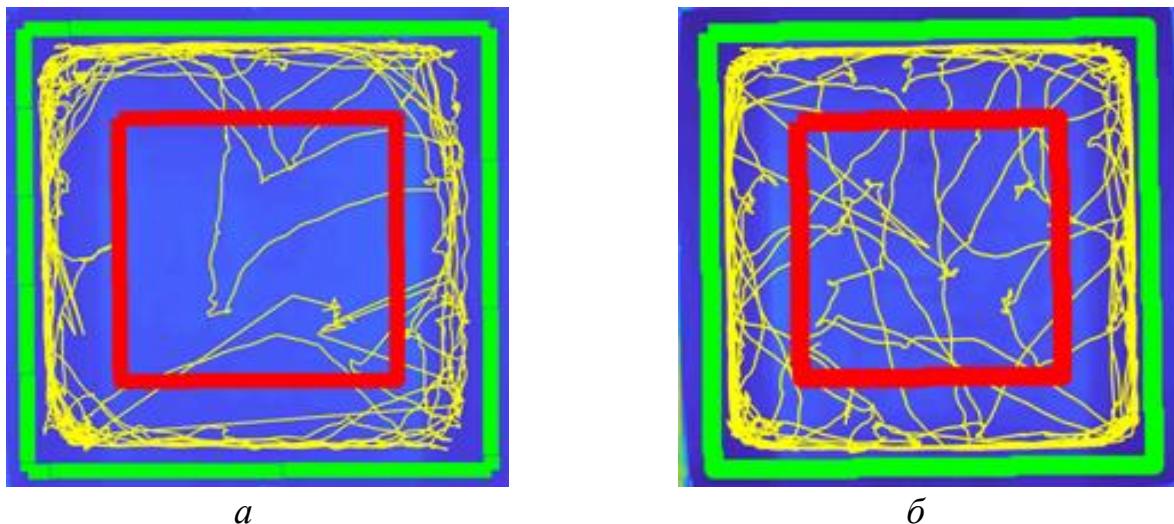


Рис. 7. Репрезентативна траєкторія руху щура у поведінковому тесті ВП: а - контрольної групи, б - групи з ІЕ. Щур з ІЕ демонстрував більшу локомоторну активність та менший час знаходження у зовнішньому периметрі тестової установки.

Значущу різницю було виявлено у часі перебування в зовнішньому периметрі між групами які отримували ін'єкції сполуки 5b (контроль+5b 288

[287; 294] с, ІЕ + 5b 279 [274; 290] с, $p < 0.05$), проте різниці у локомоторній активності виявлено не було (контроль+5b 34.9 [29.7; 41.8] м, ІЕ + 5b 39.8 [36.2; 45.7] м).

Також на фоні дії блокатора тварини з ІЕ менше часу проводили у зовнішньому периметрі та демонстрували збільшену пройдену відстань порівняно із контрольною групою (контроль 299 [296; 300] с, ІЕ + 5b 279 [274; 290] с, $p < 0.001$; контроль 24.6 [21.1; 30.0] м, ІЕ + 5b 39.8 [36.2; 45.7] м, $p < 0.001$).

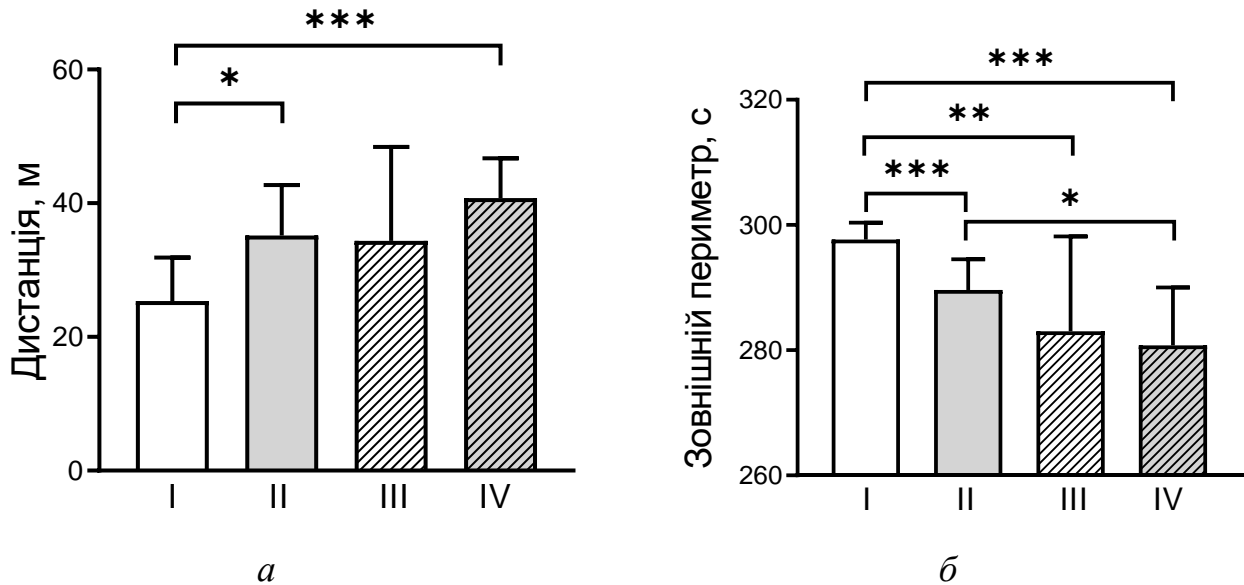


Рис. 8. Аналіз поведінки щурів у ВП: а - загальна пройдена дистанція, б - час знаходження у зовнішньому периметрі; I – контроль (n=9), II - контроль і блокатор (n=10), III - індукована епілесія (n=10), IV - індукована епілесія і блокатор (n=8); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

Піднятий хрестоподібний лабіринт.

Основна парадигма тесту “піднятий хрестоподібний лабіринт” (ПХЛ) базується на природній схильності щурів уникати відкритого оточення та тенденції до уникнення виходу з більш захищених частин установки. Тварини, які проводять більше часу у відкритих рукавах, демонструють менший рівень тривожності порівняно з тваринами, які віддають перевагу знаходженню у закритих рукавах. Поведінка тварин у тесті ПХЛ характеризувалася більшою кількістю міжгрупових відмінностей. Так, тварини з ІЕ сумарно проходили значно більшу відстань у порівнянні з контрольними (контроль 6.1 [5.8; 6.7] м, ІЕ 16.8 [10.5; 19.6] м, $p < 0.001$, рис. 9, рис. 10). При цьому, на відміну від контролю, вони проводили більшу частину часу у відкритих рукавах (контроль 9.5 [0; 26] с, ІЕ 189.5 [109.5; 225.8] с, $p < 0.001$, рис. 9, рис. 10).

Дія сполуки 5b у контролі призводила в тесті ПХЛ до збільшення сумарної пройденої дистанції (контроль + 5b 7.8 [7.5; 9.5] м, $p < 0.01$) та незначно змінила час перебування у відкритих рукавах лабіринту (контроль + 5b 32 [2; 52] с). Натомість, у тварин з ІЕ зміни, зумовлені дією блокатору, мали протилежний

характер: зниження пройденої відстані (ІЕ + 5b 8.4 [5.6; 9.8] м, $p < 0.01$) та зменшення часу перебування у відкритих рукавах (ІЕ + 5b 59 [5; 87] с, $p < 0.01$). Як наслідок, значущої різниці обох параметрів поведінки в ПХЛ між групами “ІЕ + 5b” та обома “контроль + 5b” і “контроль” не спостерігалось.



а



б

Рис. 9. Репрезентативна траєкторія руху щура у поведінковому тесті ПХЛ: а - контрольної групи, б - групи з ІЕ. Щур з ІЕ демонстрував більшу локомоторну активність та менший час знаходження у закритих рукавах тестової установки.

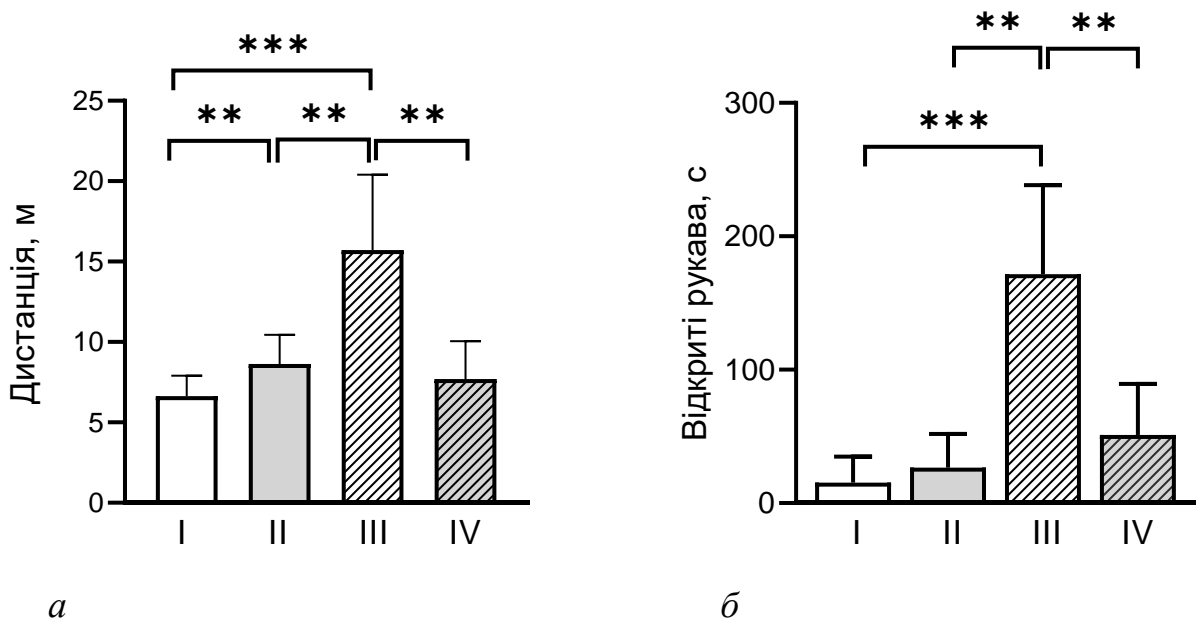


Рис. 10. Аналіз поведінки щурів у ПХЛ: а - загальна пройдена дистанція, б - час знаходження у відкритих рукавах; I – контроль (n=9), II - контроль і блокатор (n=7), III - індукована епілепсія (n=6), IV - індукована епілепсія і блокатор (n=7); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

Тест на пам'ять, що зумовлена страхом.

Аналіз поведінки тварин виявив істотну міжгрупову різницю тривалості контекстуального завмирання. Так, у контрольних тварин з блокатором та без нього у перший день цієї реакції майже не спостерігалось: 0,4, 0,2 с відповідно. Натомість, на другий день тривалість завмирання значущо зросла: у I групі – 3,5 с, у II – 8,5 с (рис. 11а). При цьому дія блокатора 5b призводила до збільшення показника порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Індукція епілепсії супроводжувалася зростанням часу завмирання порівняно з контрольними тваринами у перший день (без блокатора – 1,8 с, з блокатором – 1,2 с). На відміну від контролю збільшення часу завмирання на другий день набувало статистичної значущості лише на фоні дії блокатора (4,2 с; $p < 0,05$), але не у групі з індукованою епілепсією (3,9 с; $p > 0,05$). водночас цей параметр не відрізнявся між парами груп I і III, а також II та IV. Перше пред'явлення звуку на перший день експерименту без підкріплення больовим стимулом супроводжувалося розвитком помірного завмирання у перших двох групах (I – 0,7 с, II – 0,7 с, рис. 11б), час якого був дещо більшим у тварин інших груп (III – 2,3 с, IV – 1,4 с), але ця різниця не сягала рівня статистичної значущості. На другий день тривалість завмирання під час дії звуку істотно зросла порівняно із першим днем в усіх групах, за виключенням III (I – 6,2 с, II – 8,8 с, III – 4,7 с, IV – 4,4 с). При цьому дія сполуки 5b не позначалася на часі завмирання як в I-й, так і в III-й групі.

Порівняння часу завмирання після першого удару струмом показало, що у тварин з індукованою епілепсією він був меншим за контроль (I – 18,93 с, III – 10,9 с, рис. 12). Дія сполуки 5b майже не змінила цей час (II – 18,8 с, IV – 9,0 с).

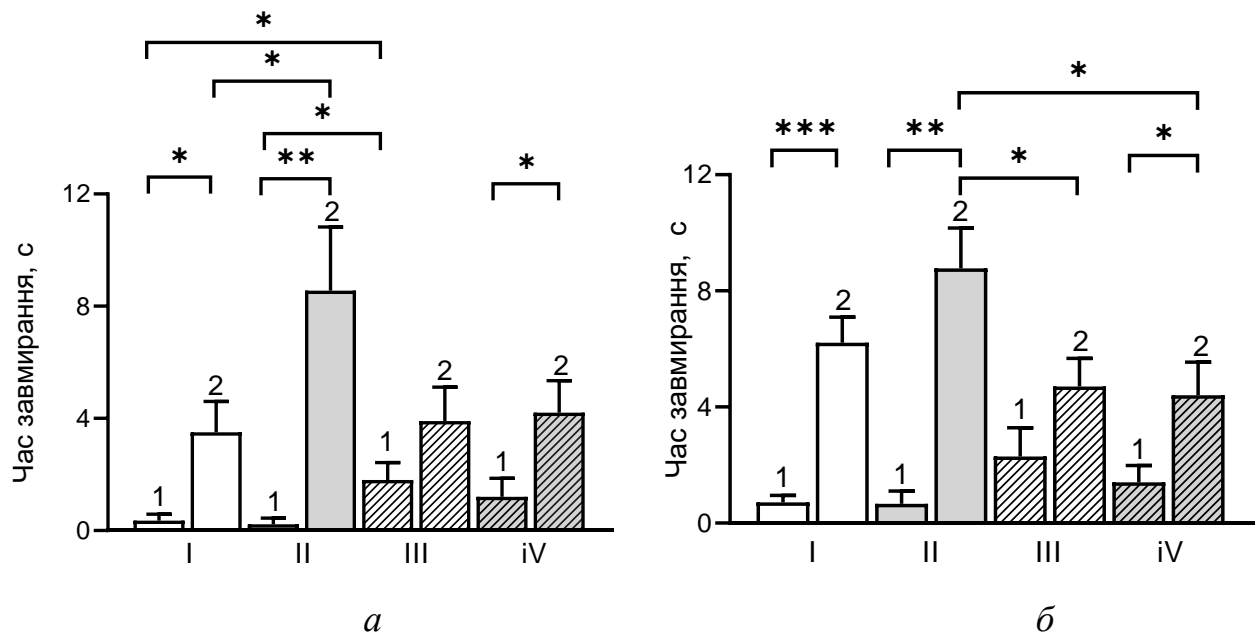


Рис. 11. Аналіз поведінки щурів у тесті на пам'ять, що зумовлена страхом: а – реакція на оточення, б – реакція на звуковий стимул; 1, 2 - дні експерименту; I – контроль ($n=14$), II - контроль і блокатор ($n=9$), III - індукована епілепсія (10), IV - індукована епілепсія і блокатор ($n=10$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

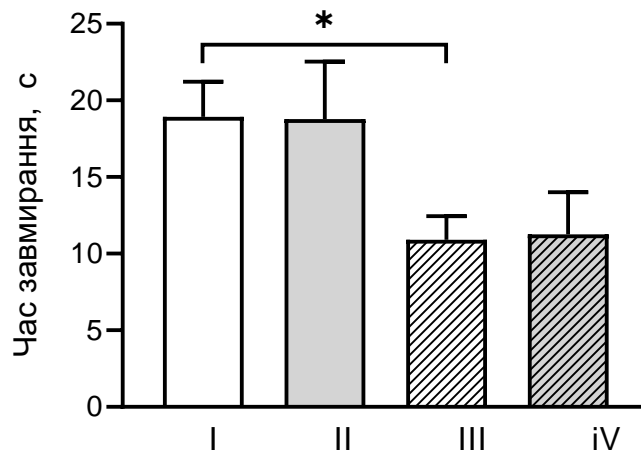


Рис. 12. Аналіз поведінки щурів у тесті на пам'ять, що зумовлена страхом: реакцією на електричний стимул; I – контроль ($n=14$), II - контроль і блокатор ($n=9$), III - індукована епілепсія (10), IV - індукована епілепсія і блокатор ($n=10$); * $p < 0.05$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

ASICs у гіпокампі щурів регулюють частоту епілептиформної активності викликаной каїнатом.

Відомо, що ASICs беруть участь у широкому спектрі нейрофізіологічних та патологічних процесів, таких як довготривала потенціація (LTP), нормальна поведінка, пов'язана зі страхом, навчання, формування пам'яті та ноцицепція під час запалення (Wemmie et. al., 2002; Wemmie et. al., 2003; Xiong et al. 2004). В мозку активація ASIC1a спричиняє надходження Ca^{2+} в нейрони, що під час тривалого ацидозу після ішемії може призвести до їх загибелі (Xiong et al. 2004; Xiong et al. 2007). ASICs виступають, як рецептори, що детектують швидкі зміни рН (Zeng et.al., 2015). Все це свідчить про більш ніж вражаючу роль ASICs у функції мозку, що відповідає їх присутності у всій мозковій тканині.

Одна із найпоширеніших моделей тваринної скроневої епілепсії, яка використовується для вивчення її механізмів розвитку, патофізіологічних змін ЦНС та фармацевтичної резистентності до антиепілептичних препаратів – каїнатна модель. Дослідження *in vitro* виявляють численні ділянки дії каїнату, включаючи активацію катіонних деполяризуючих струмів у пірамідальних клітинах гіпокампа та інтернейронах через рецептори глутамату (Ben-Ari та Cossart, 2000). Механізми мережевої синхронізації під час ЕА, спричиненої каїнатом, в гіпокампальних зрізах та інтактному гіпокампі *in vitro* включають процеси взаємного збудження, у тому числі за участі повторюваних колатеральних синапсів, що з'єднують між собою пірамідальні клітини гіпокампа. Дослідження гіпокампа також показують, що синхронізація індукованої каїнатом активності у діапазоні гамма-частот обумовлена як глутаматергічною передачею, так і синхронним гальмуванням, що забезпечується місцевими інтернейронами.

Наші експерименти з епілептиформною активністю спричиненою каїнатом в клітинах CA1 гіпокампа *in vivo* демонструють, що блокада провідності ASICs антагоністом 5b має помітний антиепілептичний ефект.

Частота гіпокампального тета-ритму щурів знижується під дією блокатора ASICs.

Відомо, що частота тета-ритму позитивно корелює зі швидкістю локомоції гризунів (Shin and Talnov, 2001). Сполука 5b суттєво не порушує функціонування фізіологічних механізмів генерації тета-активності гіпокампа, проте призводить до значних змін домінуючої частоти, що швидше за все є наслідком збільшення гальмівної активності. Зазвичай дія анксиолітиків у терапевтичних дозах супроводжується підвищеною локомоторною активністю, яка знижується зі збільшенням концентрації діючої речовини (Djeridane, 2005; Hughes, 1993). Зареєстровані в наших експериментах міжгрупові відмінності у поведінці узгоджуються зі змінами у електричній активності гіпокампа. Нами було виявлено, що зниження активності ASIC-каналів призводить до зниження як домінуючої частоти тета-ритму, так і загального рівня локомоторної активності в тесті ВП. Це може бути свідченням того, що активність таких каналів впливає на рівень тривожності, а отже фармакологічна маніпуляція ASIC-каналами має перспективи бути використаною як нова стратегія боротьби з депресивними та тривожними станами.

ASICs залучені до нормалізації поведінки щурів з індукованою епілепсією у тестах ПВ та ПХЛ.

Роль ASIC-каналів в організації системної діяльності головного мозку вивчена поки недостатньо, а наявні дані суперечливі. Виключення ASIC1a шляхом нокаута відповідного гена призводить до зниження депресивно-подібних характеристик поведінки, а саме збільшує час перебування як в центрі ВП, так і у відкритих рукавах ПХЛ (Lin та Shing-Hong, 2015). Натомість, фармакологічна блокада даних каналів не впливає на поведінку мишей у Zero-maze (аналогу ПХЛ) за системного введення сполук, та збільшує ознаки тривожності при мікроін'єкції в базолатеральну мигдалину (Dwyer et al., 2009; Pidoplichko, 2014). Отримані результати свідчать на користь анксиолітичності дії сполуки 5b в дозі 1 мкмоль/кг. Цікаво, що більша доза даного блокатора викликає протилежний патерн змін, пригнічуючи рівень локомоторної активності тварин, проте істотно не впливаючи на їх розташування стосовно стінок установки. Така різниця може бути поясненою тим, що зазвичай дія анксиолітиків у терапевтичних дозах супроводжується зростанням локомоторної активності та подальшим її зниженням по мірі збільшенням концентрації діючої речовини (Djeridane et al., 2005; Hughes, 1993).

Зареєстровані нами зміни поведінки піддослідних щурів були однонаправленими як у випадку дії сполуки 5b, так і внаслідок індукції епілепсії. Проте, ефект поєднання обох чинників виявився не кумулятивним, що найяскравіше видно за результатами ПХЛ тесту. Так, блокування ASIC1a-каналів за допомогою сполуки 5b спричинило ефекти, протилежні до таких у

контрольних тварин: зменшення загальної пройденої дистанції та часу, проведеного у відкритих рукавах. З одного боку, такі зміни можна було б інтерпретувати як продепресантні. Проте ми бачимо, що внаслідок цього тварини групи IE+5b статистично не відрізняються параметрами поведінки від контрольних. Іншими словами, блокування ASIC1a-каналів певним чином нормалізує порушену внаслідок епілептичного статусу поведінку.

Отримані дані узгоджуються з дослідженнями інших авторів, які використовували літій-пілокарпінову модель скроневої епілепсії (Smolensky et al., 2019). В цілому поведінка щурів з індукованою літій-пілокарпіном епілепсією характеризується меншою вираженістю поведінкових ознак тривожності: збільшенням пройденої відстані та зростанням часу, проведеного у центрі ВП або ж у відкритих рукавах ПХЛ.

ASICs залучені до формування пам'яті, що зумовлена страхом у щурів з індукованою епілепсією.

Епілепсія може супроводжуватися супутніми розладами, серед яких є депресивні та тривожні стани з відповідним порушенням емоційної регуляції (Hingray et al., 2019; Tombini et al., 2020). Однією з центральних структур, що бере участь в регуляції емоційних станів, є мигдалина - важливий компонент системи, що бере участь у придбанні, зберіганні та вираженні пам'яті, що зумовлена страхом (LeDoux, 2000). Її нейрони експресують, зокрема, ASIC-канали. Пошкодження бічного ядра мигдалини в моделях індукованої епілепсії створюють емоційні порушення і погіршують асоціацію безумовних та умовних подразників (Kemppainen and Samuli, 2006). Пошкодження сенсорних шляхів очевидно перешкоджатиме зумовленню страху.

Безпосередня дія больового стимулу є безумовною захисною реакцією. У наших експериментах больовий вплив від електричної стимуляції супроводжувався завмиранням у тварин усіх груп, проте за умов індукованої епілепсії його тривалість була меншою. Це може вказувати на дефіцит процесів гальмування внаслідок патології. Це означає, що виявлення неприємних, емоційно значущих подразників погіршено у щурів з індукованою епілепсією.

Завмирання при поміщенні в установку до пред'явлення першої пари звукового та больового стимулів є вродженою реакцією на новизну та потенційну небезпеку, воно може розглядатися, як корелят рівня тривожності. Тварини з індукованою епілепсією демонстрували збільшену тривалість такої реакції. Блокування ASIC-каналів не впливало на цей параметр ані в контрольних, ані в тварин з індукованою епілепсією. Реакція на звуковий сигнал у перший день до больової стимуляції також є вроджено орієнтувальною. Жодної міжгрупової різниці щодо неї не виявлено.

Реагування тварин на поміщення в установку та на звук в другий день експерименту є результатом асоціативного навчання. Істотне збільшення тривалості завмирання є ознакою успішного формування асоціації між больовим стимулом та супутніми - як контекстуальним, так і звуковим. Фармакологічна блокада ASIC-каналів за допомогою сполуки 5b посилювала емоційне навчання у контрольних тварин, але лише контекстуальне. Тривалість реакції завмирання

у тварин з індукованою епілепсією на другий день не відрізнялася від контрольних. Проте різниця між значеннями обох днів була статистично не вірогідною, що вказує на меншу ефективність навчання та узгоджується з даними інших авторів (dos Santos et al., 2005; Bogovyk et al., 2017). Натомість за умов дії сполуки 5b як контекстуальне, так і стимулзумовлене завмирання на другий день ставало значущо більшим за перший. Варто зауважити, що тривалість стимулзумовленої реакції завмирання в цьому випадку була меншою за таку у контрольних тварин, тобто баланс збудження та гальмування нормалізується не повністю.

Таким чином, блокування ASIC-каналів відновлювало порушене внаслідок епілепсії емоційне навчання, а отже має позитивний ефект щодо корекції супутніх скроневої епілепсії емоційних розладів. Разом все це вказує на високий потенціал фармакологічної маніпуляції ASIC-каналами для корекції скроневої епілепсії та супутніх розладів.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань, досліджено роль протон-чутливих іонних каналів в електричній активності гіпокампа і поведінці щурів у експериментальній моделі індукованої епілепсії. Було досліджено залученість протон-чутливих іонних каналів в регуляції таких поведінкових реакцій щурів з індукованою епілепсією, як тривожність, локомоторна активність та пам'ять, що зумовлена страхом.

1. Для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів під час поведінкових тестів було розроблено бездротовий пристрій, який має значні переваги у порівнянні з аналогами.

2. Використовуючи антагоніст протон-чутливих іонних каналів – сполуку 5b, вперше показано, що блокада провідності протон-чутливих іонних каналів пригнічує епілептиформну активність нейронів зони CA1 гіпокампа *in vivo* в умовах каїнатної моделі скроневої епілепсії.

3. Блокування активності протон-чутливих іонних каналів сполукою 5b у великих концентраціях призводить до зниження домінуючої частоти гіпокампального тета-ритму та загального рівня локомоторної активності щурів в тесті “відкрите поле”.

4. Виявлено, що поведінка тварин після індукції епілепсії у тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт” нормалізується внаслідок пригнічення протон-чутливих іонних каналів використанням сполуки 5b, водночас таке пригнічення функції ASIC суттєво впливає на рівень локомоторної активності тварин у даному тесті.

5. Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів у щурів значно відновлювала порушене внаслідок індукції епілепсії емоційне навчання, що зумовлене страхом.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Ievglevskiy O, Isaev D, Netsyk O, Romanov A, Fedoriuk M, Maximyuk O, Isaeva E, Akaike N, Krishtal O (2016) Acid-sensing ion channels regulate spontaneous inhibitory activity in the hippocampus: possible implications for epilepsy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* – 371(1700); DOI: 10.1098/rstb.2015.0431

2. M.P. Fedoriuk, A.O. Cherninskyi, O.P. Maximyuk, D.S. Isaev, R.I. Bogovyk, A.V. Venhreniuk, O.M. Boyko, O.O. Krishtal (2019) Inhibition of brain ASICs affects hippocampal theta-rhythm and open-field behavior in rats. *Fiziol. Zh.* 65(1): 15-19. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.01.015>

Тези доповідей:

1. Stefanenko M., Fedoriuk M., Bogovyk R., Semenikhina M., Maximyuk O., Krishtal O., Isaev D. Effects of selective antagonist of ASICs in the lps animal model of parkinson's disease, VII International Congress of Ukrainian Society for Biophysics, Ukraine, 2018.

2. Artem Venhreniuk A, Bogovyk R, Fedoriuk M., Isaev D, Maximyuk O., Zozulya S., Sukach V., Krishtal O. Compound 5b exerts potential antiepileptic effect and does not affect anxiety in rats // The Inaugural Workshop of UNESCO/UNITWIN Network on PhD Education and Research in Biophysics, Biotechnology and Environmental Health, Garni, Armenia, 2018.

3. Stefanenko M., Fedoriuk M., Bogovyk R., Semenikhina M., Maximyuk O., Krishtal O., Isaev D. ASICs inhibition shifts affective behavior in the rat's model of Parkinson's disease // 35th Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine Rare diseases: From mechanisms to therapy and beyond, Cologne, Germany, meeting abstract, P 35, poster B-07, 2019.

4. Stefanenko M., Fedoriuk M., Bogovyk R., Semenikhina M., Maximyuk O., Krishtal O., Isaev D. Effects of ASICs inhibition in animal model of Parkinson's disease // *Фізіол. журн.*, 2019, 65 (S3), С. 18, 2019.

5. M. Semenikhina, A. Romanov, M. Fedoriuk, M. Stefanenko, D. Isaev, O. Isaeva, O. Maximyuk, and O. Krishtal Regulation of spontaneous synaptic activity in the lateral amygdala by acid-sensing ion channels // 100 years of microglia, Lausanne, Switzerland, 2019.

6. M. Semenikhina, A. Romanov, M. Fedoriuk, M. Stefanenko, D. Isaev, O. Maximyuk, and O. Krishtal Acid-sensing ion channels regulate spontaneous activity in the amygdala // VIII annual meeting of Ukrainian Biophysical Society, Kiyv, Ukraine, meeting abstracts, P. 21, 2019.

7. Пристрій для реєстрації електрокортикограми головного мозку у щурів: пат. 140101, Україна. № 201906705; заявл. 14.06.2019; опубл. 10.02.2020

8. Бездротовий пристрій з Bluetooth передавачем для реєстрації електричних потенціалів головного мозку у щурів: пат. 142040, Україна. № 201911092; заявл. 12.11.2019; опубл. 12.05.2020

АНОТАЦІЯ

Федорюк М.П. Роль протон-чутливих іонних каналів в електричній активності гіпокампа та поведінці щурів у моделі індукованої епілепсії – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Дисертація присвячена визначенню ролі протон-чутливих іонних каналів в електричній активності гіпокампа і поведінці щурів у експериментальній моделі індукованої епілепсії.

Використовуючи антагоніст протон-чутливих іонних каналів 5b, вперше показано, що блокада провідності цих каналів має помітний антиепілептичний ефект у експерименті з епілептиформною активністю спричиненою каїнатом в клітинах зони СА1 гіпокампа *in vivo*.

Виявлено, що блокування активності протон-чутливих іонних каналів призводить до зниження як домінуючої частоти тета-ритму, так і загального рівня локомоторної активності в тесті “відкрите поле”.

Показано, що сполука 5b допомагає нормалізації зниженому рівню тривожності, а також істотно впливає на загальний рівень локомоторної активності у тварин з індукованою епілепсією в тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”.

Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів у щурів значно відновлювала порушене внаслідок індукції епілепсії емоційне навчання, що зумовлене страхом.

Ключові слова: протон-чутливі іонні канали; індукована епілепсія; сполука 5b; тривожність; відкрите поле; піднятий хрестоподібний лабіринт, емоційне навчання.

АННОТАЦИЯ

Федорюк М.П. Роль протон-чувствительных ионных каналов в электрической активности гиппокампа и поведении крыс в модели индуцированной эпилепсии - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

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

Диссертация посвящена определению роли протон-чувствительных ионных каналов в электрической активности гиппокампа и поведении крыс в экспериментальной модели индуцированной эпилепсии.

Используя антагонист протон-чувствительных ионных каналов 5b, впервые показано, что блокада проводимости этих каналов имеет заметный антиэпилептический эффект в эксперименте с эпилептиформной активностью, вызванной каинатом, в клетках зоны СА1 гиппокампа *in vivo*.

Обнаружено, что блокирование активности протон-чувствительных ионных каналов приводит к снижению как доминирующей частоты тета-ритма, так и общего уровня локомоторной активности в тесте "открытое поле".

Показано, что животные с индуцированной эпилепсией показывают пониженный уровень естественной тревожности избегать открытых рукавов в тесте "поднятый крестообразный лабиринт" и повышенный уровень локомоторной активности, а антагонист протон-чувствительных ионных каналов 5b помогает его нормализации этих параметров.

Фармакологическая блокада протон-чувствительных ионных каналов у крыс значительно восстанавливала нарушенное вследствие индукции эпилепсии эмоциональное обучение, обусловленное страхом.

Ключевые слова: протон-чувствительные ионные каналы; индуцированная эпилепсия; антагонист 5b; тревожность; открытое поле; поднятый крестообразный лабиринт; эмоциональное обучение.

ABSTRACT

Fedoriuk M.P. The role of acid-sensing ion channels in the electrical activity of the hippocampus and the behavior of rats in the model of induced epilepsy. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of sciences in Biology (PhD) on a specialty 03.00.02 – biophysics. Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to determining the role of acid-sensing ion channels in the electrical activity of the hippocampus and the behavior of rats in an experimental model of induced epilepsy.

Using the acid-sensing ion channels antagonist 5b, we first demonstrated that acid-sensing ion channels conduction blockade has a marked antiepileptic effect in an experiment with kainate-induced epileptiform activity in hippocampal CA1 cells *in vivo*.

It was found that blocking the activity of acid-sensing ion channels leads to a decrease in both the dominant frequency of theta rhythm and the overall level of locomotor activity in the “open field” test.

In our study, we showed that animals with induced epilepsy showed a reduced level of natural anxiety to avoid open arms in the “elevated plus maze” test, and compound 5b helps to normalize it.

We also found for the first time that compound 5b significantly affected the overall level of locomotor activity in the behavior of animals with induced epilepsy in the “elevated plus maze” test.

Pharmacological blockade of acid-sensing ion channels in rats significantly restored the emotional learning caused by fear, impaired by the induction of epilepsy.

Keywords: acid-sensing ion channels; induced epilepsy; compound 5b; anxiety; Open field; Elevated plus maze; emotional learning.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

ЦНС - центральна нервова система;

ПНС - периферична нервова система;

ASICs - acid-sensing ion channels, протон-чутливі іонні канали;

ЕА - епілептиформну активність;

ЕС - епілептичний статус;

ІЕ - індукція епілепсії;

ІР - Internet Protocol, протокол інтернет;

ВП - поведінковий тест “відкрите поле”;

ПХЛ - поведінковий тест “піднятий хрестоподібний лабіринт”;

ГАМК - Гамма-аміномасляна кислота;

LTP - long-term potentiation, довготривала потенціація;

5b – 2-охо-2Н-chromene-3-carboxamidine, антагоніст протон-чутливих іонних каналів