

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ФЕДОРЮК МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧ

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

ДИСЕРТАЦІЯ

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

Спеціальність 03.00.02 – біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

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

Київ – 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.

Однією з найважливіших умов нормального функціонування організму є сталість позаклітинного середовища, одним з показників якого є врегульована концентрація протонів. У більшості хребетних у нормі цей параметр, або показник водню (рН), дорівнює 7.4. В різних фізіологічних та патофізіологічних станах його значення може помітно змінюватися – при запаленні або ішемії, наприклад, виникає локальне закислення або ацидоз тканин, що супроводжується болем. З огляду на це сформувалась думка, що в організмі існує сенсор, чутливий до протонів. У 1980-му році Кришталь та Підоплічко у роботі на нейронах сенсорних гангліїв щурів показали, що у відповідь на зміну рН позаклітинного розчину з 7.4 до 7 та нижче активується струм, який з'являється за рахунок збільшення проникності мембрани для іонів натрію та калію і досягає максимального значення при рівні рН=5.4. У 1996-му році Валдман із колегами отримали такий же самий струм, але вже у ооцитах жаби. Вони експресували в ооцитах РНК, яка була комплементарна до виділеної ДНК мозку щура. Іонні канали, через які протікає такий струм почали називати чутливими до закислення, або протон-чутливі іонні канали (Acid Sensing Ion Channels або ASICs). ASICs визначають, як підсімейство іонних каналів ссавців сімейства епітеліальних натрієвих та дегенеринових ENaC/DEG каналів. Протягом останніх років, з використанням генетично модифікованих тваринних моделей, з'ясовано їх залучення до багатьох нормальних фізіологічних та патологічних процесів,

що включають больові відчуття, синаптичну пластичність, вираження страху та нейродегенерацію після ішемії. Все це робить їх потенційно цікавими мішенями для фармакології, проте на даний час ще не винайдено препаратів для ASICs, які б можливо було застосовувати клінічно. Більшість структур ASICs були отримані від курячого ASIC1a, який поділяє близько 90% ідентичності послідовностей з людським та щурячим ASIC1a. ASICs існують у трьох функціональних станах: закритому, відкритому та десенсибілізованому. Субодиниці ASICs переважно експресуються в нервовій системі. ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b та ASIC4 виявлені в ЦНС і ПНС, а ASIC1b і ASIC3 лише в ПНС, за винятком людського ASIC3, який також демонструє низький рівень експресії в ЦНС. Також ASICs були виявлені в клітинах соми та сенсорних нервових терміналях периферичних нейронів. У нейронах гіпокампа ASIC1a переважно розташовані на тілі клітини та дендритах. ASICs є проникними для іонів Na^+ і їх активація призводить до мембранної деполяризації, тим самим індукуючи потенціали дії в нейронах. Таким чином, ASICs часто мають активізуючу дію на нейрони. Для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів розроблено та виготовлено бездротовий пристрій, який дозволяє проводити реєстрацію під час поведінкових тестів та має значні переваги в порівнянні з аналогами. В експерименті з реєстрації електричної активності гіпокампа з проведенням поведінкового тесту “відкрите поле” виявлено, що блокування активності ASICs новітнім антагоністом – сполукою 5b призводить до зниження як домінуючої частоти тета-ритму, так і загального рівня локомоторної активності.

Епілепсія є поширеним у всьому світі тяжким неврологічним розладом. Епілепсія скроневої частки (TLE) є найбільш поширеною формою часткової епілепсії і часто резистентна до відомих фармакологічних втручань. TLE може бути спровокована по-різному: через травму мозку, гіпоксичну травму мозку, пухлини головного мозку, інсульт, мозкові інфекції, такі як енцефаліт та менінгіт, епілептичний стан (ЕС) та ін.

Правильне лікування ЦНС може значно знизити ризик розвитку судом. ЕС, визначений як безперервна судомна активність протягом більше 5 хв або послідовні судоми без відновлення свідомості, може бути серйозним наслідком ураження ЦНС та може бути потенційно небезпечним для життя за рахунок високого рівня смертності, навіть при відповідному фармакологічному втручанні. Епілептичний стан і ранні гострі напади, спричинені інфекціями, часто пов'язані з інсультами і зазвичай виникають одночасно з інфекцією, тоді як епілепсія з хронічними повторюваними випадками розвивається пізніше в результаті процесу, який називають "епілептогенезом. Під час епілептичних випадків рН мозку знижується, і відомо, що ацидоз може закінчитися судомами. Зіман із колегами показали, що порушення гена ASIC1a збільшило ступінь тяжкості випадків, і протилежний ефект спостерігався при надмірній експресії ASIC1a. Також вони з'ясували, що інгібіторні інтернейрони в гіпокампі демонструють більш високі амплітуди ASIC-струмів, ніж пірамідальні нейрони, і, можливо, опосередковане інгібування інтернейронів припиняє напади. Стратегії пошуку нових протиепілептичних препаратів в основному орієнтовані на початкову стадію інсульту та оборнення процесу епілептогенезу для запобігання розвитку хронічної епілепсії. Для перевірки потенційного протиепілептичного лікування у гризунів використовують каїнатну, пілокарпінову або літій-пілокарпінову модель індукованої епілепсії, які довели свою корисність у вивченні патофізіології та прогресуванні TLE. Ці моделі можуть відтворити поведінкові, електрографічні та невропатологічні особливості TLE людини. Системне або внутрішньомозкове введення каїнату, потужного агоніста глутамату, широко застосовується для індукції епілептичних нападів у тварин. Ці періодичні напади швидко генералізуються. У каїнатній моделі у щурів повторювані напади можуть тривати протягом змінних періодів до декількох місяців. Втрата нейронів зони CA1 та характер дисперсії клітин у клітинному шарі зубчастих звивин, що нагадує гістологічні зміни у людей

зі скроневою епілепсією, спостерігалась після мікроін'єкції каїнату в дорзальний гіпокамп мишей. Дієвість каїнатної моделі робить її дуже корисною для розуміння патофізіологічних змін, що відбуваються при скроневої епілепсії. В нашій роботі ін'єкції каїнату в зону СА1 гіпокампа *in vivo* викликали стійку епілептиформну активність і використовуючи антагоніст ASICs – сполуку 5b, ми вперше показали, що блокада провідності цих каналів має помітний антиепілептичний ефект, зменшуючи частоту виникнення епілептиформних явищ. Ін'єкція пілокарпіну, яка робиться через 20 годин після ін'єкції літію, призводить до ЕС і після латентного періоду без випадків, переростає в хронічний стан, що характеризується спонтанними рецидивними випадками. Літій-пілокарпінову модель можна вважати корисним інструментом для дослідження фармакологічних втручань для інгібування випадків, викликаних, наприклад, інфекціями ЦНС. Серед інших зон мозку гіпокамп особливо вразливий до пошкодження нейронів, спричиненого пілокарпіном. Гіпокамп є центром уваги в галузі дослідження TLE, оскільки він містить багато чітко визначених нейронних зв'язків, пов'язаних з генезисом випадків. Епілептичні напади спричиняють серйозні ураження пірамідальних клітинних шарів зон СА1, СА3 та зубчастої звивини гіпокампа. Епілепсія характеризується кількома поведінковими супутніми розладами, такими як когнітивна дисфункція, яка є поширеною серед хворих на епілепсію. В наших експериментах на щурах з індукованою епілепсією вперше показано, що блокування активності ASICs істотно впливає на загальний рівень локомоторної активності в тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”, а також призводить до нормалізації зниженого рівня тривожності. Тварини з індукованою епілепсією демонструють значне погіршення пам'яті та здібностей до навчання, які проявляються у початковому латентному періоді, в якому ще немає нападів. Ми з'ясували, що фармакологічна блокада ASICs у щурів значно відновлює порушене внаслідок індукції епілепсії емоційне навчання, що зумовлене страхом.

Ключові слова: ASICs; індукована епілепсія; сполука 5b; електрична активність; поведінкові тести; тривожність; емоційне навчання.

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 biological sciences (doctor of philosophy) on a specialty 03.00.02 – biophysics. Bogomolets Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

One of the most important conditions for the normal functioning of the organism is the stability of the extracellular environment, one of the indicators of which is the regulated concentration of protons. In most vertebrates, this parameter, or the indicator of hydrogen (pH), is normally equal to 7.4. In different physiological and pathophysiological conditions, its value can change significantly - with inflammation or ischemia, for example, there is local acidification or acidosis of tissues, accompanied by pain. In view of this, the idea was formed that there is a sensor in the body that is sensitive to protons. In 1980, Kryshchal and Pidoplichko, working on rat sensory ganglion neurons, showed that in response to changes in the pH of extracellular solution from 7.4 to 7 and below, a current is activated, which appears due to increased membrane permeability to sodium and potassium ions and reaches maximum value at pH = 5.4. In 1996, Waldman and colleagues received the same current, but in frog oocytes. They expressed in oocytes RNA that was complementary to the isolated DNA of the rat brain. The ion channels through which such a current flows have come to be called acid-sensitive, or proton-sensitive ion channels (Acid Sensing Ion Channels or ASICs). ASICs are defined as a subfamily of mammalian ion channels of the family of epithelial sodium and degenerate ENaC / DEG channels. In recent years,

using genetically modified animal models, their involvement in many normal physiological and pathological processes, including pain, synaptic plasticity, expression of fear, and neurodegeneration after ischemia, has been elucidated. All this makes them potentially interesting targets for pharmacology, but so far no drugs have been invented for ASICs that could be used clinically. Most ASICs structures were derived from chicken ASIC1a, which shares about 90% of sequence identity with human and rat ASIC1a. ASICs exist in three functional states: closed, open, and desensitized. ASICs subunits are predominantly expressed in the nervous system. ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b and ASIC4 are found in the CNS and PNS, and ASIC1b and ASIC3 only in the PNS, except for human ASIC3, which also shows a low level of expression in the CNS. ASICs have also been detected in soma cells and sensory nerve terminals of peripheral neurons. In CNS neurons, ASIC1a is predominantly located on the body of cells and. ASICs are permeable to Na^+ ions and their activation leads to membrane depolarization, thereby inducing action potentials in neurons. Thus, ASICs often have an activating effect on neurons. To record the electrical activity of the rat hippocampus, a wireless device has been developed and manufactured that allows recording during behavioral tests and has significant advantages over analogues. In an experiment to record the electrical activity of the hippocampus with the behavioral test "open field", it was found that blocking the activity of ASICs by the latest antagonist - compound 5b leads to a decrease in both the dominant theta rhythm and overall locomotor activity.

Epilepsy is a worldwide severe neurological disorder. Temporal lobe epilepsy (TLE) is the most common form of partial epilepsy and is often resistant to known pharmacological interventions. TLE can be triggered in different ways: through brain injury, hypoxic brain injury, brain tumors, stroke, brain infections such as encephalitis and meningitis, epileptic condition (status epilepticus, SE) and others. Proper treatment of the CNS can significantly reduce the risk of seizures. SE, defined as continuous convulsive activity for more than 5 min or consecutive seizures without regaining consciousness, can be a serious

consequence of CNS damage and can be potentially life-threatening due to high mortality, even with appropriate pharmacological intervention. The SE and early acute seizures caused by infections are often associated with strokes and usually occur at the same time as the infection, whereas epilepsy with chronic recurrent seizures develops later as a result of a process called epileptogenesis. During epileptic seizures, the pH of the brain decreases, and it is known that acidosis can end in convulsions. Ziemann and colleagues showed that disruption of the ASIC1a gene increased the severity of seizures, and the opposite effect was observed in overexpression of ASIC1a. They also found that inhibitory interneurons in the hippocampus showed higher amplitudes of ASIC currents than pyramidal neurons, and that indirect inhibition of interneurons may stop seizures. Strategies for finding new antiepileptic drugs are mainly focused on the initial stage of stroke and reversing the process of epileptogenesis to prevent the development of chronic epilepsy. To test potential antiepileptic treatment in rodents, a kainate, pilocarpine, or lithium-pilocarpine model of induced epilepsy has been used, which has been shown to be useful in the study of pathophysiology and TLE progression. These models can reproduce the behavioral, electrographic, and neuropathological features of human TLE. Systemic or intracerebral administration of kainate, a potent agonist of glutamate, is widely used to induce epileptic seizures in animals. These periodic attacks quickly generalize. In the kainate model in rats, recurrent seizures can last for varying periods of up to several months. The loss of CA1 neurons and the nature of cell dispersion in the cell layer of dentate gyrus, resembling histological changes in people with temporal lobe epilepsy, were observed after microinjection of kainate into the dorsal hippocampus of mice. The effectiveness of the kainate model makes it very useful for understanding the pathophysiological changes that occur in temporal lobe epilepsy. In our work, injections of kainate into the CA1 zone of the hippocampus *in vivo* induced sustained epileptiform activity, and using the ASICs antagonist compound 5b, we first showed that blockage of conduction of these channels has a marked antiepileptic effect, reducing the incidence of epileptiform

events. Pilocarpine injection, given 20 hours after lithium injection, results in SE and, after a latent period without seizures, progresses to a chronic condition characterized by spontaneous recurrent seizures. The lithium-pilocarpine model can be considered a useful tool for the study of pharmacological interventions to inhibit seizures caused, for example, by CNS infections. Among other areas of the brain, the hippocampus is particularly vulnerable to neuronal damage caused by pilocarpine. The hippocampus is the focus of TLE research because it contains many well-defined neural connections related to the genesis of seizures. Epileptic seizures cause severe damage to the pyramidal cell layers of the CA1, CA3 zones and the dentate gyrus of the hippocampus. Epilepsy is characterized by several behavioral comorbid disorders, such as cognitive dysfunction, which is common in patients with epilepsy. In our experiments on rats with induced epilepsy, it was shown for the first time that blocking the activity of ASICs significantly affects the overall level of locomotor activity in the test "raised cruciform labyrinth" and also leads to the normalization of reduced anxiety. Animals with induced epilepsy show significant impairment of memory and learning abilities, which are manifested in the initial latent period, in which there are no seizures. We found that pharmacological blockade of ASICs in rats significantly restored fear-induced emotional learning caused by epilepsy

Keywords: ASICs; induced epilepsy; compound 5b; electrical activity; behavioral tests; anxiety; emotional learning.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

В яких опубліковані основні результати роботи:

1. Ievglevskyi 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. М.Р. Fedoriuk, А.О. Cherninskyi, О.Р. Maximyuk, D.S. Isaev, R.I. Bogovyk, A.V. Venhreniuk, О.М. Boyko, О.О. 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>

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

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

ЗМІСТ

Анотація	2
Зміст	12
Перелік умовних позначень	15
ВСТУП	17
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1. Історія відкриття та філогенетика ASICs	23
1.2. Розподіл в тканинах та клітинні функції	26
1.3. Структура ASICs	28
1.4 Функціонування ASICs каналів	37
1.5 Регулювання ASICs	39
1.6 Фармакологія ASICs	45
1.7 Залучення ASICs до синаптичної пластичності та формуванні пам'яті	53
1.8 Роль ASICs у формуванні страху та тривожності	55
1.9 ASICs та больові відчуття	57
1.10 Участь ASICs у механочутливості	59
1.11 Роль ASICs у нейродегенеративних захворюваннях	60
1.12 ASICs та епілепсія	62
Висновки за розділом	65
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	67
2.1 Реєстрація електричної активності гіпокампа у іммобілізованих щурів	67
2.2 Розробка бездротового пристрою реєстрації електричної активності гіпокампа щурів	69
2.3 Реєстрація електричної активності гіпокампа у щурів під час поведінкових тестів	74

2.4 Каїнатна та літій-пілокарпінова модель індукованої епілепсії	75
2.5 Поведінкові тести	76
2.5.1 Поведінковий тест “відкрите поле”	76
2.5.2 Поведінковий тест “піднятий хрестоподібний лабіринт”	77
2.5.3 Поведінковий тест на дослідження пам'яті, що зумовлена страхом	78
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ	81
3.1 Залучення протон-чутливих іонних каналів до регуляції епілептиформної активності у гіпокампі щурів	81
3.2 Роль протон-чутливих іонних каналів у електричній активності гіпокампа щурів у поведінковій моделі “відкрите поле”.	83
3.2.1 Зміна локомоторної активності під дією блокатора ASICs.	84
3.2.2 Зміни у електричній активності гіпокампа під дією блокатора ASICs.	86
3.3 Залучення протон-чутливих іонних каналів до змін поведінкових реакцій тварин з індукованою епілепсією у поведінкових моделях.	89
3.3.1 Зміни у поведінці тварин з індукованою епілепсією у тесті “відкрите поле”.	90
3.3.2 Зміни у поведінці тварин з індукованою епілепсією у тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”.	93
3.3.3 Ефект фармакологічної блокади протон-чутливих іонних каналів у формуванні пам'яті, що зумовлена страхом у щурів з індукованою епілепсією	96
4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	99
4.1 Протон-чутливі іонні канали у гіпокампі щурів регулюють частоту епілептиформної активності викликаного каїнатом.	99
4.2 Частота гіпокамपालного тета-ритму щурів знижується під дією блокатора протон-чутливих іонних каналів	100

4.3 Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів нормалізує поведінку щурів з індукованою епілепсією у тестах відкрите поле та піднятий хрестоподібний лабіринт.	102
4.4 Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів має значний ефект у формуванні пам'яті, що обумовлена страхом у щурів з індукованою епілепсією.	104
ВИСНОВКИ	107
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	108
ДОДАТОК 1	123

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ASIC – acid-sensing ion channel – протон-чутливий іонний канал

ASIC1a, – 1b, –2a, – 2b, –3, –4 – типи субодиниць протон-чутливих іонних каналів

nASIC – native ASIC – нативний протон-чутливий іонний канал

cASIC – chicken ASIC – курячий протон-чутливий іонний канал

BASIC – bile acid-sensing ion channels – протон-чутливий іонний канал

Deg/ENaC – дегенерин/епітеліальний натрієвий канал

ENaC – epithelial sodium channel – епітеліальний натрієвий канал

ЦНС – центральна нервова система

ПНС – периферична нервова система

pH – водневий показник

PcTX – P₁salmostoxin – псалмотоксин 1

GMQ – N-(4-Methyl-2-quinazoliny)-guanidine hydrochloride

5b – 2-охо-2H-chromene-3-carboxamidine

NMDA – N-метил-D-аспартат

9AA – 9-аміноакридин

CHO – chinese hamster ovary – лінія клітин яєчника китайського хом'яка

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТМ – трансмембранний домен

ЗКД – зовнішньоклітинний домен

DRG нейрони - dorsal root ganglion neurons - нейрони задніх рогів спинного мозку

pH₅₀ – pH розчину, викликаючого 50% активацію

IC₅₀ – концентрація ліганда, викликаюча 50% інгібування

EC₅₀ – концентрація ліганда, викликаюча 50% потенціювання

АТФ – аденозинтрифосфат

GABA – γ -аміномасляна кислота

ЗПСС – збудливий постсинаптичний струм

ЗПСП – збудливий постсинаптичний потенціал

НПЗС – нестероїдні протизапальні засоби

GFP – зелений флуоресцентний білок

EPF – позаклітинний польовий потенціал

ЕЕГ – електроенцефалограма

КК – Каїнова кислота

АЦП – аналогово цифровий перетворювач

ССД – стаціонарний стан десенсибілізації

PDB – protein data bank – банк даних білків

AA – Arachidonic acid – Арахідонова кислота

PKC – Protein kinase C – протеїнкіназа C

ЯМР – Ядерна магнітно-резонансна спектроскопія

LTP – Long-term potentiation – Довготривала потенціація

EPSP – excitatory postsynaptic potential – збуджуючий постсинаптичний потенціал

IPSP – inhibitory postsynaptic potential – гальмівний постсинаптичний потенціал

BDNF – Brain derived neurotrophic factor – нейротропний фактор мозку

TLE – Temporal lobe epilepsy – скронева епілепія

IP камера – камера, що працює за протоколом інтернет (Internet Protocol)

ВСТУП

З моменту відкриття “рецепторів до протонів” (Krishtal & Pidoplichko, 1980), які згодом були клоновані групою французьких дослідників (Waldmann et. al., 1997) 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 нез’ясованою.

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 (Wemmie et al., 2003), тоді, як субодиниці ASIC1b та ASIC3 переважають в ПНС, і їх можна зустріти у чутливих нейронах задніх корінців спинного мозку, трійчастого і блукаючого нервів.

Активація ASICs спричиняє транз'єнтний 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 (Chu XP, Xiong ZG, 2013; Grunder S, Chen X, 2010; Wemmie et al., 2006), 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. 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; Venaroch 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 закисненням (рН 6.7; подібні значення спостерігаються в осередках епілептичної активності та при умовах фокальної ішемії), порівняно з активацією сильним закисненням (рН 5.0; може виникати у синаптичній щілині внаслідок нейронної активності).

Дослідження з використанням експериментальних моделей епілепсії показали, що епілептичні напади призводять до закиснення міжклітинного середовища (Somjen G.G., 1984, Xiong et al., 2000). Зниження рН 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).

Таким чином, стає актуальною проблема регуляції функції ASIC-каналів за умов патології за допомогою фармакологічного впливу.

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 – оцінити роль протон-чутливих іонних каналів в регуляції електричної активності гіпокампа і поведінці щурів у експериментальній моделі індукованої епілепсії.

Завдання дослідження.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Розробити пристрій для реєстрації електричної активності головного мозку 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 протон-чутливих іонних каналів у моделі індукованої епілепсії.

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 протон-чутливих іонних каналів, статистична обробка результатів.

Наукова новизна роботи.

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

Вперше показано, що блокада провідності протон-чутливих іонних каналів за допомогою новітнього антагоністу 5b пригнічує епілептиформну активність нейронів зони CA1 гіпокампа *in vivo* в умовах кайнатної моделі епілепсії.

Вперше продемонстровано, що блокування активності ASIC-каналів призводить до зниження домінуючої частоти тета-ритму та загального рівня локомоторної активності в тесті “відкрите поле”.

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

Вперше продемонстровано, що пригнічення функції протон-чутливих іонних каналів з використанням сполуки 5b призводить до нормалізації навчання, зумовленого страхом, зниженого внаслідок індукованої 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. Також практична частина допоможе 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-й 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.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Історія відкриття та філогенетика протон-чутливих іонних каналів

Найважливішою умовою нормального функціонування організму є сталість позаклітинного середовища, одним з показників якого є врегульована концентрація протонів. В різних фізіологічних та патофізіологічних станах, таких як, наприклад, запалення або ішемія, виникає локальне закислення або ацидоз тканин, що супроводжується болем. З огляду на це сформувалась думка, що існує канал, чутливий до протонів. У 1980-му році Кришталь та Підоплічко (Krishtal & Pidoplichko, 1980) у роботі на нейронах сенсорних гангліїв щурів показали, що у відповідь на зміну рН позаклітинного розчину з 7.4 до 7 та нижче активується струм, який з'являється за рахунок збільшення проникності мембрани для іонів натрію та калію і досягає максимального значення при рівні рН=5.4. У 1996-му році група інших науковців отримали такий же самий струм, але вже у ооцитах жаби. В цій роботі вони експресували в ооцитах РНК, яка була комплементарна до виділеної ДНК мозку щура (Waldmann et al., 1997). Іонні канали, через які протікає такий струм почали називати чутливими до закислення (Acid Sensing Ion Channels або ASICs), або протон-чутливі іонні канали. Амілорид-чутливі, потенціал-незалежні протон-активовані іонні канали активуються у відповідь на підвищення зовнішньоклітинної концентрації протонів.

ASICs визначають, як підсімейство іонних каналів ссавців сімейства епітеліальних натрієвих та дегенеринових ENaC/DEG каналів. ASICs були виявлені на основі їх первинної структури гомології з ENaC. Багато їх фізіологічних та патологічних ролей, які включають больові відчуття, синаптичну пластичність, вираження страху та нейродегенерацію після ішемії, протягом останніх років з'ясовано в генетично модифікованих

тваринних моделях. Це робить їх потенційно цікавими мішенями для фармакології. Кілька тваринних токсинів діють на ASICs. Проте на даний час ще не винайдено препаратів для ASICs, які б можливо було застосовувати клінічно.

Філогенетичне дерево на рис. 1.1 базується в основному на послідовностях ENaC та ASIC. Підродини *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* та *Helix aspersa* тут представлені PPK, MEC-4 та FaNaC відповідно. Представлена послідовність білків ENaC, ASICs та членів інших ENaC/DEG підсімейств. *Drosophila pickpocket* (PPK), *C. elegans* DEG MEC4 та *H. aspersa* FaNaC виділені зеленим. Також показаний жовчний ASIC - BASIC (також відомі, як hINaC або BLINaC). Для ссавців ENaC, ASIC та BASIC показані чорним, курячий ASIC показаний червоним, інші ENaC та ASICs субодиниці показані синім. Вид, до якого відносяться білки: c – курка; h – людина; l – мінога; r – щур; s – акула; t – жабовидні риби; x – *Шпоркова жаба*; z – риба *Даніо реріо*.

Чотири субодиниці ASIC кодуються генами ACCN1-4. HINaC ссавців (Na^+ канал кишечника (I) людини (H)) та його ортолог щурячий/мишиний BLINaC (Na^+ канал чутливий до амілориду, що присутній у мозку (B), печінці (L) та кишечнику (I)), назви яких посилаються на їх основні місця експресії, нещодавно перейменовано на BASIC (Bile ASIC) іонний канал, що активуються жовчними кислотами (Wiemuth et al., 2012; Lefevre et al., 2014).

BASIC кодується ACCN5, тому його також називають ASIC5, незважаючи на те, що він не активується протонами і лише на 30% гомологічний з ASIC. Гени ENaC та ASIC тим часом були клоновані з багатьох різних видів. В філогенетичне дерево (рис. 1.1) включені переважно людські та щурячі послідовності.

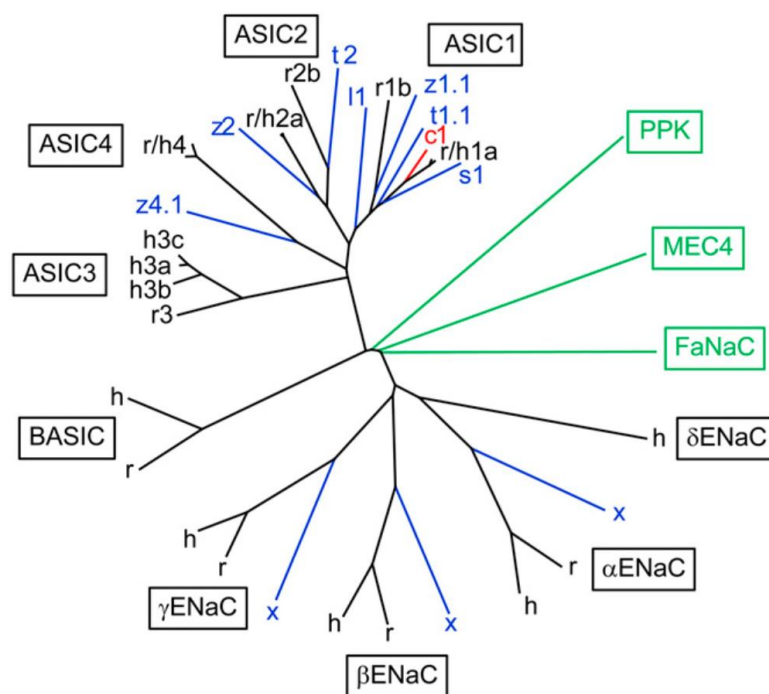


Рисунок 1.1. Філогенетичне дерево суперсемейства DEG/ENaC. В філогенетичне дерево включені людські, щурячі, деякі рибацькі ASIC-послідовності, які використовувались для функціональних досліджень, куряча ASIC1, з якої отримані опубліковані кристалічні структури, а також послідовності *Xenopus laevis* ENaC (Kellenberger and Schild, 2015).

Крім того, включені деякі рибацькі ASIC-послідовності, які використовувались для функціональних досліджень, куряча ASIC1, з якої отримані опубліковані кристалічні структури, а також послідовності *Xenopus laevis* ENaC. Гени ASIC мають різні варіанти сплайсингу, що призводить наразі до щонайменше 8 субодиниць, які зустрічаються у ссавців: ASIC1a та -1b; ASIC2a та -2b; ASIC3a, -3b та -3c (лише у людини, в інших організмах є лише один ASIC3) та ASIC4. Нещодавнє дослідження еволюції генів ENaC/DEG показало, що гени ENaC/DEG існують у всіх секвенованих геномах багатоклітинних. Цікаво, що не було виявлено жодних ортологів *C. elegans* та *Drosophila* у ссавців, членів ENaC/DEG, і регульованого білками *H. aspersa* члена FaNaC, що, можливо, свідчить про

те, що різні підсімейства ENaC/DEG розійшлись на початку еволюції (Kellenberger and Schild, 2015).

1.2 Розподіл в тканинах та клітинні функції

Субодиниці ASICs переважно експресуються в нервовій системі. ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b та ASIC4 виявлені в ЦНС і ПНС, а ASIC1b і ASIC3 були виявлені лише в ПНС, за винятком людського ASIC3, який також демонструє низький рівень експресії в ЦНС (Wemmie et al., 2006, 2013; Delaunay et al., 2012). Також ASICs були виявлені в клітинах сомита та сенсорних нервових терміналях периферичних нейронів. У нейронах ЦНС ASIC1a переважно розташовані на тілі клітини та дендритах і локалізуються за допомогою постсинаптичного маркера PSD95 (Wemmie et al., 2002; Zha et al., 2006). мРНК мишиного та щурячого спорідненого BASIC експресується головним чином у мозку, печінці, тонкому кишечнику, нирках і легенях, тоді як BASIC людини був виявлений лише у тонкому кишечнику (Sakai et al., 1999; Schaefer et al., 2000). BASIC експресується на високому рівні в жовчних протоках щура і активується жовчними кислотами (Wiemuth et al., 2012). Було показано, що в мозку миші BASIC виражається в основному в мізочку (Voiko et al., 2014).

Оскільки ASICs є проникними для іонів Na^+ , їх активація призводить до мембранної деполяризації, тим самим індукуючи потенціали дії в нейронах (Deval et al., 2003; Vukicevic and Kellenberger, 2004; Poirot et al., 2006) (рис. 1.2, рис. 1.3). Таким чином, ASICs часто мають активізуючу дію на нейрони.

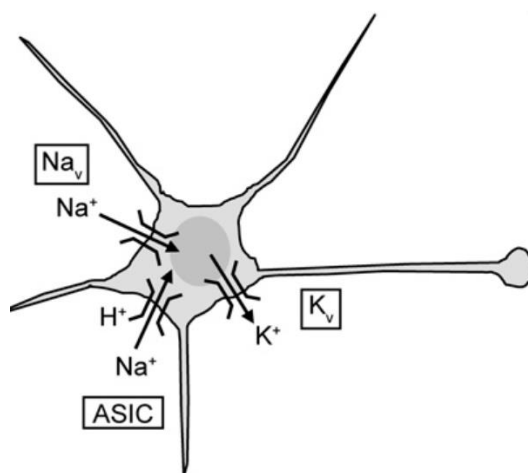


Рисунок 1.2. Активація ASIC протонами в нейроні призводить до входу Na^+ , викликаючи деполяризацію, що призводить до генерації потенціалу дії за рахунок активації потенціалзалежних Na^+ і K^+ каналів (Kellenberger and Schild, 2015).

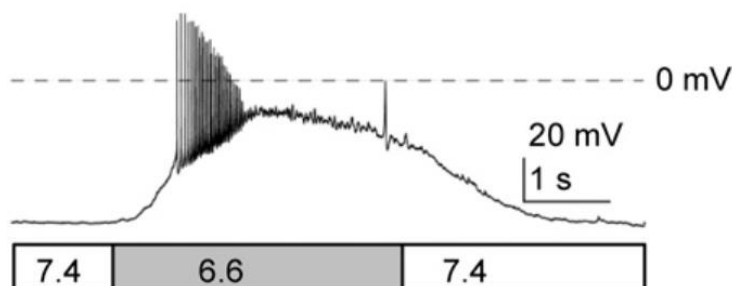


Рисунок 1.3. Експеримент із локальної фіксації потенціалу нейрона гіпокампа, в якому активація ASIC шляхом підкислення до рН 6.6 викликає деполяризацію та низку потенціалів дії (Vukicevic and Kellenberger, 2004).

Однак сильна опосередкована деполяризація ASICs може пригнічувати вже активно сигналізуючий нейрон (Vukicevic and Kellenberger, 2004). ASIC1a має невелику проникність для Ca^{2+} на додаток до його проникності для Na^+ , а деякі його клітинні функції, наприклад, нейродегенерація після ішемічного інсульту, вважається, залежать від входу Ca^{2+} у клітину (Xiong et al., 2004; Bassler et al., 2001).

1.3 Структура ASICs

Більшість структур ASIC були отримані від курячого ASIC1a, який поділяє близько 90% ідентичності послідовностей з людським та щурячим ASIC1a. ASICs існують у трьох функціональних станах: закритому, відкритому та десенсибілізованому. Дві структури були отримані при кислотному рН за відсутності модифікаторів решітки (банк даних білків [PDB] ID 2QTS та 3HGC / 4NYK), і їх трансмембранна область не містила суцільної пори, яка б дозволяла транспортувати іони. Тому було зроблено висновок, що ці структури, ймовірно, представляють десенсибілізовану конформацію ASIC1 (Jasti et al., 2007; Gonzales et al., 2009). Були опубліковані кристалічні структури cASIC1 в комплексі з модифікаторами решітки PcTx1 або MitTx (Baconguis and Gouaux, 2012; Dawson et al., 2012; Baconguis et al., 2014). MitTx є активатором ASIC. PcTx1 є модифікатором решітки, який зміщує рН-залежність активації та десенсибілізації до більш лужних значень, тим самим інгібуючи ASIC1a людини та щурів. Однак PcTx1 відкриває cASIC1 при рН 7.4, а щурячий ASIC1b при слабкокислому рН (Chen et al., 2005, 2006; Samways et al., 2009). Обидва функціональні комплекси cASIC1 токсинів показали неповну десенсибілізацію при рН, що використовується для кристалізації. На відміну від попередніх кристалічних структур, всі структури cASIC1, пов'язані з токсином, містили суцільну відкриту пору і тому, ймовірно, представляють канал у відкритій конформації.

Субодиниці ASICs складаються з двох трансмембранних сегментів, внутрішньоклітинних N- і C-терміналей і великої позаклітинної петлі (Canessa et al., 1994; Renard et al., 1994; Snyder et al., 1994) (рис. 1.4, а). Великий позаклітинний домен відіграє важливу роль у регуляції та контролі діяльності ASICs. Він містить залишки, що чутливі до H^+ , і бере участь в активації ASICs. Доменне розташування підрозділів ASICs має деяку схожість з вертикальним передпліччям і стиснутою рукою. Передпліччя

відповідало б трансмембранній частині, рука – позаклітинній частині каналу, а зап'ястя утворювало б перетин мембранно-позаклітинного домену. Відповідно, різні позаклітинні домени були позначені долонею, суглобом, пальцем, β -м'ячем та великим пальцем (Jasti et al., 2007) (рис. 1.4, а та б). Усі опубліковані структури sASIC1 показують канал тримером (Jasti et al., 2007; Gonzales et al., 2009; Baconguis and Gouaux, 2012; Baconguis et al., 2014).

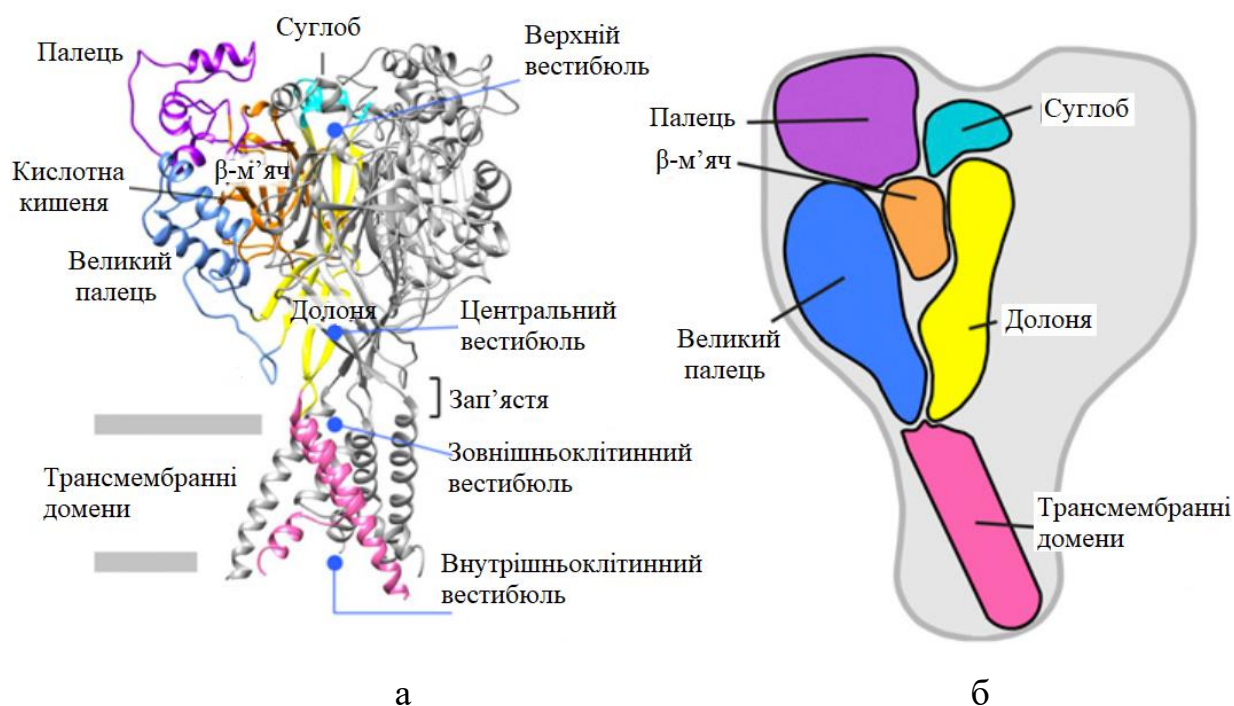


Рисунок 1.4. Структура та модель ASIC: а - кристалічна структура однієї з трьох субодиниць ASIC та її складові: палець, суглоб, долоня, великий палець, трансмембранні домени; б - схематичне зображення однієї субодиниці ASIC (Jasti et al., 2007).

Кислотна кишенька, розташована між великим пальцем, пальцем і β -м'ячем, негативно заряджена і містить кілька пар кислих бічних ланцюгів (Jasti et al., 2007) (рис. 1.5, б). Оскільки мутація таких кислих залишків призвела до кислих зрушень рН-залежності активації, то, ймовірно, що

кислотна кишеня формує рН сенсор, який контролює активність ASIC (Jasti et al., 2007; Li et al., 2009). Мутації в кислотній кишені, які зменшували енергію взаємодії між великим пальцем і пальцем, або β -м'ячем, як правило, переносили рН-залежність активації до більш кислих значень, припускаючи, що каналу сприяють сили тяжіння між цими субдоменами (Yang et al., 2009). Кислотні залишки та залишки гістидину були виявлені поза кислотною кишенею, в пальці та позаклітинному вестибюлі, мутація яких вплинула на залежність активації від рН (Paukert et al., 2008).

Палець. Залишок Asp108 спіралі $\alpha 1$ пальця має вирішальне значення для активації ASIC1a та ASIC3, можливо, шляхом побудови сольового мосту з основними залишками пальця (Paukert et al., 2008; Yang et al., 2012). Розщеплення протеази поруч із Arg146 $\alpha 2$ спіраль зміщує залежність рН ASIC1a до більш кислих значень (Vukicevic et al., 2006). Залишки, що беруть участь в інгібуванні ASIC1a та ASIC1b та посиленні потенціалу ASIC2a за допомогою Zn^{2+} , розташовані в різних положеннях всередині пальця (рис. 1.5, в). Палець ковалентно пов'язаний з β -м'ячем та долонею на ділянці, що містить залишки Asn97, His164 та Gln226. Цей сайт взаємодії відрізняється високою чутливістю до мутацій та зазнає конформаційних змін під час активності ASIC (Bargeton and Kellenberger, 2010).

Долоня утворена двома спіралями $\beta 1$ і $\beta 12$, з'єднаними з трансмембранними сегментами, і двома спіралями $\beta 9$ і $\beta 10$, що охоплюють центральний вестибюль (рис. 1.6, б). Петля $\beta 1 - \beta 2$, що з'єднує нижню долоню з β -м'ячем, є критичною для кінетики десенсибілізації ASIC1a з відкритого стану (Coric et al., 2003). Кілька досліджень показали, що мутації в цій області можуть викликати стійке відкриття каналу (Li et al., 2010; Springauf et al., 2011; Roy et al., 2013). Glu417 – протон-чутливий залишок для активації (Liechti et al., 2010; Krauson et al., 2013).

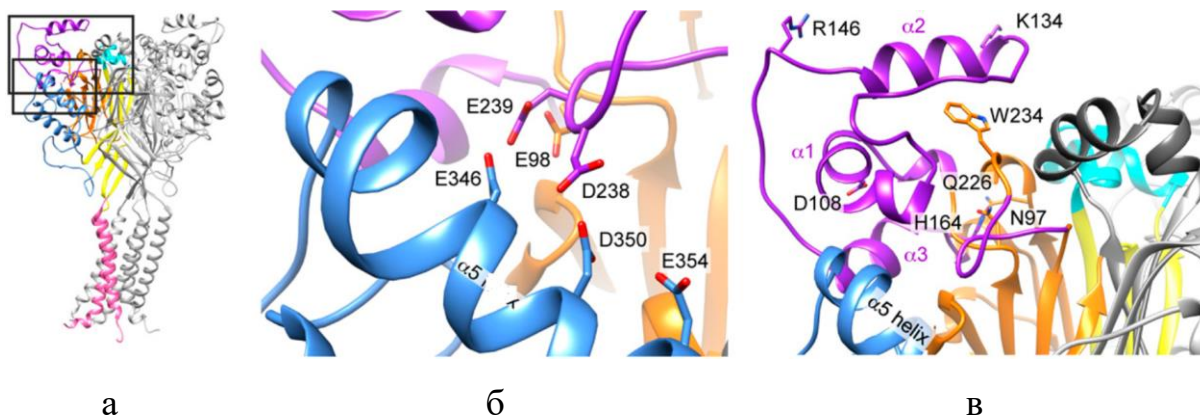


Рисунок 1.5. Кислотна кишеня і палець. а – загальна структура; б – кислотна кишеня, яка складається з кислих бічних ланцюгів великого пальця, пальця, петлі та β -м'яча; в – три спіралі пальця: $\alpha 1$ – $\alpha 3$ (Protein Data Bank ID 2QTS).

Трансмембранний домен та β -виток. У петлі між $\beta 9$ та $\beta 5$ розташований β -виток, який спрямовується вниз до верхнього кінця ТМ1, де взаємодіє з Tyr72 через Trp288 (Jasti et al., 2007). Мутації взаємодіючих залишків знизили експресію каналів на поверхні клітини зробивши канали нефункціональними (Jing et al., 2011 р.). Рухи залишків β -витку мають високу кореляцію з рухами верхнього ТМ1 (Yang et al., 2009).

Функціональні дослідження визначили у позаклітинному вестибюлі два гістонних залишки – His73 та His74, а також Asp79, як критичний для залежності активації ASIC1a від рН (Paukert et al., 2008). Взаємодія між His74 та Asp79 субдиницями, вірогідно, стабілізує протонацію одного з двох залишків. Конструкція cASIC1, що кристалізувалась із PcTx1, показала в присутності високих концентрацій PcTx1 неселективну, стійку до амilorидів провідність при рН 7.25 та Na^+ -селективному, амilorид-чутливому струмі при рН 5.5 (Baconguis and Gouaux, 2012).

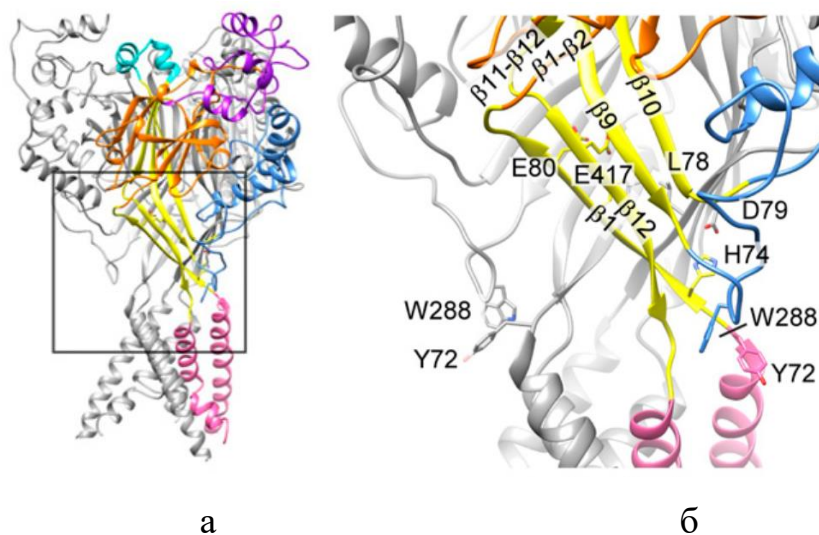


Рисунок 1.6. Долоня. а – загальна структура; б – нижня область долоні оточує центральний вестибюль: спіралі $\beta 1$ і $\beta 12$ з'єднані з трансмембранними сегментами, а нижні кінці $\beta 9$ і $\beta 10$ з'єднані з великим пальцем (Protein Data Bank ID 4NYK).

Відповідно, структура, отримана при рН 7.25, має дуже широку пору, а структура, отримана при рН 5.5, більш вузьку відкриту пору. Ці структури містили суцільні ТМ1 і ТМ2 α спіралі. Проте ТМ2 структури сASIC1-MitTx розділено на дві частини (ТМ2а та -b) селективним фільтром Gly-Ala-Ser (GAS), який утворює розширену горизонтальну структуру (рис. 1.7, б і г). Горизонтальний сегмент GAS розміщує нижню α спіраль ТМ2 (ТМ2b) у продовження верхньої спіралі ТМ2 (ТМ2а) сусідньої субоддиниці. Найвужча частина неселективної пори сASIC1-PcTx1 була шириною 10Å. Селективна Na^+ пора – сASIC1-PcTx1 була асиметричною, її переріз демонстрував еліптичну форму, і був найвужчим у нижній половині, із розмірами від 4x7Å до 5x10Å. У структурі сASIC1-MitTx трансмембранна частина каналу симетрична і має аналогічні розміри, як структура сASIC1-PcTx1 при рН=5.5, за винятком більш широких внутрішньоклітинних отворів (Baconguis et al., 2014).

Ворота десенсибілізації – звуження, розміром 8Å у верхній частині пори на рівні залишків Asp433-Gly436 (Gonzales et al., 2009). У функціональному дослідженні використовувались вимірювання швидкості реакцій сульфгідрильних реагентів на сконструйовані залишки Cys для виявлення запірних воріт (Li et al., 2011a). Звуження, ідентифіковане у закритому ASIC між Gly432 та Gln437, таким чином, знаходиться в тому самому місці, що і ворота десенсибілізації (рис. 1.7 б). Відкритий канал був недоступний для сульфгідрильних реагентів між залишками Leu440 та Pe446, що відповідало наявності фільтра селективності.

Залишок дегенерину та сайт зв'язування амilorиду. Gly432 являє собою DEG-сайт – це збережений малий залишок у всіх каналах ENaC/DEG, що призводить до переродження сенсорних нейронів у *C. elegans* (Eastwood and Goodman, 2012). Заміна залишку DEG, індукованого в ASIC2a уповільнює десенсибілізацію та змінення рН-залежності від індукованого H⁺ струму (Adams et al., 1998; Champigny et al., 1998). Сайт DEG ASIC2a є розчинником, доступним лише у відкритих каналах (Adams et al., 1998). Його заміна великими залишками може тримати пори відкритими. У кристалічній структурі ділянка DEG знаходиться на боці спіралі TM2, яка звернена до просвіту пор. Нещодавнє дослідження з'єднало субодиниці ASIC1a через модифікацію сконструйованих залишків у положенні Cys430 – отже, на один вище, ніж на DEG-сайті – з фоточутливим лінкером, конформація якого може бути переключена світлом від *цис* до *транс*. Ізомеризація *цис-транс* відсунула верхні кінці TM2 α спіралі у бік, тим самим відкривши канал (Browne et al., 2014). Це, ймовірно, імітує рух спіралей TM2, необхідних для відкриття каналу, що зазвичай індукується складними конформаційними змінами ектодомену.

Функціональний сайт зв'язування амilorиду в ASIC знаходиться в положенні, яке відповідає Gly439 (Adams et al., 1999; Alijevic and Kellenberger, 2012). Карбоніли основного ланцюга G439 вказують у просвіт пори у структурі cASIC1-MitTx.

Фільтр селективності. У ASIC1 GAS ділянка є частиною найбільш вузької області у відкритій порі (Baconguis and Gouaux, 2012; Baconguis et al., 2014). У структурі sASIC1-MitTx основа GAS з трьох субодиниць розділяє α спіраль TM2 надвоє і утворює горизонтальний пояс. Карбонільні оксигени Gly443 вказують у просвіт пори і утворюють місце зв'язування проникних іонів. На цьому рівні радіус пори дорівнює 3.6Å, близький до радіуса гідратного іона Na⁺ (3.8Å) (Baconguis et al., 2014; Mahler and Persson, 2012). Тому автори припускають, що фільтр селективності функціонує як бар'єр, досягаючи селективності шляхом розпізнавання гідратних іонів. Бічний ланцюг Ser445 взаємодіє із залишками спіралі TM2a сусідньої субодиниці, стабілізуючи безперервність відокремленої спіралі TM2 (рис. 1.7). На відміну від структур sASIC1-PcTx1 послідовність GAS є частиною безперервної α спіралі TM2 з боковим ланцюгом Ser445, що спрямований на сусідній TM1 (Baconguis and Gouaux, 2012).

У структурах sASIC1-PcTx1 було показано єдиний сайт зв'язування катіону в порі на позаклітинному вході пори, близькому до Asp433. Структура sASIC1-MitTx показала катіони на тому ж рівні та один катіон у центрі фільтра селективності. Функціональні дослідження показали, що сегмент GAS ASIC є важливим для селективності та проникнення іонів. Мутація Gly443 однієї єдиної субодиниці в межах тримера зменшила унітарну провідність і вплинула на селективність іонів (Li et al., 2011a). Мутація в Leu440 або Ala444 змінила коефіцієнт проникності Na⁺/K⁺ (Yang et al., 2009).

Цитоплазматичні N- і C- термінали. Було показано, що цитоплазматичний N-кінець визначає селективність між одновалентними катіонами в ASIC2 та ASIC3 (Coscoy et al., 1999), тоді як аналогічний домен в ASIC1 сприяє проникності Ca²⁺ (Bassler співавт., 2001). Дослідження доступності показали, що залишки N-кінця ASIC1a, ймовірно, сприяють внутрішньоклітинному вестибюлю пори (Pfister et al., 2006).

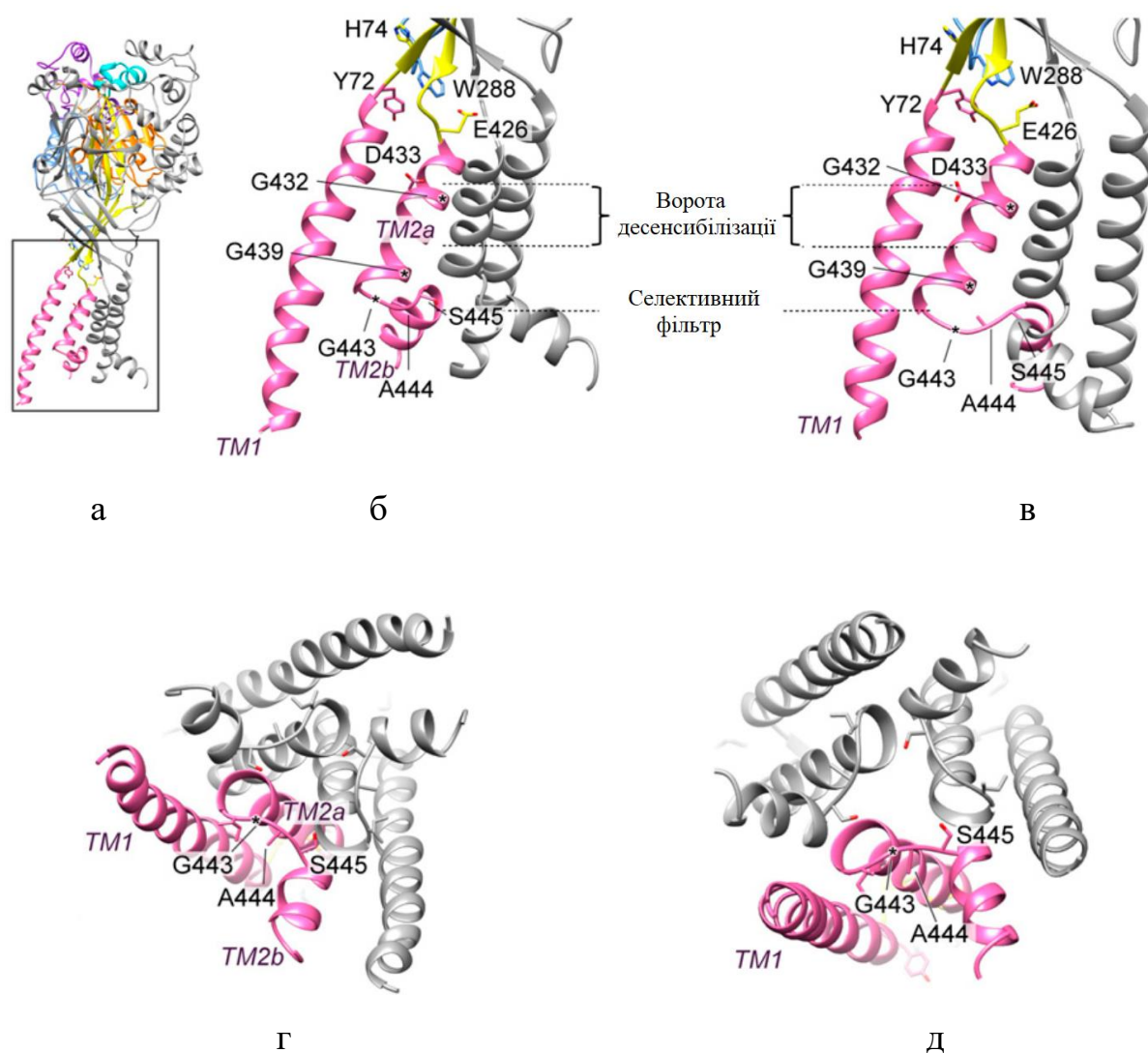


Рисунок 1.7. Трансмембранний домен. а - загальне розташування; десенсібілізований канал (Protein Data Bank ID 4NYK) від збоку (б) та знизу (г); відкритий канал (Protein Data Bank ID 4NTW) від збоку (в) та знизу (д).

Модель ASIC решітки. Кристалічні структури дають змогу промодельовати наступні етапи, що ведуть до відкриття та десенсібілізації (рис. 1.8).

При підкисленні, яке протонізує залишки в різних областях, таких як палець, кислотна кишенька, долоня та зап'ястя (Paukert et al., 2008; Liechti et al., 2010; Krauson et al., 2013), спостерігаються швидкі рухи в пальці та позаклітинному вестибюлі, при цьому палець $\alpha 2$ спіралі і β -куля рухаються

один від одного (Passero et al., 2009; Bonifacio et al., 2014) і, ймовірно, спіралі великого пальця наближаються до β -кулі та пальця (Jasti et al., 2007).

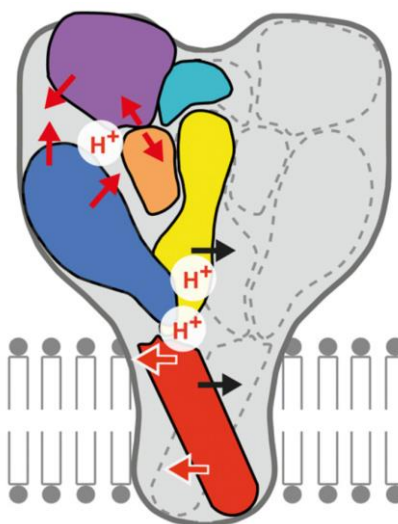


Рисунок 1.8. Модель решітки ASIC. Схематичний вигляд тримера ASIC, що показує кольори доменів однієї субодиниці. Контури доменів другої субодиниці показано пунктирними лініями. Запропоновані сайти протонації та конформаційні зміни відображаються лише у кольоровій субодиниці. Основні сайти протонації відображаються як “H⁺”. Червоні стрілки вказують напрямок запропонованих конформаційних змін, пов’язаних з активацією ASIC. Чорні стрілки вказують напрям запропонованих конформаційних змін, пов’язаних з десенсibiliзацією ASIC (Kellenberger and Schild, 2015).

Наразі не зрозуміло, чи передаються рухи пальця через зовнішні структури (великий палець та великий палець-долоня) або через долоню до позаклітинного вестибюлю. Ці конформаційні зміни за участі долоні та зап’ястя призводять до відкриття закриваючих воріт, які розташовані між Gly432 та Gln437 (Li et al., 2011a). Повільніші рухи в долоні, виявлені як рухи замикання нижньої долоні навколо центрального вестибюля під час переходу від закриття до десенситизації і визначені як більш вузький

центральний вестибюль в десенситизованій, порівняно з відкритою структурою ASIC, пов'язані з десенсибілізацією (Cushman et al., 2007; Liechti et al., 2010 Della Vecchia et al., 2013; Roy et al., 2013, Bonifacio et al., 2014, Baconguis and Gouaux, 2012; Baconguis et al., 2014). Рух замикання долоні призводить до закриття воріт десенсибілізації, запобігаючи іонній провідності (Baconguis and Gouaux, 2012).

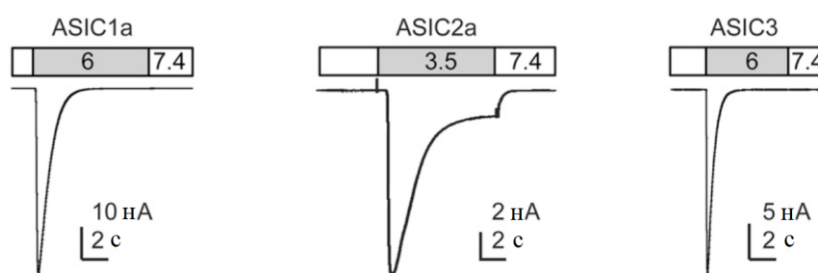
1.4 Функціонування ASICs

Тривалий час протони були єдиними відомими активаторами ASICs. Однак, згодом, було показано, що синтетична сполука GMQ активує ASIC3 при pH 7.4 (Yu et al., 2010). А павуковий токсин PcTx1 зміщує залежність ASICs від pH, пригнічуючи ASIC1a у фізіологічних умовах та активуючи cASIC1 та ASIC1b щурів при pH 7.4 та слабнокислому pH відповідно (Chen et al., 2005, 2006; Baconguis i Gouaux, 2012).

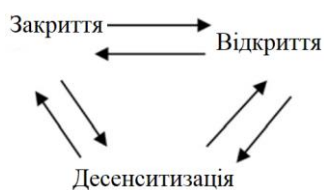
Кислотно-індуковане відкриття ASICs є в більшості умов тимчасовим, оскільки за ним швидко слідує десенсибілізація (Waldmann et al., 1997) (рис. 1.9, а). Це можна описати кінетичною моделлю, що містить закритий, відкритий та десенсибілізований стан (рис. 1.9, б). Десенсибілізація найшвидша в ASIC3 і найповільніша в ASIC2a. Константи часу кінетики відкриття каналу (~10 мс) вимірювали для ASIC1a, ASIC1b та ASIC3 при дуже швидких умовах зміни розчину при $\text{pH} \leq 6$ (Bassler et al., 2001; Sutherland et al., 2001; Li et al., 2010b). Активація ASIC3 при $\text{pH} \sim 7$ та $\text{pH} < 5$ викликає компонент стійкого струму на додаток до перехідного струму (Waldmann et al., 1997; Yagi et al., 2006). ASIC3 людини може активуватись зі зміною pH з фізіологічного на більш лужний і викликати стійкий струм (Delaunay et al., 2012).

З кривих pH-реакції ASIC1a-струмів можна визначити значення $\text{pH}_{50} \sim 6.5$ (рис. 1.10). Якщо ASICs піддаються впливу помірно кислого pH, вони можуть десенсибілізуватись без видимого відкриття, тим самим

проходячи безпосередньо із закритого до десенсибілізованого стану (Waldmann et al., 1997). Цей процес, аналогічний закритому стану інактивації потенціалзалежних Na^+ каналів називається стаціонарним станом десенсибілізації (ССД). Зміни в цій рН залежності або в основному рН можуть впливати на доступність ASICs для активації. Активність ASICs також модулюється внутрішньоклітинним рН. Було показано, що амплітуда струмів ASICs в кортикальних нейронах мишей була зменшена за рахунок внутрішньоклітинного підкислення через лужний зсув рН-залежності ССД та кислотний зсув рН залежності від активації (Wang et al., 2006).



а



б

Рисунок 1.9. а – репрезентативні струми ASIC1a, ASIC2a та ASIC3, індуковані позаклітинним підкисленням (реєстрація у конфігурації “ціла клітина”, прикладений потенціал -60 мВ, клітини CHO з відповідним експресованим підтипом ASIC) (Waldmann et al., 1997); б – схема, що ілюструє кінетичну модель селективності ASIC.

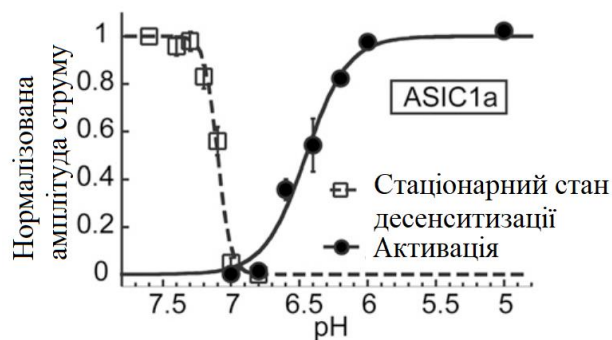


Рисунок 1.10. Крива десенситизації в стаціонарному стані та активаційна крива ASIC1a (Bargeton and Kellenberger, 2010).

Мутації, що впливають на pH-залежність зміни активації, у багатьох випадках також залежать від pH-залежності ССД (Sherwood and Askwith, 2008; Bargeton and Kellenberger, 2010; Liechti et al., 2010), що вказує на те, що активація та десенситизація структурно пов'язані. Зміни у позаклітинній концентрації Ca^{2+} , а також застосування PcTx1 зміщують залежність pH як активації, так і ССД, в ASIC1a (Babini et al., 2002; Poirot et al., 2004; Chen et al., 2006).

1.5 Регулювання ASICs каналів

Функція ASIC регулюється багатьма різними модуляторами, такими як Ca^{2+} , Zn^{2+} , окислювально-відновлювальні реагенти, вільні радикали, арахідонова кислота, кінази та протеази.

ASICs активуються протонами та непротонними молекулами, такими як GMQ (лише для ASIC3). Активация ASIC1a, потенціал керованих кальцієвих каналів, рецепторів глутамату та вивільнення пулів кальцію збільшує його внутрішньоклітинну концентрацію. Внаслідок цього викликаються події сигналізації нижче, включаючи активацію CaMKII. Активність ASIC також регулюється взаємодією з CaMKII, PKA, PKC,

AKAP150, PICK1 та, можливо, іншими білками PDZ-домену, такими як CIPP (рис. 1.11) (Chu et al., JPPR, 2011)

Як і багато інших мембранних білків, білки ASIC взаємодіють з іншими білками, деякі з яких були виявлені в останні роки (Wemmie et al., 2006). PDZ домени на цитоплазматичному С-кінці залучені до багатьох із цих взаємодій. У багатьох випадках ці взаємодії впливають на експресію або локалізацію ASICs на клітинній поверхні, їх регуляцію.

Позаклітинна концентрація Ca^{2+} впливає на рН-залежність ASICs таким чином, що передбачає конкуренцію між Ca^{2+} та H^+ за загальний сайт зв'язування. Було показано, що підвищення концентрації позаклітинного Ca^{2+} до 10 ммоль зміщує рН-залежність активації до більш кислих значень у ASIC1a та ASIC3 (Babini et al., 2002; Immke and McCleskey, 2003). Аналогічний зсув Ca^{2+} -залежності був показаний для рН-залежності ССД у ASIC1a та ASIC1b (Babini et al., 2002).

Збільшення нейрональних ушкоджень, спричинених сперміном, у тваринних моделях інсульту може бути наслідком такого механізму (Duan et al., 2011). Позаклітинний Ca^{2+} також пригнічує максимальні струми, блокуючи пори з IC_{50} порядку мілімолів. Зниження провідності Ca^{2+} було продемонстровано в ASIC1a, ASIC2a та ASIC3 (de Weille and Bassilana, 2001; Immke and McCleskey, 2003; Paukert et al., 2004; Zhang et al., 2006). Залежно від умов рН, збільшення позаклітинної концентрації Ca^{2+} , таким чином, може або збільшувати амплітуди струму відповідно кислого зміщення рН-залежності ССД, або зменшувати їх за рахунок зсуву активації рН залежності і блоку пори (Babini et al., 2002; Wu et al., 2004). Залежність Ca^{2+} і H^+ струмів ASIC3 сумісна з механізмом відкритого ASIC3 H^+ , шляхом зняття конститутивного блоку пори за допомогою Ca^{2+} (Immke and McCleskey, 2003). Однак, після мутації залишків, що утворюють сайт зв'язування Ca^{2+} у порі ASIC1a, мутантні канали не були конститутивно відкритими, але все ще активувались протонами (Paukert et al., 2004). А у ASIC1 морської риби зменшення концентрації Ca^{2+} відкривало більше

каналів і не виявляло властивостей, пов'язаних з блоком пори, таким як, наприклад, збільшення середнього відкритого часу (Zhang et al., 2006).

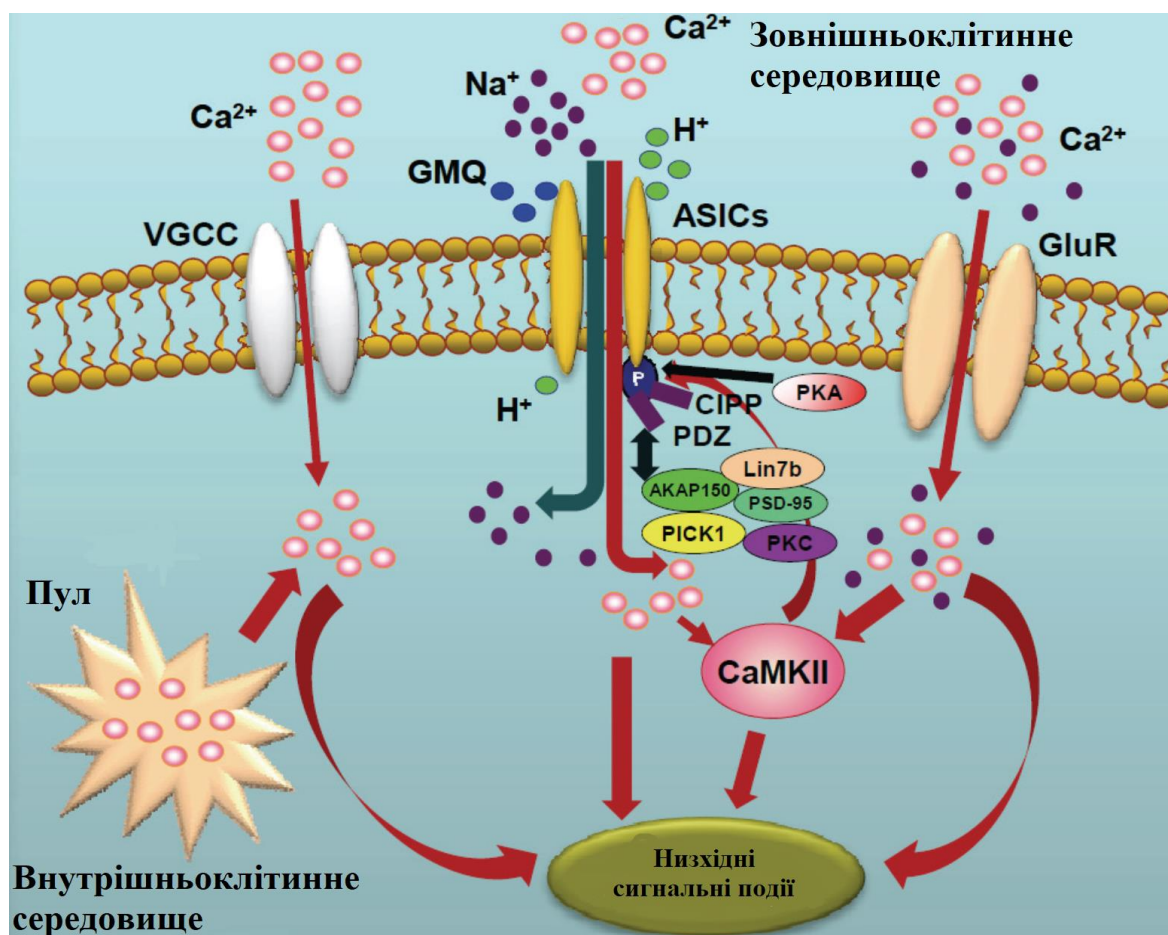


Рисунок 1.11. Модуляція протон-чутливих іонних каналів позаклітинними та внутрішньоклітинними сигнальними молекулами. ASICs активуються протонами та непротонними молекулами, такими як GMQ (лише для ASIC3). Активація ASIC1a, потенціал-керованих кальцієвих каналів (VGCC), глутаматних рецепторів (GluRs) і викидів внутрішньоклітинних пулів кальцію (Ca^{2+}) збільшує внутрішньоклітинний кальцій. В результаті збільшення кальцію і викликає подальші сигнальні події, включаючи активацію кальмодулін-залежної протеїнкінази (CaMKII). Активність ASICs також регулюється взаємодією з CaMKII, протеїнкіназою А (PKA), протеїнкіназою С (PKC), кальциневрином, білком PICK1 та, можливо, іншими білками домену PDZ, такими як CIPP (Chu et al., 2011).

Анаеробний метаболізм під час ішемії може призвести до позаклітинної концентрації лактату 12–20 мкмоль (в нормі ~1 мкмоль (Schurr, 2002)). При цих концентраціях лактат посилює струми ASIC1a та ASIC3 (Immke and McCleskey, 2001; Allen and Attwell, 2002). Лактат – це слабкий хелатор Ca^{2+} та інших двовалентних катіонів. Індукованого зниження концентрації вільного Ca^{2+} достатньо для збільшення струмів ASIC (Immke and McCleskey, 2001).

ASIC1a інгібується наномолярними концентраціями Zn^{2+} , тоді як мікромольні концентрації необхідні для інгібування ASIC1b та ASIC3 (Chu et al., 2004; Poirot et al., 2006; Jiang et al., 2010, 2011). Інгібування ASIC1b та ASIC3 є рН-незалежним, тоді як зсув рН-залежності активації до закислення сприяє Zn^{2+} інгібуванню ASIC1a. Цікаво, що індуковані H^+ струми, опосередковані каналами, що містять ASIC2, підсилюються через Zn^{2+} завдяки лужному зсуву рН-залежності активації (Baron et al., 2001). Залишки, важливі для Zn^{2+} , були знайдені у пальці ASIC1a та ASIC1b, а також у пальці та великому пальці ASIC2a (Baron et al., 2001; Chu et al., 2004; Jiang et al., 2011). Lys134, який є критичним для інгібування ASIC1a Zn^{2+} , також бере участь у окисно-відновній регуляції ASIC1a (Chu et al., 2006; Cho та Askwith, 2007).

У ASICs, *динорфіни* та більш короткі *RFamide* пептиди зміщують рН-залежність ССД до більш кислих значень. Пептиди RFamide також уповільнюють кінетику десенсibiliзації та індукують стійкий струм у деяких ASICs (Askwith et al., 2000; Lingueglia et al., 2006; Sherwood et al., 2012). FMRFamide і структурно споріднені пептиди розповсюджені у нервовій системі безхребетних, де вони функціонують як нейромедіатори та модулятори. Споріднені пептиди також зустрічаються у ссавців і функціонують шляхом зв'язування з рецепторами G-білків. Ці пептиди впливають на функцію ASIC1 та ASIC3, але не ASIC2. EC_{50} динорфіну А і пептидів RFamide для модуляції ASICs приблизно 10–50 мкмоль (Lingueglia et al., 2006; Sherwood and Askwith, 2009). Залишки в петлі, що зв'язують $\beta 9$

долоні з $\alpha 4$ великого пальця, беруть участь у впливі пептидів RFamide на ASIC1a (Sherwood and Askwith, 2008). Динорфіни можуть конкурувати з PсTx1 у зв'язуванні з кислотною кишенею (Sherwood et al., 2012).

Модуляція ASIC, в основному з рекомбінантним ASIC1a або в нейронах, показала збільшення, майже у 3 рази, за рахунок відновлення реагентів та інгібування шляхом окиснення реагентів (Andrey et al., 2005; Chu et al., 2006; Cho та Askwith, 2007). Залежно від умов, ефекти відновлюючих речовин у деяких випадках були лише повільно оборотні. Пікове збільшення струму відновлюючими агентами було зумовлене лужним зсувом рН-залежності активації у рекомбінантному ASIC1a та в ASIC кортикальних нейронів миші (Chu et al., 2006; Cho та Askwith, 2007). У рекомбінантних ASIC1a та ASIC з тригемінальних нейронів відновлюючі агенти також уповільнювали кінетику десенсибілізації (Andrey et al., 2005; Cho і Askwith, 2007).

Оксид азоту (NO) виступає медіатором запалення і регулює функцію білка, використовуючи непрямий механізм, що включає вироблення cGMP, або безпосередньо шляхом S-нітрозилювання залишків Cys, що може призвести до утворення дисульфідних зв'язків. NO донори збільшували амплітуди пікового струму всіх гомомерних ASICs приблизно у 2.5 рази. Для ASIC1a було показано, що це пов'язано з лужним зрушенням рН-залежності активації. NO діяв безпосередньо на ектодомені ASIC, хоч місце дії і не відоме. Місцеве застосування донора NO гліцерил тринітрату посилювало відчуття болю, спричиненого кислотою у добровольців (Cadiou et al., 2007).

Арахідонова кислота (AA) – метаболіт мембранних фосфоліпідів, що утворюються фосфоліпазою A₂. Його концентрація збільшується при ішемії та запаленні, і було показано, що вона модулює функцію декількох типів каналів (Chu et al., 2011). AA потенціювала ASICs струми в нейронах ЦНС та ПНС і рекомбінантних ASIC1a та ASIC3, і в багатьох випадках збільшувала фракцію постійного струму (Allen and Attwell, 2002; Smith et

al., 2007). Було показано, що підвищення рівня струму ASIC3, викликане АА, зумовлене лужним зсувом рН-залежності активації (Deval et al., 2008).

Серотонін та інші медіатори запалення, такі як фактор росту нервів, підвищують рівень мРНК ASICs (Mamet et al., 2002). Серотонінові або підтипові специфічні агоністи 5-НТ рецепторів також потенціювали струми ASIC в сенсорних нейронах (Deval et al., 2004), або шляхом прямої дії на ASIC3 (Wang et al., 2013), або через активацію 5-НТ₂ рецепторів (Qiu et al., 2012). І серотонін, і агоніст 5-НТ₂ α -methyl-5-НТ, підвищували кислотно-індуковані ноцицептивні реакції.

Агоніст канабіноїдних рецепторів WIN55,212-2 інгібував струми ASIC нейронів DRG до ~50% при IC₅₀ 10⁻⁹моль, не змінюючи рН-залежність ASIC (Liu et al., 2012). Це інгібування опосередковувалось рецептором канабіноїдів типу 1.

Інсульт, травма мозку та інші патологічні стани можуть погіршити цілісність гематоенцефалічного бар'єру та дозволити протеазам, які вивільнились з крові, попасти до ЦНС (Gingrich and Traynelis, 2000). Серинові протеази модулюють функцію різних іонних каналів, включаючи ASICs (Poitrot et al., 2004). Трипсин та інші серинові протеази зміщують рН-залежність ССД та активацію ASIC1a до більш кислих значень. Це зменшує струми ASICs в умовах фізіологічного рН, але збільшує амплітуди струму в ситуаціях зниженого рН, таких як ішемія. Поточна модуляція обумовлена розщепленням білка ASIC1a у Arg146 (рис. 1.5) (Vukicevic et al., 2006). Вплив трипсину на ASIC1a знижував відносну проникність для Ca²⁺ (Neaga et al., 2005), що може зменшити токсичність для клітини під час тривалої активності ASIC. Показано, що тканинний каліклірен, що розщеплює ASIC1a виконує захисну функцію клітин, які експресують ASIC1a, від пошкодження, викликаного ацидозом (Su et al., 2011). В цьому дослідженні не перевірялось, чи змінюється розщеплення функціональних властивостей ASIC1a; проте був зроблений висновок, що захисний ефект, ймовірно, обумовлений зміненою функцією ASIC1a.

Активатор протеїнкінази С (PKC) 1-олеїл-2-ацетил-sn-гліцерол потенціює струми ASIC2a лише у присутності білка, що взаємодіє з С-кіназою 1 (PICK1) (Baron et al., 2002). Місця взаємодії PICK1 були знайдені на ASIC1a, -2a та 2b (Baron et al., 2002; Duggan et al., 2002; Hruska-Nageman et al., 2002; Deval et al., 2004). Модуляція PKC струмами ASIC2a вимагає присутності домену PDZ PICK1 та домену зв'язування PDZ на С-кінці ASIC2a і передбачає фосфорилування залишку T39 на N-кінці. Форбол, що активує PKC, посилює струми ASIC2b/3, індукуючи лужний зсув у рН-залежності активації (Deval et al., 2004). Для цього ефекту необхідна наявність PICK1 та його ділянки зв'язування на С-кінці ASIC2b, що передбачає фосфорилування залишків ASIC3. Базальна експресія ASIC3 в сенсорних нейронах залежить від активації нейротропного рецептора тирозинкінази типу 1 фактором росту нерва, що, в свою чергу, призводить до активації шляху фосфоліпази С/PKC (Mamet et al., 2003). На відміну від ASIC2, ASIC1a фосфорилується не PKC, а протеїнкіназою А (Leonard et al., 2003). Протеїнкіназа А фосфорилує залишок S479 С-кінця і порушує зв'язування PICK1, тим самим впливаючи на локалізацію ASIC1a.

При глобальній ішемії внутрішньоклітинні концентрації Ca^{2+} збільшуються. Активність NMDA рецепторів призводить до активації залежної від кальцію/кальмодуліну протеїнкінази II, яка фосфорилує С-кінцеві залишки ASIC1a (Gao et al., 2005). Це сенсibiliзує канал до протонів і, таким чином, потенціює його струми.

1.6 Фармакологія ASICs

Амілорид. Амілорид пригнічує перехідні струми ASIC зі значеннями IC_{50} порядку 10–100 мкмоль (Kellenberger and Schild, 2002). Стійкий компонент струму ASIC3 лише частково гальмується або навіть збільшується амілоридом (de Weille et al., 1998; Babinski et al., 1999; Yagi et al., 2006; Li et al., 2011b). Амілорид викликає конформаційну зміну ASIC2a

(Adams et al., 1999). Ці спостереження дозволяють припустити, що амilorид зв'язується з двома різними ділянками в ASIC. Було показано, що залишки долоні необхідні для посилення індукованого амilorидом струму в ASIC3 (Li et al., 2011). У відкритій структурі MitTx-cASIC1 амilorид був виявлений у кислотних кишнях (Baconguis et al., 2014). При мікромольних концентраціях амilorид також інгібує ENaC, кальцієві канали T-типу та натрієво-протонний обмінник (Kleyman and Cragoe, 1988). Амilorид блокував кортикальну депресію, що поширюється у гризунів, та зменшував симптоми аури та головного болю у людей (Holland et al., 2012). Недавнє дослідження показало, що амilorид виконує нейропротекторну дію у хворих на розсіяний склероз (Arun et al., 2013).

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) – аспірин, диклофенак та ібупрофен запобігають запаленню, викликаному значним збільшення рівня мРНК ASICs у DRG (Voilley et al., 2001). Струми ASICs інгібуються за допомогою НПЗП зі значеннями IC_{50} до декількох мілімоль (Voilley et al., 2001; Dorofeeva et al., 2008), таким чином, зі 100- до 1000-кратно меншим потенціалом інгібування циклооксигеназ цими препаратами (Warner et al., 1999). Тому ймовірно, що інгібування експресії ASICs, а не експериментально спостережене пригнічення струмів, може сприяти клінічним ефектам НПЗП.

A-317567 структурно не пов'язаний з амilorидом і інгібує струми ASICs в нейронах DRG зі значеннями IC_{50} 2–30 мкмоль (Dube et al., 2005). На відміну від амilorиду, A-317567 інгібує перехідні та стійкі ASICs-струми з аналогічною силою. У тваринних моделях болю A-317567 виявився більш ефективним ніж амilorид. Згодом серію індол-амідинів тестували для інгібування ASIC3, ідентифікуючи сполуки, що інгібують ASIC3, з $IC_{50} < 1$ мкмоль, що частково змінило механічну гіперчутливість після запалення лапи (Kuduk et al., 2009a). Різні антипротозойні діариламідини інгібували ASICs з IC_{50} 0.3–38 мкмоль (Chen et al., 2010).

Нафамостат використовують клінічно, як інгібітор серинової протеази (Fujii та Hitomi, 1981), інгібує струми ASICs, включаючи стійкий компонент струму ASIC3, з $IC_{50} \sim 2-70$ мкмоль (Ugawa et al., 2007). Обстеження бібліотеки фрагментів і подальша оптимізація давали 2-амінопіридинові похідні, які інгібували ASIC3 з $IC_{50} \sim 3$ мкмоль (Wolkenberg et al., 2011). Струми ASICs інгібуються місцевими анестетиками, такими як тетракаїн та лідокаїн зі значеннями $IC_{50} \sim 10$ мкмоль і інгібітором K^+ каналу 4-амінопіридином зі значеннями $IC_{50} \geq 1$ мкмоль (Lin et al., 2011; Voiko et al., 2013; Leng et al. ., 2013).

GMQ при pH 7.4 викликає стійкі струми ASIC3 та індукує хворобливу поведінку у диких типів мишей (Yu et al., 2010). *GMQ*, який поділяє деяку структурну схожість з амілоридом, був першим виявленим активатором ASICs, окрім протонів. Було показано, що легкий ацидоз та зниження позаклітинної концентрації Ca^{2+} посилюють струми, спричинені *GMQ*. Кілька залишків у долоні є критичними для ефектів *GMQ* (Yu et al., 2011). Ковалентна модифікація одного із цих залишків, Glu79, є достатньою для активації ASIC3, що дозволяє припустити, що *GMQ* може зв'язуватися з центральною порожниною, утвореною доменами нижньої долоні (Yu et al., 2010). Потенціал *GMQ* для активації ASIC3 низький при рівні $EC_{50} \sim 1$ мМ при фізіологічній концентрації Ca^{2+} . Дослідження щодо механізмів дії *GMQ* показало, що ця сполука викликає кислий зсув pH-залежності ССД і лужний зсув pH-залежності активації ASIC3, викликаючи струм при фізіологічному pH (Alijevic and Kellenberger, 2012). При більш високих концентраціях *GMQ* гальмує струми ASIC поровим блоком.

Метаболіти аргініну *агматин* та *аркаїн* мають подібний вплив на ASIC3 (Li et al., 2010c). Рівень агматину підвищується під час травми, інфекції та онкозахворювань. У поєднанні з іншими ендогенними ASICs модуляторами, такими як АА, агматин може впливати на функцію ASICs у фізіологічних або патологічних умовах. Агматинові ін'єкції викликали у мишей поведінку, схожу на больові відчуття.

Токсини отрути, що діють на ASICs, сприяли розумінню фізіологічних та патологічних функцій ASICs (Baron et al., 2013). Найважливіші токсини, орієнтовані на ASICs, – це павуковий токсин Psalmitoxin1 (PcTx1) (Escoubas et al., 2000), токсин морської анемони APETx2 (Diochot et al., 2004) та зміїні токсини Mambalgin-1–3 (Diochot et al., 2012) та MitTx (Bohlen et al., 2011). APETx2 та Mambalgins є інгібіторами, MitTx (рис. 1.12а) є активатором ASIC, а PcTx1 (рис. 1.12б) діє залежно від підтипу ASICs та умов рН або як інгібітор, або активатор. PcTx1 і Mambalgin є модифікаторами решітки.

Токсини морської анемони Ugr 9-1 інгібують струми ASIC3 з $IC_{50} \sim 10$ мМ (Osмаkov et al., 2013). PcTx1 інгібує ASG-струми DRG нейронів з $IC_{50} \sim 100$ нМ (Rodriguez et al., 2014). Ці токсини, орієнтовані на ASICs, є незначними компонентами отрути, і їх використання для організму, що їх продукує, є незрозумілим, за винятком MitTx, який провокує біль.

Псалмотоксин1 (PcTx1). PcTx1 павука *Psalmoroeus cambridgei* інгібує гомомерну ASIC1a та гетеромерну ASIC1a/2b з наномолярним потенціалом (Escoubas et al., 2000; Sherwood et al., 2011).

PcTx1 прив'язується до кислотних кишень ASICs в стехіометрії трьох PcTx1 молекул на тример каналу (рис. 1.12, а). Гідрофобне з'єднання PcTx1 прив'язується до спіралі великого пальця $\alpha 5$, а основне скупчення (Arg27, Arg28, світло-зелений) простягається глибоко в кислотну кишеню (Baconguis and Gouaux, 2012; Dawson et al., 2012).

Функціональне значення декількох взаємодіючих залишків на токсині та каналі раніше було продемонстровано методом мутагенезу (Salinas et al., 2006; Saez et al., 2011).

PcTx1 зміщує рН залежність ASIC1a від ССД і до більш лужних значень і тим самим десенсибілізує канал при рН 7.4 (Chen et al., 2005).

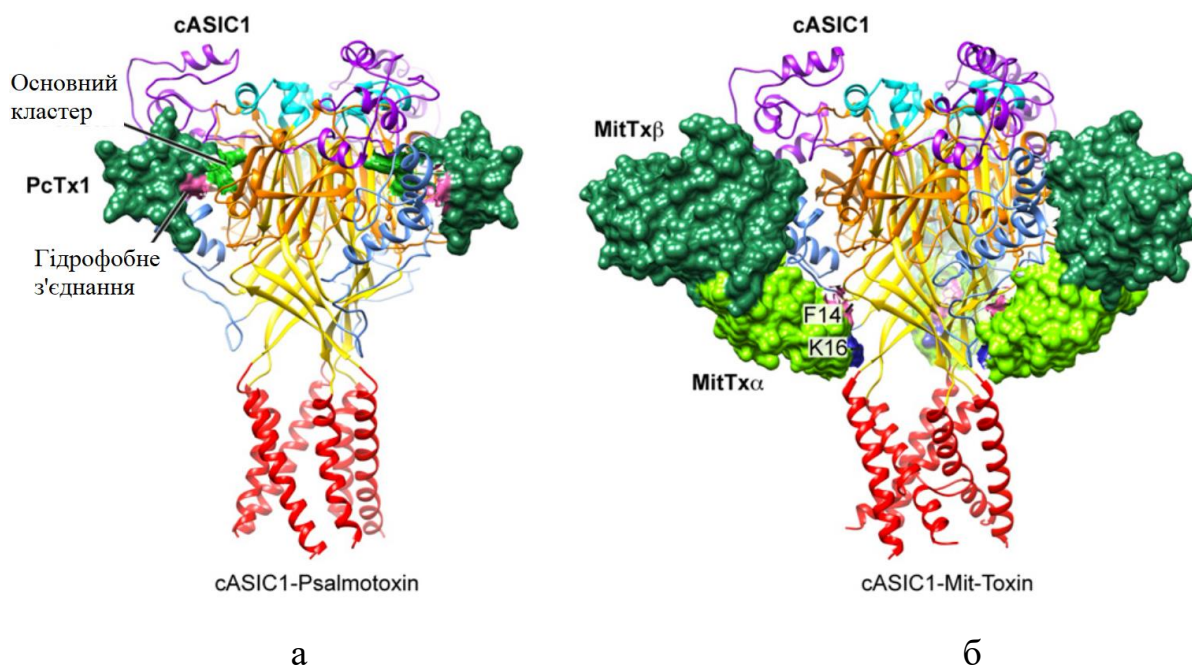


Рисунок 1.12. Структурні зображення тримера cASIC1 з молекулами PsTx1 (а) (Protein Data Bank ID 4FZ1) (Bacongus and Gouaux, 2012) та MitTx α + β (б) (Protein Data Bank ID 4NTW) (Bacongus et al., 2014).

При більш високих концентраціях PsTx1 також зв'язується з ASIC1b, що також викликає лужні зрушення залежності від рН. Оскільки ССД виникає при більш кислому рН у ASIC1b порівняно з ASIC1a, а зсув, індукований PsTx1, невеликий у ASIC1b, PsTx1 не інгібує ASIC1b у фізіологічних умовах рН, а навпаки, посилює струми ASIC1b при слабокислому рН (Chen et al., 2006). PsTx1 активує ASIC1 при рН 7.4 (Samways et al., 2009; Bacongus and Gouaux, 2012), що дозволяє припустити, що PsTx1 індукує лужне зміщення залежності від рН активації cASIC1.

APETx2. Цей токсин морського анемону *Anthopleura elegantissima* інгібує гетеромери, що містять ASIC3 та ASIC3, зі значеннями IC_{50} в діапазоні від 63 нМ до 2 мкмоль (Diochot et al., 2004). *APETx2* поділяє 64% ідентичності послідовності з інгібітором каналу HERG *APETx1* та 25–35% ідентичності з кількома токсинами, орієнтованими на Kv і Nav (Diochot et al., 2004). На основі структури розчину нативного пептиду *APETx2* та

порівнянні з супутніми токсинами було висловлено припущення, що поверхня, що взаємодіє з каналом, може складатися з основних та ароматичних залишків (Chagot et al., 2005). Нещодавно було показано, що один з цих ароматичних залишків, Phe15, важливий для інгібування ASIC3 (Anangi et al., 2012). Місце дії APETx2 невідомо. На підставі присутності поверхневої плями ароматичного токсину було висловлено припущення, що APETx2 може зв'язуватися з кислотною кишенею як PcTx1 (Baron et al., 2013). APETx2 не є селективним для ASICs та інгібує залежні від напруги струми Na^+ в нейронах DRG з IC_{50} 2.6 мкмоль, рекомбінантним $\text{Na}_v1.8$ (IC_{50} 55 нмоль або 19 мкмоль, залежно від дослідження) та $\text{Na}_v1.2$ (IC_{50} 114 нмоль) (Blanchard et al., 2012; Peigneur et al., 2012).

Мамбалгіни. Mambalgin-1 і -2 від чорної мамби та Mambalgin-3 від зеленої мамби відрізняються лише однією амінокислотою та інгібують ASIC1a, ASIC1b і ASIC1a що містять гетеромери, зі значеннями IC_{50} в межах від 11 до 250 нмоль (Diochot et al., 2012; Baron та ін., 2013). Моделювання тривимірної структури мамбалгінів робили за допомогою ядерної магніторезонансної спектроскопії (Schroeder et al., 2014) і показали, що вони утворюють нове підсемеєство токсинів, які складаються з трьох пальців. Поверхня пептиду містить гідрофобний зв'язок та кілька скупчень основних або кислотних залишків. Поєднання мутагенезу та функціонального аналізу показало, що Мамбалгін-2 зв'язується в кислотній кишені зі спіраллю великого пальця $\alpha 5$, β -кулі та до долоні сусідньої субодиниці (Salinas et al., 2014; Schroeder et al., 2014). Це дуже близько до сайту зв'язування PcTx1, і дивно, що PcTx1 і Mambalgin-1, схоже, не взаємодіють один з одним на ASIC1a (Diochot et al., 2012). Mambalgin-1 сильно зміщує криву активації до більш кислих значень, запобігаючи тим самим відкриттю каналу.

Mit-токсин. MitTx техаської коралової змії утворюється за допомогою нековалентної взаємодії між двома пептидами MitTx α , пептидом типу та MitTx β , фосфоліпазою A_2 -подібного білка (Bohlen et al., 2011). Цей комплекс нагадує β -бунгаротоксини, в яких пептид Kunitz типу

та домен фосфоліпази A₂ ковалентно пов'язаний дисульфідним зв'язком (Doley and Kini, 2009). MitTx індукує повільну активацію ASIC1a, ASIC1b та ASIC3 зі значеннями EC₅₀ 9, 23 та 830 нмоль відповідно. Він потенціює струми ASIC2a з EC₅₀ 75 нмоль, індукуючи сильний лужний зсув кривої активації. Механізм дії MitTx наразі невідомий. Одна з останніх відкритих структур ASIC була отримана із комплексу cASIC1-MitTx, відкриваючи структуру та сайт зв'язування MitTx (Baconguis et al., 2014). Три молекули MitTx зв'язуються з одним тримером каналу (рис. 1.12, б). Зверху, гетеродимери токсину виступають з країв тримера cASIC1. Гетеродимер токсину утримується між собою завдяки великій взаємодії між двома субодиницями. Він взаємодіє головним чином із зап'ястями, долонею та великим пальцем домену cASIC1, але не потрапляє до кислотної кишені, як і PcTx1. MitTxβ утворює верхню частину, взаємодіючи із залишками α спіралі, що складається з двох великих пальців, а MitTxα сягаючи мембранної площини, взаємодіє із залишками двох петель долоня – великі пальці. MitTxα вставляє свій залишок F14 (рожевий на рис. 1.12б) внизу долоневих доменів між двох сусідніх субодиниць, де вона взаємодіє з лінкером β1-β2, а Lys16 (темно-синій) розміщується в зап'ясті між β-поворотом і верхнім кінцем TM1. Ці взаємодії можуть відкрити долоню і змінити конформацію пори, щоб відкрити пору каналу.

Інгібітор ASIC1a каналу 2-оксо-2H-хромоне-3-карбоксамідин (5b).

Кислотні іонні канали 1a (ASIC1a) мають вирішальне значення у численних фізіологічних та патологічних процесах мозку. Нашими колегами (Buta et al., 2015) було розроблене нове похідне 2-оксо-2H-хромону-3-карбоксамідин (5b), яке пригнічує струми ASIC1a з IC₅₀ 27 нмоль при вимірюванні при pH=6.7. Підкислення до pH=5.0 зменшує ефективність гальмування на 3 порядки. Молекула 5b не тільки зміщує залежність pH від активації ASIC1a, але й пригнічує її максимальну викликану реакцію (рис. 1.13). З'єднання 5b зв'язується з pH сенсором ASIC1a, який діє як ортостеричний неконкурентний антагоніст. При 100 нмоль сполука 5b

повністю інгібує індукцію LTP у зонах CA3-CA1, але не у синапсах MF-CA3 (Buta et al., 2015).

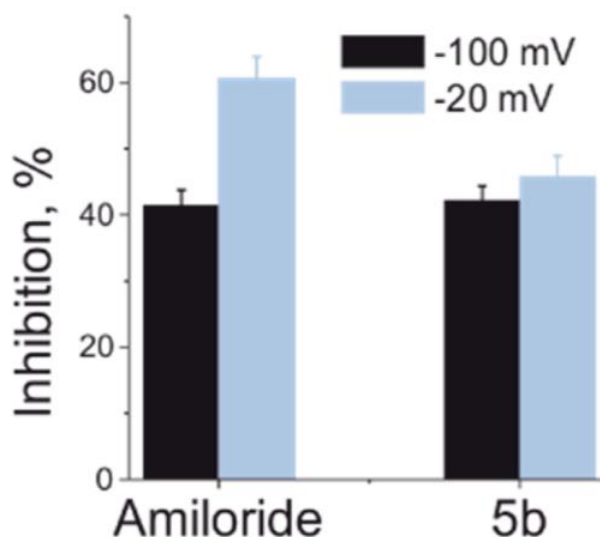


Рисунок 1.13. Пригнічення струмів ASIC1a, спричинених 100 нмоль сполукою 5b проти 10 мкмоль амілориду при зазначених напругах. Амілорид блокував струм ASIC1a до $41.34 \pm 2.42\%$ при -100 мВ, проте при зміні напруги на -20 мВ зменшив цю блокаду до $60.70 \pm 3.23\%$. В свою чергу з'єднання 5b викликало подібне гальмування при обох цих напругах $42.12 \pm 2.26\%$ і $45.78 \pm 3.13\%$ відповідно, що свідчить про відсутність залежності напруги від блокуючої дії (Buta et al., 2015).

Таким чином, з'єднання 5b є найбільш ефективним при незначних закисленнях (рис.1.14). Різні патологічні стани, такі як ішемічний інсульт, епілепсія, запалення тощо характеризуються як раз легким підкисленням тканини. Такого незначного падіння позаклітинного рН з 7.4 до 6.8 достатньо для значної мембранної деполяризації, що супроводжується серіями потенціалів дії (Jiang et al., 2009).

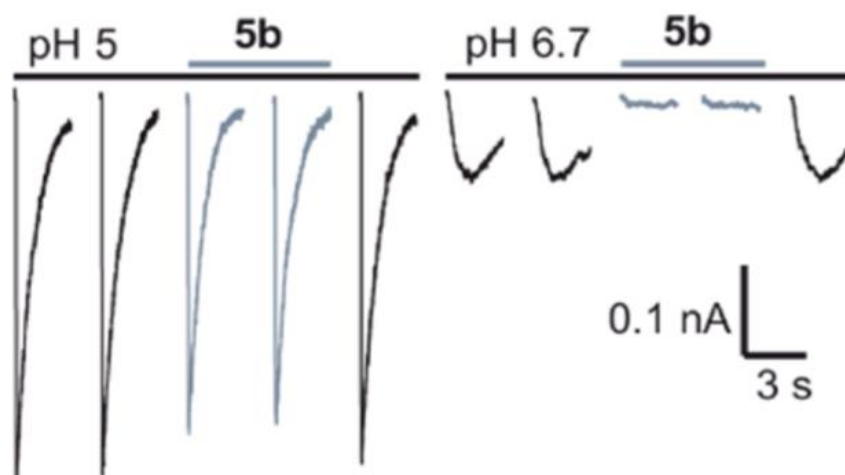


Рисунок 1.14. Репрезентативні струми ASIC1a, експресованого у клітинах HEK 293, активовані шляхом зміни рН від 7.4 в контрольних умовах та під впливом 100 нмоль сполуки 5b (Buta et al., 2015).

Розроблена хімічна сполука може бути використана для розробки нових потужних антагоністів ASIC1a, які можуть бути використані для лікування численних захворювань та патологій мозку.

1.7 Залучення ASICs до синаптичної пластичності та формуванні пам'яті

Порушення гена, що кодує ASIC1a у мишей, виключає більшість струмів, що викликані закисненням, в центральних нейронах. Відповідно до присутності ASIC1a в постсинаптичній мембрані, довготривала потенціація (LTP) була порушена у всіх нокаутних мишей ASIC1a (Wemmie et al., 2002). Якщо в цих експериментах позаклітинна концентрація Mg^{2+} залишалася низькою, то у тварин з нокаутом ASIC1a було нормальне значення LTP, що дозволяє припустити, що постсинаптична деполяризація, спричинена ASICs, може посилити функцію рецепторів NMDA шляхом видалення блоку Mg^{2+} . В іншому дослідженні на ASIC1a використання PcTx1 або специфічного ASIC1 нокаута призводило до втрати експресії ASIC1 і, отже,

до відсутності мРНК ASIC1a та струмів ASIC1a в нейронах мозку (Wu et al., 2013). В цьому дослідженні, після фармакологічної блокади або нокаутування ASIC1a, LTP гіпокампа був нормальним. У попередньому дослідженні блокування ASICs амilorидом не впливало на постсинаптичні струми в культивованих нейронах гіпокампа (Alvarez de la Rosa et al., 2003). Миші зі специфічним для нервової системи ASIC1a нокаутом не демонстрували дефіциту просторової пам'яті (Wu et al., 2013), на відміну від ASIC1a повністю нокаутних мишей, у яких спостерігався легкий дефіцит просторової пам'яті (Wemmie et al., 2002). Протилежні висновки між цими дослідженнями з різними нокаутними мишами ASIC1a можуть бути зумовлені різними стратегіями нокаутування, що призводить до видалення ASIC1a на самому початку (Wemmie et al., 2002) або під час ембріонального розвитку (Wu et al., 2013). Також це можуть бути відмінності в штаммах тварин або умовах експериментів, наприклад, відсутність лікарських препаратів у вимірюваннях LTP у нокаутних тварин та використання інгібітора рецепторів GABA_A у відповідних експериментах у специфічних для нервової системи ASIC1a нокаутів.

У двох дослідженнях показано внесок ASICs в синаптичну пластичність в різних областях мозку миші. У нейронах прилеглого ядра (NAc) і бічних пірамідальних нейронах мигдалини незначна частка (~5%) викликаного збуджувального постсинаптичного струму з'являється завдяки активації ASICs (Du et al., 2014; Kreple et al., 2014). Пресинаптична стимуляція тимчасово знижувала рН у шипах та сусідніх дендритах бічних пірамідних нейронів мигдалини, що відповідає вивільненню протона з синаптичних везикул (Du et al., 2014). Це дослідження також показало, що LTP в бічній мигдалині залежало від наявності ASICs та збільшення концентрації протона. NAc бере участь у навчанні та поведінці, пов'язаній із залежністю. Виявлено, що ASIC1a в NAc інгібує синаптичну пластичність та обумовлену кокаїном поведінку гризунів (Kreple et al., 2014). У тесті на перевагу місця, що обумовлене кокаїном, миші ASIC1a^{-/-} показали більшу

перевагу до умов, асоційованих з кокаїном, ніж контрольні миші дикого типу. Щури, які переекспресували ASIC1a в NAc після місцевої ін'єкції вірусного вектора, вживали менше кокаїну, ніж контрольні щури. Дослідження клітинних механізмів, що лежать в основі цього ефекту ASIC1a, виявило невеликий внесок ASICs у збудливий постсинаптичний струм, як було сказано вище. Однак аналіз також показав, що втрата ASIC1a збільшує дендритну щільність хребта та частоту мініатюрних EPSC в NAc, що відповідає підвищеній збудливій передачі. Глутаматні рецептори NAc важливі для поведінки, пов'язаної із залежністю, і відмінності у функціональному профілі рецепторів глутамату спостерігалися між нейронами NAc незалежних до кокаїну тварин та тварин, яким перестали давати кокаїн. Це дослідження показало, що нейрони NAc-незалежних до кокаїну ASIC1a^{-/-} мишей демонстрували профіль рецепторів глутамату тварин дикого типу, яким перестали давати кокаїн. Це дозволяє припустити, що ASIC, впливаючи на властивості рецептора глутамату, може запобігати пов'язаним з кокаїном змінам в складі синапсів NAc (Kreple et al., 2014). З огляду на ці дослідження можна припустити, що залежно від області мозку, ASICs або сприяють або пригнічують синаптичну пластичність.

1.8 Роль ASICs у формуванні страху та тривожності

Оскільки експресія ASIC1a висока у мигдалині, була досліджена можлива роль у поведінці, пов'язаній зі страхом. Було показано, що миші з повним нокаутом ASIC1a демонстрували дефіцит в обумовленого страху за сигналом або контекстом так само, як у безумовного страху в поведінці (Wemmie et al., 2003, 2013; Coryell et al., 2007). Нокаут ASIC1a також показав антидепресантний ефект у кількох поведінкових тестах з мишами (Coryell et al., 2009). Надмірна експресія ASIC1a посилила поведінку, пов'язану зі страхом (Wemmie et al., 2004). Було показано, що мигдалина реагує на кислий рН і тим самим викликає страх у поведінці (Ziemann et al., 2009).

Відомо, що збільшення рівня CO₂ викликає страх у поведінці людини і має такий же ефект у мишей. Гальмування або порушення функції ASIC1a, викликає порушення поведінки спричинене CO₂ (Ziemann et al., 2009). Локалізована експресія ASIC1a в мигдалині нокаутних ASIC1a мишей продемонструвала, що ASIC1a у мигдалині впливає на поведінку пов'язану зі страхом. Як було сказано вище, пресинаптична стимуляція знижує рН мигдалини і активізує ASIC в пірамідальних нейронах бічної мигдалини (Du et al., 2014). Недавні дослідження на щурах показали, що активація ASIC1a в базолатеральній мигдалині пригнічувала тривожну поведінку (Pidoplichko et al., 2014). Активація ASIC за допомогою введення амонію в базолатеральну мигдалину зменшувала час, проведений у центрі відкритого поля, в тесті “відкрите поле”, тоді як інгібування ASIC1a за допомогою PcTx1 мало протилежний ефект. Ін'єкція амонію також збільшила затримку щурів перед входом в темний відсік у тесті “світло-темне” поле. ASIC струми були присутні як в основних клітинах, так і в інтернейронах базолатеральної мигдалини у щурів. Активація ASICs призвела до збільшення IPSCs, ніж EPSCs в основних клітинах, що вказує на переважаючу інгібуючу дію ASICs щодо головної клітинної сигналізації (Pidoplichko et al., 2014). Більшість результатів, отриманих з нокауттованими мишами, було підтверджено фармакологічними підходами. Ймовірно залучення ASICs в базолатеральній сигналізації мигдалини може відрізнятися між мишами і щурами. В даний час дані щодо ролі ASICs у поведінці щурів, пов'язаній зі страхом, дуже обмежені. Необхідно розширити такі дослідження обумовленого страху за сигналом або контекстом та страху спричиненого змінами CO₂ і визначити, наскільки різна роль ASICs у поведінці, пов'язаній зі страхом, між мишами і щурами. Виявлені у людей поодинокі нуклеотидні поліморфізми ASIC1a асоціюються з панічним розладом, об'ємом мигдалини та реакціями, пов'язаними зі страхом (Smoller et al., 2014). Тому було б важливо визначити ASIC функцію, що змінюється в цих варіантах.

1.9 ASICs та больові відчуття

В таких умовах, як відчуття болю, запалення або ішемія, зазвичай, рН тканин знижений. Позаклітинний рН падає, наприклад, для серцевої ішемії до 6.7 (Cobbe and Poole-Wilson, 1980). Таким чином, ASICs в сенсорних нейронах є рецепторами до закислення, що викликає біль. ASIC1a та ASIC2 експресуються в областях ЦНС, де вони можуть додатково сприяти реакції на больові відчуття (Wemmie et al., 2013). Дослідження на людях-добровольцях показали, що місцева ін'єкція в шкіру або іонофорез кислотних розчинів викликала біль, яку запобігав амілорид з $pH_{50}=6.5$ таким чином, близький до pH_{50} ASIC1a та ASIC3 (Ugawa et al., 2002; Jones et al., 2004). Кілька досліджень на тваринах дали вагомні докази ролі периферичних ASIC3 та ASIC1 у больових відчуттях. Специфічний нокаут ASIC3 з інтратекальним введенням siRNA у щурів запобігав викликаній запаленням теплової гіпералгезії або тремтінню після місцевої ін'єкції речовин, що викликають подразнення (Deval et al., 2008). Синтетична сполука 2-гуанідин-4-метилхіназолін (GMQ) активує ASIC3 при фізіологічному рН та інгібує інші ASIC (Yu et al., 2010; Alijevic and Kellenberger, 2012). Місцеве введення GMQ в лапу миші викликало больову поведінку, яка залежала від наявності ASIC3, ще більше підтверджуючи важливість ASIC3 (Yu et al., 2010). Ряд досліджень продемонстрував внесок ASIC3 у форми болю, пов'язані із запаленням та хронічним закисленням (Sluka et al., 2009). Введення активатора ASIC Mit-токсину (MitTx) отрути техаської коралової змії в лапу миші викликало больову поведінку, яка зменшилася через порушення роботи ASIC1a (Bohlen et al., 2011). Нещодавно було показано, що інгібітор ASIC токсину tambalgin-1 з чорної отрути мамби зменшує больову поведінку після периферичних ін'єкцій через інгібування ASIC1b (Diochot et al., 2012).

Інтратекальна ін'єкція tambalgin-1 зменшила больову поведінку через інгібування ASICs, що містять субодиниці ASIC1a та/або ASIC2a.

Було показано, що основними функціональними ASICs у спинному мозку були гомомери ASIC1a та гетеромери ASIC1a/2a (Baron et al., 2008), а також, що РНК ASICs у спинному мозку регулювались периферичним запаленням (Duan et al., 2007). Введення в ЦНС РсТх1, специфічного інгібітора ASIC1a, зменшило больову поведінку, надалі продемонструвавши важливу роль ASIC1a у відчутті болю (Duan et al., 2007; Mazzuca et al., 2007). Недавнє дослідження показало, що ASIC1a у спинному мозку є мішенню нейротрофічного фактора мозку (BDNF) (Duan et al., 2012). BDNF посилював експресію на поверхні клітини ASIC1a, індукуючи фосфорилування N-термінального залишку Ser25 через каскад фосфоінозитиду 3-кінази-протеїнкінази В. Внутрішньоклітинна ін'єкція BDNF викликала механічну гіпералгезію, запобігти яку вдалось порушенням ASIC1a (Duan et al., 2012).

Мігрень пов'язана з підкисленням тканин у мозковій оболонці (dura). Функціональні зміни декількох типів іонних каналів можуть сприяти зміні стану збудливих нейронів, трійчасто-аферентних нейронів, іннервуючих мозкову оболону (Yan and Dussor, 2014). Більшість аферентів мозкової оболони щурів демонструють струми ASIC, які, ймовірно, опосередковуються каналами, що містять ASIC3 (Yan et al., 2011). Застосування синтетичної інтерстиціальної рідини з рН=5 до мозкової оболони викликає аллодінію обличчя та задньої лапи щурів. Лицьова аллодінія часто асоціюється з мігренню (Yan et al., 2011). Відомо, що амілорид пригнічує кортикальну депресію у гризунів та зменшує ступінь головного болю у 4 пацієнтів з 7 (Holland et al., 2012).

Разом ці дослідження вказують на ноцицептивну роль центральних та периферичних ASICs. Два дослідження показали, що у мишей, у яких були подавлені всі струми ASICs, спостерігалось посилення больової поведінки (Mogil et al., 2005; Kang et al., 2012). Миші з експресованою домінантно-негативною мутантною субодиницею ASIC3, були більш чутливими до механічного та хімічного/запального болю, та розвивали

більшу механічну гіперчутливість після запалення, ніж контролі дикого типу (Mogil et al., 2005). Миші з потрійним нокаутом, в яких ASIC1, ASIC2 та ASIC3 гени були порушені одночасно, демонстрували підвищену поведінкову чутливість до механічних подразників та підвищену механочутливість А-механоноцицепторів (Kang et al., 2012). Це вказує на те, що роль ASICs в ноцицепції все ще не повністю зрозуміла, незважаючи на багато важливих висновків.

1.10 Участь ASICs у механочутливості

Оскільки споріднені канали у *C. elegans* беруть участь у механочутливості, аналогічну можливу роль ASICs було досліджено у ссавців. В даний час є дані про експресію ASICs в первинних сенсорних нейронах та аферентах механорецепторів, отриманих або за допомогою функціонального аналізу ізольованих сенсорних нейронів, або за допомогою імуногістохімії (Chen and Wong, 2013). Порушення експресії різних ASICs спричиняло дефекти механотрансдукції в тканинах шкіри, шлунку, товстої та сліпої кишки (Chen and Wong, 2013). Ці ефекти найбільш яскраво продемонстровані в шлунково-кишковому тракті та в артеріальних барорецепторах. Механотрансдукція в шлунково-кишковій системі важлива для контролю шлункової координації та спорожнення, перистальтики товстої кишки та відчуття болю. Записи *in vitro* на одиничному волокні гастрозофагеального нерву або товстої кишки показали, що у мишей ASIC1^{-/-} збільшена, у мишей ASIC2^{-/-} змішана, а у мишей ASIC3^{-/-} знижена механочутливість до вісцеральних механорецепторів (Jones et al., 2005; Page et al., 2005). Аналіз травної функції показав, що у мишей ASIC1^{-/-} відбулася зміна функцій верхніх відділів шлунково-кишкового тракту, що призвело до повільного спорожнення шлунка, тоді як миші ASIC2^{-/-} демонстрували зменшення кількості фекальних гранул на добу, що свідчить про змінену функцію нижніх відділів кишок (Page et al., 2005). Барорецепторні нейрони

аорти в вузлових гангліях та їх терміналах експресують ASIC2. У мишей ASIC2^{-/-} виявили гіпертонічну хворобу, посилений симпатичний, знижений парасимпатичний контроль кровообігу та пониження барорефлексу (Lu et al., 2009). Порушення барорефлексу у мишей ASIC2^{-/-} говорить про те, що ASIC2 є визначальним фактором чутливості артеріального барорецептора і сприяє автономному контролю кровообігу.

Поки не вдалося продемонструвати механочутливість рекомбінантно експресованих ASICs або ASICs у DRG (Drew et al., 2004). Можливо тому, що ASIC повинні утворювати комплекси з іншими білками, щоб вони могли діяти як механосенсиори.

1.11 Роль ASICs у нейродегенеративних захворюваннях

Вважається, що надходження кальцію в нейрони є найважливішою причиною пошкодження нейронів після ішемічного інсульту. Оскільки ішемічний інсульт викликає підкислення тканин і ASIC1a частково проникний для Ca²⁺, можливий внесок ASIC1a в цю токсичність. Порушення гена ASIC1a або інгібування ASIC1a псалмотоксином зменшили обсяг інфаркту в експериментальній моделі інсульту на 60%, тим самим продемонструвавши важливий внесок ASIC1a в нейродегенерацію, викликану ішемічним інсультом (Xiong et al., 2004, рис. 1.15).

Внутрішньомозкове введення PcTx1 продовж 5 годин після оклюзії середньої мозкової артерії зменшило об'єм інфаркту на 50% (Pignataro et al., 2007). Подальші дослідження показали захисну дію порушення гена ASIC або пригнічення функції ASIC при ряді нейродегенеративних захворювань, включаючи розсіяний склероз, хворобу Хантінгтона та Паркінсона (Wemmie et al., 2013).

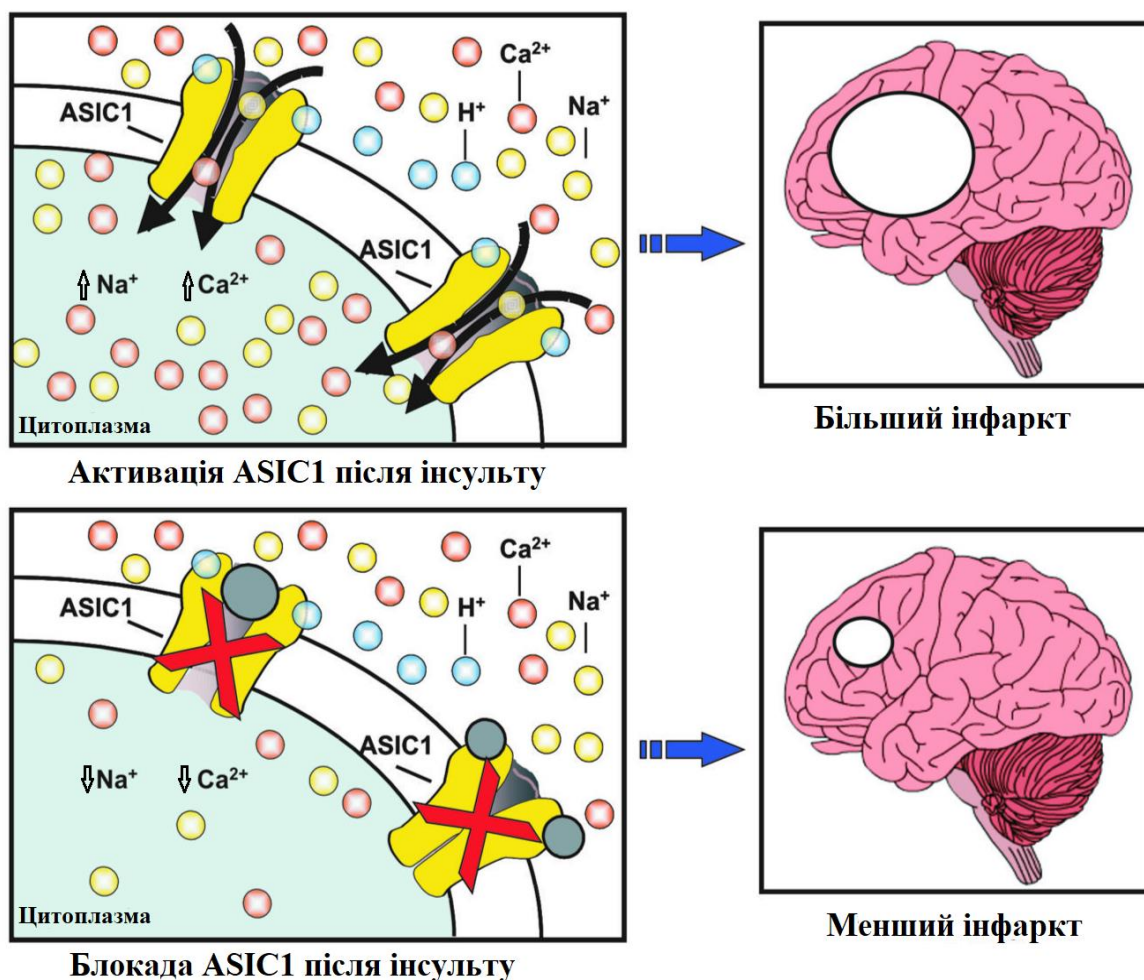


Рисунок 1.15. Роль активації ASIC1a в ішемічній травмі та нейропротекції блокатором / інгібітором ASIC1a. Зверху зліва представлені нейрони в ішемічних станах, де концентрація позаклітинних протонів висока. Зв'язування протонів відкриває канали, що призводить до припливу великої кількості іонів Na^+ та Ca^{2+} . Перевантаження нейронів іонами Ca^{2+} викликає пошкодження нейронів та великий об'єм інфаркту мозку (зверху справа). Знизу зліва представлені нейрони в ішемічних станах, але в присутності блокатора або інгібітора ASIC. Приплив іонів Na^+ та Ca^{2+} зменшується за рахунок прямої блокади каналу (наприклад, амілоридом) або зміни воріт каналу (наприклад, РсТХ1), що призводить до нейропротекції та невеликого об'єму інфаркту (знизу справа) (Xiong et al., 2008).

Після індукції експериментального аутоімунного енцефаломієліту миші з нокаутом ASIC1^{-/-} показали як помітно зменшений клінічний дефіцит, так і зменшену дегенерацію аксонів порівняно з мишами дикого типу (Friese et al., 2007). Далі було показано, що ASIC1a регулюється при ураженнях від експериментального аутоімунного енцефаломієліту у мишей та у хворих на розсіяний склероз (Vergo et al., 2011). У тваринних моделях та у хворих на розсіяний склероз людей лікування амілоридом виявилось нейропротекторним (Vergo et al., 2011; Arun et al., 2013). Цікаво, що асоціація між геном ASIC2 та розсіяним склерозом виявлена у віддаленій популяції людей на Сардинії (Bernardinelli et al., 2007).

1.12 ASICs та епілепсія

Епілепсія є поширеним у всьому світі тяжким неврологічним розладом (Ali et. al., 2018). Епілепсія скроневої частки (TLE) є найбільш поширеною формою часткової епілепсії і часто резистентна до відомих фармакологічних втручань (Télliez-Zenteno and Hernández-Ronquillo, 2012). TLE може бути спровокована по-різному: через травму мозку, гіпоксичну травму мозку, пухлини головного мозку, інсульт, мозкові інфекції, такі як енцефаліт та менінгіт, епілептичний стан (ЕС) та ін. (Loscher and Brandt, 2010). Правильне лікування ЦНС може значно знизити ризик розвитку судом. ЕС, визначений як безперервна судомна активність протягом більше 5 хв або послідовні судоми без відновлення свідомості, може бути серйозним наслідком ураження ЦНС (Trinka et. al., 2012). ЕС є потенційно небезпечним для життя за рахунок високого рівня смертності, навіть при відповідному фармакологічному втручанні (Rossetti, 2010). Епілептичний стан і ранні гострі напади, спричинені інфекціями, часто пов'язані з інсультами і зазвичай виникають одночасно з інфекцією, тоді як епілепсія з хронічними повторюваними випадками розвивається пізніше в результаті процесу, який називають “епілептогенезом” (Vezzani et. al., 2016).

Під час епілептичних випадків рН мозку знижується, і відомо, що ацидоз може закінчитися судомами. Порушення гена ASIC1a збільшило ступінь тяжкості випадків, і протилежний ефект спостерігався при надмірній експресії ASIC1a (Ziemann et al., 2008). Це дослідження показало, що експресія ASIC1a потребує для припинення випадків вдихання CO₂. Оскільки інгібіторні інтернейрони в гіпокампі демонструють більш високі амплітуди ASIC-струмів, ніж пірамідальні нейрони, можливо, опосередковане інгібування інтернейронів припинило напади (Ziemann et al., 2008). Високі концентрації амілориду пригнічують випадки (Ali et al., 2006; N'Gouemo, 2008; Luszczyki et al., 2009). Через свою гідрофільну природу, вірогідно, амілорид не перетне гематоенцефалічний бар'єр, і наразі не зрозуміло, чи досягає він мозку, чи має він протизапальну дію користуючись іншими механізмами. Амілорид не є специфічним для ASIC, і якщо він потрапить до мозку, його вплив на судоми може бути зумовлений пригніченням Na⁺/H⁺ обмінника, який, знижуючи внутрішньоклітинний рН, може знижувати епілептичну активність (Ali et al., 2006; Luszczyki співавт., 2009). Нещодавно генетичне дослідження показало зв'язок між одномолекулярними поліморфізмами ASIC1 та епілепсією скроневої частки (Lv et al., 2011).

Стратегії пошуку нових протиепілептичних препаратів в основному орієнтовані на початкову стадію інсульту та оборнення процесу епілептогенезу для запобігання розвитку хронічної епілепсії (Loscher, 2002; Loscher and Brandt, 2010).

Для перевірки потенційного протиепілептичного лікування у гризунів використовують каїнатну, пілокарпінову або літій-пілокарпінову модель індукованої епілепсії, які довели свою корисність у вивченні патофізіології та прогресуванні TLE. Ці моделі можуть відтворити поведінкові, електрографічні та невропатологічні особливості TLE людини (Ali et al., 2018).

Системне або внутрішньомозкове введення каїнату, потужного агоніста глутамату, широко застосовується для індукції епілептичних нападів у тварин (Bouilleret et al., 1999). Внутрішньочеревні або внутрішньогіпокампальні ін'єкції каїнату (КА) щурам призводять до повторних лімбічних нападів, пов'язаних з пірамідною втратою клітин і проростанням мохових волокон. Ці періодичні напади швидко генералізуються. У каїнатній моделі у щурів повторювані напади тривали протягом змінних періодів від 45 днів (Ben-Ari, 1985) до декількох місяців (McNamara, 1984). Втрата нейронів зони CA1 та характер дисперсії клітин у клітинному шарі зубчастих звивин, що нагадує гістологічні зміни у людей зі скроневою епілепсією, спостерігалась після мікроін'єкції каїнату в дорзальний гіпокамп мишей (Suzuki et al., 1995). Дієвість каїнатної моделі робить її дуже корисною для розуміння патофізіологічних змін, що відбуваються при скроневої епілепсії.

Прийом пілокарпіну призводить до ЕС і після латентного періоду без випадків, відомого як епілептогенез, нарешті переростає в хронічний стан, що характеризується спонтанними рецидивними випадками (Turski et al., 1989; Curia et al., 2008; Scorza et al., 2009). Пілокарпінову модель можна вважати корисним інструментом для дослідження фармакологічних втручань для інгібування випадків, викликаних системними тригерами запалення, такими як ЦНС-інфекції (Marchi et al., 2008). Серед інших зон мозку гіпокамп особливо вразливий до пошкодження нейронів, спричиненого пілокарпіном. Гіпокамп був центром уваги в галузі дослідження TLE, оскільки він містить багато чітко визначених нейронних зв'язків, пов'язаних з генезисом випадків (Pestana et al., 2010). Було показано, що судоми спричиняють серйозні втрати пірамідальних клітинних шарів зон CA1 та CA3 та зубчастої звивини гіпокампа (Pitkänen and Lukasiuk, 2009; Thom et al., 2009). Епілепсія характеризується кількома поведінковими супутніми розладами, такими як когнітивна дисфункція, яка є поширеною серед хворих на епілепсію. Пілокарпінові епілептичні тварини

демонструють значне погіршення пам'яті та здібностей до навчання, які проявляються у початковому латентному періоді, в якому ще не має випадків (Wu et al., 2001; Chauviere et al., 2009).

У патофізіології епілепсії беруть участь кілька нейрональних змін, включаючи нейрохімічний дисбаланс, нейродегенерацію та реорганізацію певних областей мозку, особливо тих, що стосуються лімбічних структур (Scharfman H., 2007; Alexander et al., 2016). Під час випадків надмірне продукування реактивних видів кисню та реактивних видів азоту призводить до посилення окисного стресу та запалення (Puttachary et al., 2015). Тканина мозку особливо вразлива до окислювального пошкодження через велике споживання кисню і, як наслідок, вироблення великої кількості вільних радикалів (Friedman J, 2011). Оксидативний стрес може бути як причиною, так і наслідком судом у тваринних моделях та у людей (Patel M, 2004). Під час ЕС, індукованого літій-пілокарпіном, повідомлялося про підвищене утворення реактивних видів кисню та погіршення стану окислювального стану глутатіону у гіпокампі (Liu J et al., 2010; Liu Y et al., 2012). Оксидативний стрес відіграє важливу роль в індукції апоптозу (Méndez-Armenta M et al., 2014).

Загибель апоптичних клітин, відома як одна з особливостей втрати клітин гіпокампа внаслідок індукції ЕС, тоді як інша форма пошкодження нейронів гіпокампа, спричинена ЕС, – некроз (Kondratyev and Gale, 2004; Lopez-Meraz et al., 2010; Hu et al., 2011). ЕС викликає запальну реакцію в головному мозку (McElroy et al., 2017), і, навпаки, запалення може ще більше посилити ЕС (Alyu and Dikmen, 2017; Vezzani et al., 2011).

Висновки за розділом

Клонування ASICs стимулювало дослідження цих каналів, тому стало можливим визначення молекулярних аспектів їх функції та клітинної ролі. Роль ASICs у фізіологічних та патологічних процесах широко

розглядалась із залученням генетичних моделей на мишах. Виявлені токсини сприяли важливому розумінню участі ASICs у больових відчуттях та нейродегенерації після ішемічного інсульту. Залишилося багато відкритих питань, і потрібні подальші дослідження, щоб з'ясувати роль ASICs у відчутті болю, синаптичній пластичності, вираженні страху, епілепсії тощо. Дослідження, що стосуються цих питань, нададуть більш точну інформацію про фізіологію ASICs та підтвердять їх як перспективні мішені для лікарських засобів.

Публікація кристалічних структур ASICs стимулювала дослідження їх структурно-функціональних характеристик. Продовжуючи ці дослідження, можна буде з'ясувати молекулярні механізми, за допомогою яких поза- і внутрішньоклітинні фактори контролюють активність ASICs та визначити конкретні ділянки в білках каналу, на які можуть бути націлені нові лікарські засоби.

Активність ASICs залучена у багатьох неврологічних та психічних розладах (Chu XP, Xiong ZG, 2013; Grunder S, Chen X, 2010; Wemmie et al., 2006), отже, фармакологічний вплив на них є перспективним шляхом корекції таких патологій

2 МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Усі досліді були проведені на білих лабораторних щурах лінії Wistar віком 60 діб від народження 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*. Усі експерименти та тести виконували у темну фазу. Досліді проводились 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.

2.1 Реєстрація електричної активності гіпокампа у іммобілізованих щурів

Тварин анестезували за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції уретану 1.5 г/кг. Хірургічне втручання проводили при повній відсутності рефлексів у тварини (рис. 2.1). Необхідну ділянку голови у місці майбутнього розрізу голили, дезінфікували йодом і для знеболення під неї вводили лідокаїн. Далі щура фіксували у стереотаксисі. Робили розріз скальпелем на шкірі голови від середньої точки між очей до середньої точки між вухами. Затискачами краї шкіри відводили в боки. Шкіру та окістя видаляли так, щоб помітними були на черепі точки брегма та лямбда. Електрод (діаметр 50 мкм) для записів позаклітинного польового потенціалу вставляли у пластикову канюлю (діаметр 200 мкм). Канюлю з реєструючим електродом вводили через просвердлений отвір (діаметр 0,5 мм) у черепі над гіпокампом у пірамідальний клітинний шар зони CA1 під стереотаксичним та електрофізіологічним наведенням (3.8 мм *posterior*, 2.5 мм *lateral* від брегми та 2.0 мм *below dura*). Кінець реєструючого електрода подовжували приблизно на 100 мм від кінця канюлі. Референсний та заземлюючий

електроди імпантували в мозочок. Після стабілізації сигналу (5–10 хв) проводили реєстрацію електрокортикограми. 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, Остін, Техас, США). Офлайн-аналіз електрограми гіпокампа проводили за допомогою Clampfit (Molecular Devices, San Jose, CA, США) та Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, США).

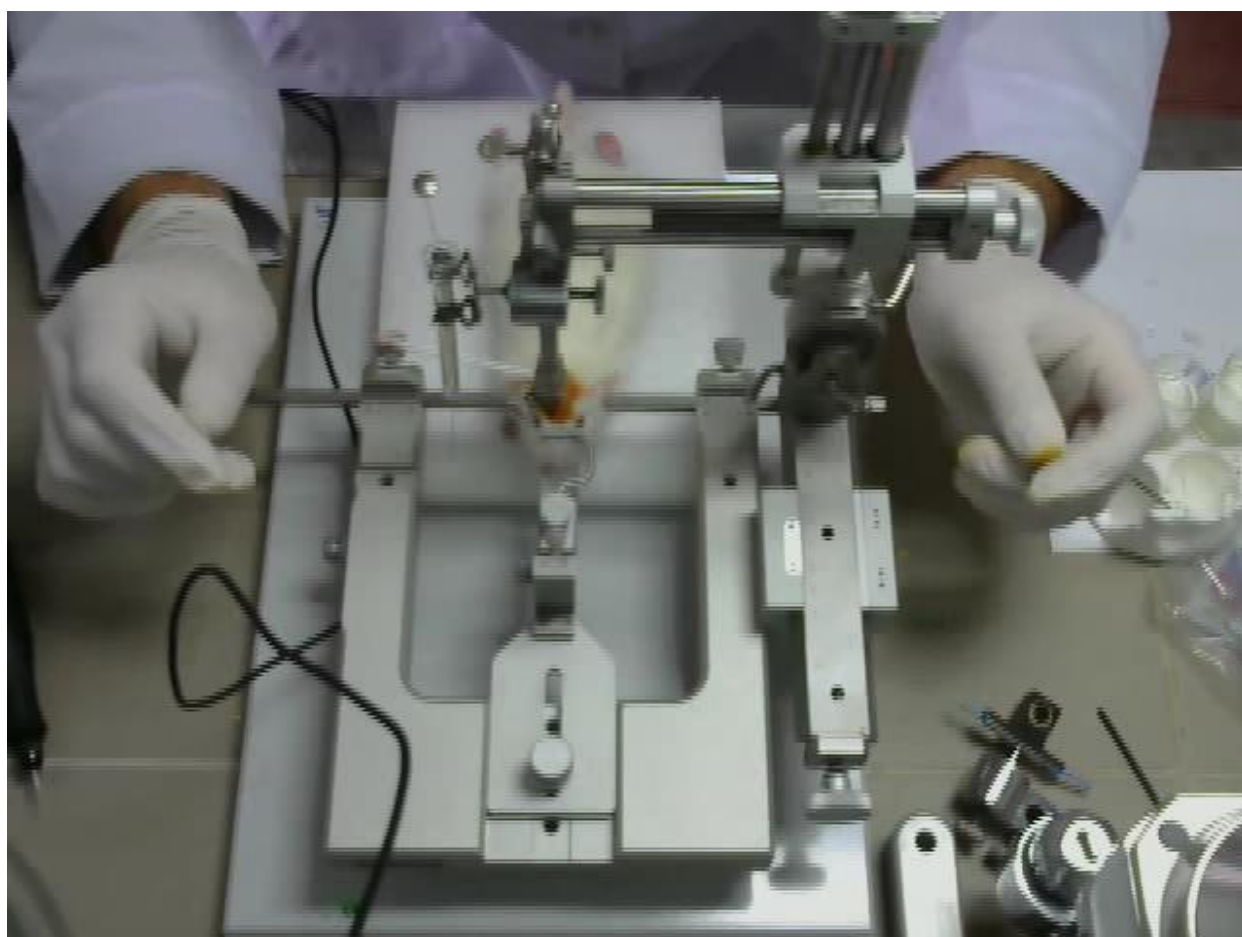


Рисунок 2.1. Операція з імплантації електроду для реєстрації електричної активності гіпокампа щура та канюлі для введення речовин.

2.2 Розробка бездротового пристрою реєстрації електричної активності гіпокампа у щурів.

Реєстрація фізіологічних параметрів експериментальних тварин у поведінкових моделях є одним з найбільш важливих підходів до вивчення внутрішнього середовища тварин (кров'яного тиску, серцебиття, температури, мозкової активності). Бездротові телеметричні системи реєстрації дають вагому перевагу над класичними, які своїми дротами обмежують тварину в її локомоторній та дослідницькій поведінці, а також можуть виступати у якості стресового фактору, який може модифікувати різні фізіологічні параметри (рис. 2.2).



Рисунок 2.2. Приклад класичної дротової системи реєстрації електроенцефалограми у щурів.

На даний час існує багато різних телеметричних систем. Найбільш відомі: Stellar Telemetry (TSE systems), Neurologger (NewBehavior AG, Zürich, Швейцарія), SCT (OSI), 4ET (DSI), IW5 (TBSI). Всі вони забезпечують потрібні характеристики для реєстрації електроенцефалограми (електрокортикограми). Однак перелічені пристрої окрім Neurologger мають радіопередавач, тому їм потрібен ще й приймач. А деякі, типу Stellar Telemetry, SCT та 4ET потрібно імплантувати під шкіру, що ускладнює операцію. Найбільш близький до розробленого нами пристрою є Neurologger – бездротовий пристрій для зняття електроенцефалограми, він має чотири реєструючі канали, фіксоване підсилення, інфрачервоний сенсор, сенсор руху, контролер та вбудовану пам'ять для зберігання отриманих даних (рис. 2.3).

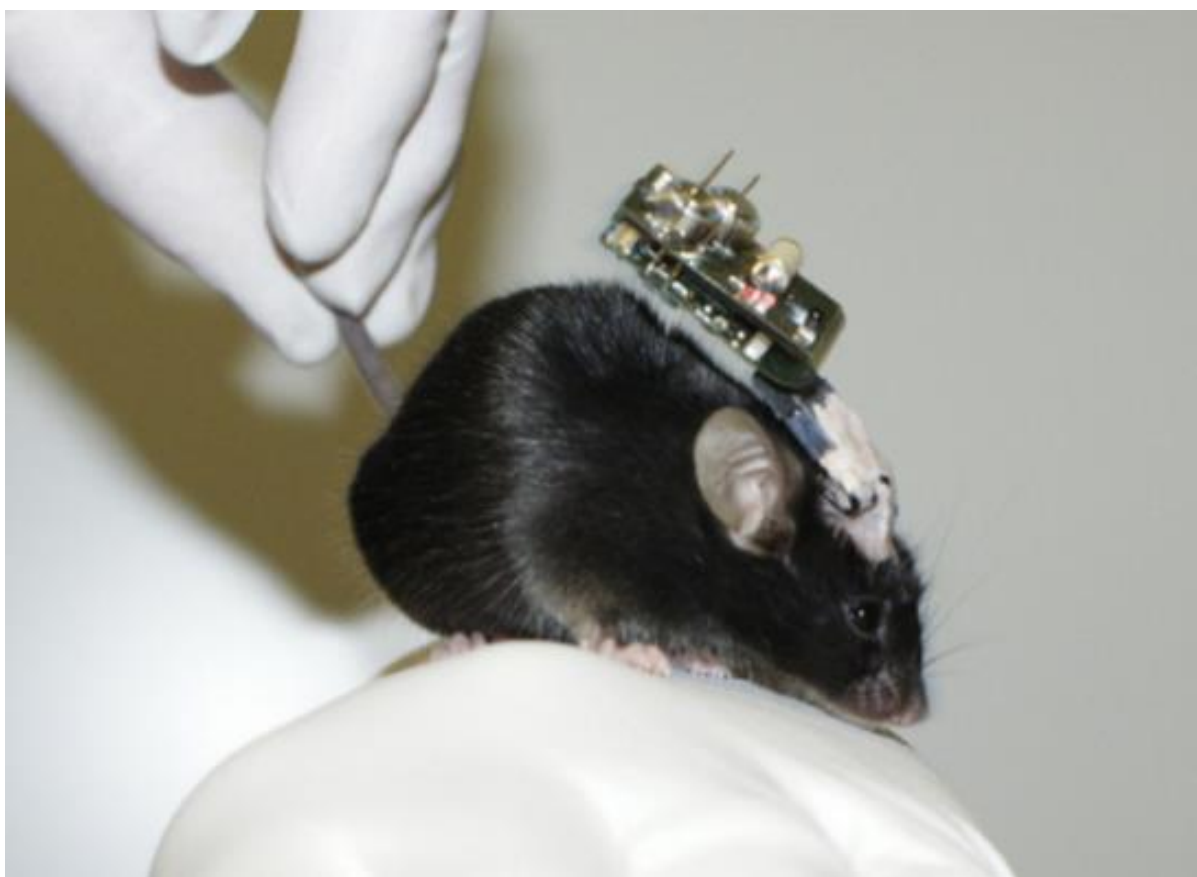


Рисунок 2.3. Neurologger – бездротовий пристрій для реєстрації електроенцефалограми.

Однак, такий прилад має певні недоліки:

- необхідність заміни елементів живлення,
- необхідність у спеціалізованому зчитувачі пам'яті,
- крихка конструкція за рахунок використання змінних елементів живлення та з'єднуючих шлейфів.

Для розробки пристрою без вищезазначених недоліків були прийняті наступні технічні рішення:

- використання підсилювачів з однополярним живленням дало змогу перейти до однополярної системи живлення та використовувати акумулятор, як елемент живлення, замість змінних елементів живлення;
- використання системи пам'яті у форматі microSD надало універсальності процесу отримання даних та їх зчитування;
- використання одноплатної конструкції, яка надає більшої жорсткості конструкції для захисту від пошкоджень твариною.

Розроблений пристрій виконаний на двосторонній платі з жорсткого текстоліту товщиною 1 мм, з однієї сторони якої розміщена система живлення та система пам'яті, а з іншої сторони чотирьохканальний блок підсилювачів з фільтрами та мікроконтролер з аналого-цифровим перетворювачем (АЦП) (рис. 2.4).

Порядок роботи пристрою наступний:

1) З системи живлення, до якої входить акумулятор та стабілізатор, вже нормалізоване живлення подається на всі вузли пристрою: стабілізатор опорної напруги, чотирьохканальний підсилюючий та фільтруючий блоки на мікроконтролер, та систему пам'яті.

2) Зі стабілізатора опорної напруги потенціал подається на референтний електрод та на референтний вхід чотирьохканального підсилюючого блоку і використовується для формування сигналу з реєструючих електродів головного мозку.

3) Кожен з чотирьох каналів підсилюючого блоку отримує сигнал на вході та збільшує його у тисячу разів, далі сигнал надходить до відповідного

каналу фільтруючого блоку, який в свою чергу виділяє сигнал лише у необхідних межах від 1 до 160 Гц.

4) Підсилені та відфільтровані сигнали надходять до відповідного входу АЦП мікроконтролера.

5) Контролер у свою чергу отримує масив перетворених цифрових даних та записує їх у пам'ять.

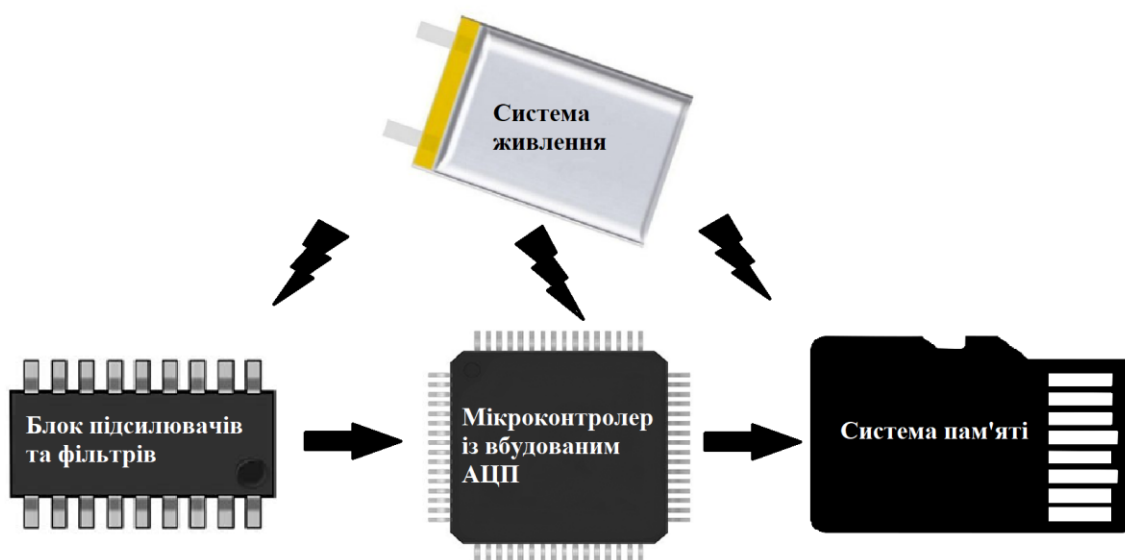


Рисунок 2.4. Схема роботи пристрою для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів.

Розроблений пристрій забезпечує наступні переваги:

1) Кожен з чотирьох каналів підсилюючого блоку забезпечує низьку напругу зсуву і близький до нуля дрейф струму у часі і зі зміною температури. Усі підсилювачі оснащені майже нульовий шум і оптимізовані для роботи з низькою однополярною напругою, що робить їх найбільш підходящими для бездротового пристрою реєстрації електроенцефалограми або електрокортикограми.

2) Використання підсилювачів з однополярним живленням дозволяє використовувати один елемент живлення, такий як акумулятор.

3) Використання флеш пам'яті формату microSD надає універсальності пристрою, це дозволяє легко підключати пам'ять, змінювати заповнену, та просто зчитувати дані.

4) Використання сучасного контролера дозволяє більш гнучкіше налагоджування пристрою.

Таким чином, в порівнянні з найближчим аналогом, розроблений бездротовий пристрій (рис. 2.5) для реєстрації електрокортикограми має удосконалену систему живлення, що дозволяє використовувати однополярне живлення засноване на акумуляторі, за рахунок чого використовуються підсилювачі з однополярним живленням, також пристрій має більш гнучку систему пам'яті та збільшену жорсткість пристрою за рахунок використання одноплатної конструкції.

Розроблений нами пристрій належить до науково-дослідних приладів реєстрації електроенцефалограми (електрокортикограми) і може бути використаний у дослідях електричної активності головного мозку щурів.



Рисунок 2.5. Бездротовий пристрій для реєстрації електричної активності гіпокампа зафіксований на голові у щура.

2.3 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, lateral 1.8, below dura 2.9* від брегми) (Рис. 2.6). Референтний електрод розташовували у мозочку. Кінці електродів виводили приблизно на 10 мм від поверхні черепа та під'єднували до масиву контактів. Фіксацію електродів та контактів проводили спеціальним полімером (протакрилом-М, «СТОМА», Харків, Україна), який у стоматології використовується для виготовлення зубних протезів. Краї розрізу шкіри голови 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. Пристрої під'єднували до контактів електродів на голові тварини перед початком експерименту, після чого автоматично розпочинали реєстрацію електричної активності у внутрішню пам'ять пристрою. Аналіз електричної активності гіпокампа здійснювався за допомогою пакета Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA). Спектральну густину потужності ЕЕГ визначали за алгоритмом Welch з 10-секундними епохами та порівнювали в діапазоні 1-50 Гц.



Рисунок 2.6. Операція по вживленню електродів під бездротовий пристрій для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів.

2.4 Каїнатна та літій-пілокарпінова модель 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 викликала епілептиформна активність.

Літій-пілокарпінову модель епілепсії робили наступним чином. Для індукції епілепсії (ІЕ) 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, 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.

2.5 Поведінкові тести

Перед тестом усі тварини проходили адаптаційний період (24 години) у тестовій кімнаті з метою зменшення стресового стану.

2.5.1 Поведінковий тест “відкрите поле”

Експериментальна установка тесту являє собою квадратне поле зі стороною 100 см та стінками висотою 30 см, умовно розділене на внутрішній та зовнішній периметри. Межа між сегментами 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 (Patel, 2014), реалізованої в середовищі Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA) для визначення сумарного переміщення та часу перебування тварин у внутрішньому та зовнішньому сегментах (рис. 2.7).



Рисунок 2.7. Вигляд експериментальної установки поведінкового тесту “відкрите поле”.

2.5.2 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 (рис. 2.8). Дослід записували на IP камеру (Intervision, Україна), після чого проводили оцінку параметрів за допомогою Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA). Оцінку поведінки проводили за наступними основними параметрами: загальна пройдена дистанція, час знаходження у відкритих та закритих рукавів.



Рисунок 2.8. Вигляд експериментальної установки поведінкового тесту “піднятий хрестоподібний лабіринт”.

2.5.3 Поведінковий тест на дослідження пам’яті, що зумовлена страхом

Тварин за день до тестування адаптували до експериментальної установки. Розроблена нами тестова система являє собою плексигласовий бокс (50 см x 40 см x 40 см) з непрозорими стінками, який розташовується у звукоізольованій кімнаті з освітленням 600 люменів (рис. 2.9). Використовуючи платформу Arduino (Arduino SRL, Італія) у тесті автоматично регулюється подача звукового сигналу та токового стимулу. Звуковий сигнал (10 кГц, 75 дБ, 20 с) подається через під’єднаний до Arduino динамік (1 Вт, 8 Ом), розташований у верхній частині боксу. Електричний стимул (0.5 мА, 0.5 с), згенерований за допомогою

регульованого джерела струму під'єданого до Arduino, подається на металеву решітку розташовану на підлозі боксу.

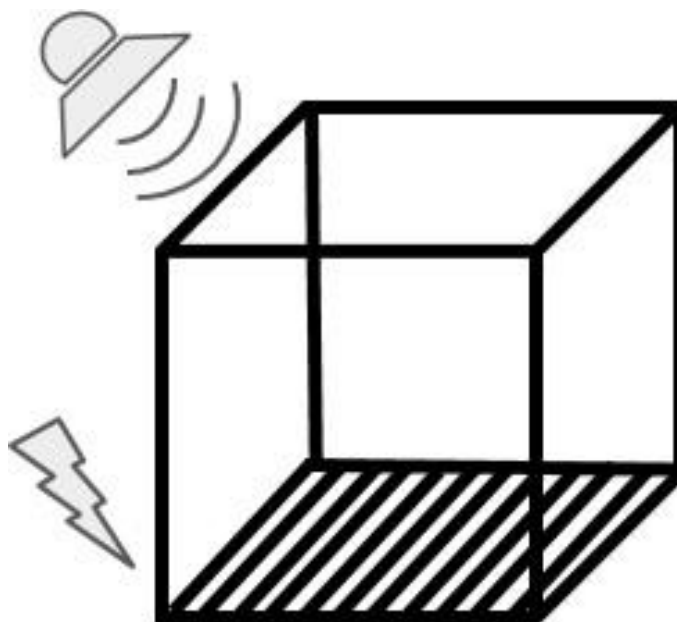


Рисунок 2.9. Схема експериментальної установки дослідження пам'яті, що зумовлена страхом.

Тестування емоційного навчання відбувалось у два послідовні дні: зумовлення та тестування пам'яті. У перший день після поміщення тварини у тестовий бокс через хвилину подавався звуковий сигнал, одразу по закінченні котрого слідував електричний розряд. Зазначена пара стимулів подавалась тричі з інтервалом 1 хв. На другий день процедура повторювалась, але без електричної стимуляції. Поведінка тварин записувалась за допомогою ІР камери (Intervision, Україна) та аналізувалась після проведення тесту. Оцінювалась тривалість завмирання за 20 с до початку та 20 с впродовж часу пред'явлення звуку. Завмирання визначалось, як відсутність активних рухів, за виключенням дихальних. Збільшення тривалості завмирання на другий день експерименту у порівнянні з першим є ознакою емоційного навчання.

Частина контрольних щурів та щурів з ІЕ за 20 хв до поведінкового тестування отримувала ін'єкцію сполуки 5b (1 мкмоль/кг); інші - еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Порівняння груп тварин здійснювали за допомогою критерію Манна-Уїтні, а порівняння тварин однієї групи впродовж двох днів - критерію Вілкоксона (програмний пакет GraphPad Prism). Рівень значущості становив 0.05.

3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 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 CA1) та реєстрували електричну активність цієї ділянки.

Каїнат або каїнова кислота являє собою агоніст AMPA 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. 3.1). Кожна послідовна ін'єкція викликала подібну активність.

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 мл розчину, який містив сполуку 5b (1 мкмоль), після 20 хв стійкої ЕА призвело до зменшення частоти епілептиформних розрядів (1.38 ± 0.4 Гц проти 5.6 ± 0.4 Гц при 5b та контрольних умовах відповідно, $p = 0.002$, $n = 7$, рис. 3.2-3.3).

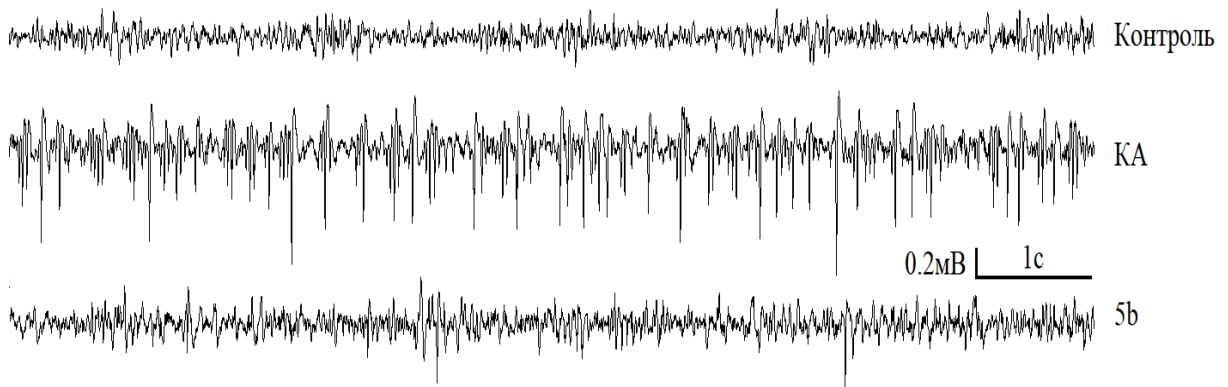


Рисунок 3.1. Епілептиформна активність у гіпокамі, індукована внутрішньогіпокампульною ін'єкцією каїнату *in vivo*.

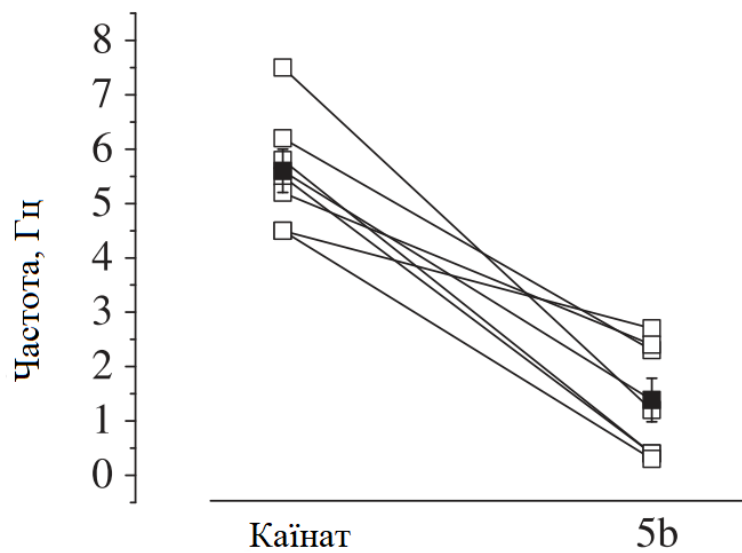


Рисунок 3.2. Сумарні дані щодо впливу сполуки 5b на частоту індукованих каїнатом нападів у гіпокамі щурів. Як можна бачити, в усіх випадках сполука 5b значно зменшувала частоту індукованих каїнатом нападів у гіпокамі щурів

Як свідчать дані, в усіх випадках ін'єкція сполуки 5b в тканини гіпокампа в значній мірі зменшувала частоту епілептиформної активності, викликаній ін'єкцією каїнату.

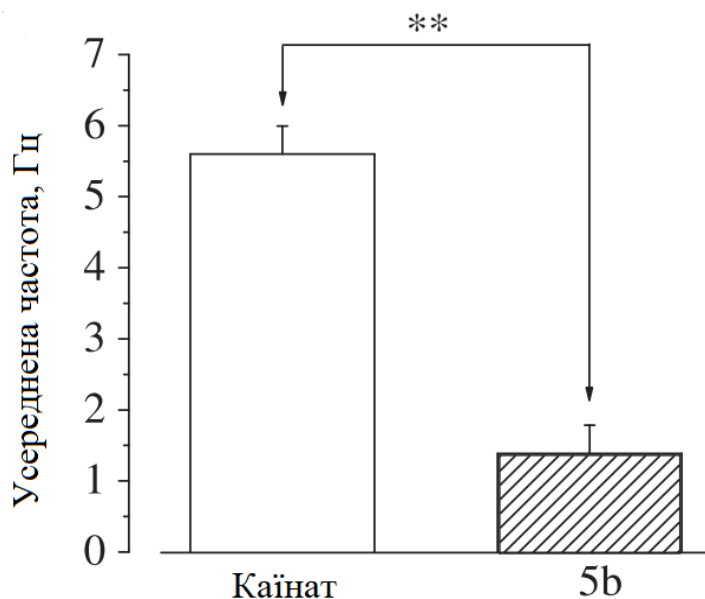


Рисунок 3.3. Вплив сполуки 5b на частоту індукованих каїнатом нападів у гіпокампі щурів. ** $p < 0.005$. Результати представлені як середнє значення + стандартна похибка середнього.

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

Тварин розділили на дві групи по 10 в кожній: контрольну та дослідну. Тварин останньої піддавали дії антагоніста ASIC1a-каналів. Пригнічення активності цих каналів досягалось за допомогою внутрішньоочеревинного введення 10 мкмоль/кг сполуки 5b. На початку експерименту всі тварини знаходилися в домашній клітці. Після приєднання до електродів бездротового пристрою реєстрації електричної активності гіпокампа тварин повертали назад у клітку. Через 20 хв після цього здійснювали внутрішньоочеревинну ін'єкцію фізіологічного розчину або

антагоніста ASIC1а каналів сполуки 5b (10 мкмоль/кг) і знову їх поміщали до домашньої клітки. Після 20 хв розпочинали проведення поведінкового тесту “відкрите поле”.

3.2.1 Зміни у локомоторній активності під дією блокатора протон-чутливих іонних каналів

Поведінковий тест “відкрите поле” дозволяє оцінити локомоторну активність тварини, рівень тривожності, дослідницьку діяльність тощо. Локомоторна активність тварин оцінюється за загально 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 квантиль, HQ – верхній квантиль розподілу.

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

Так, сумарний пройдений шлях становив 2.98 [2.63; 3.18] м у контрольних та 1.30 [1.07; 2.33] м у тварин під дією 5b ($p=0.005$; рис. 3.4, 3.5). Значущих відмін інших параметрів поведінки в тесті “відкрите поле” не виявлено.

Тривалість часу, проведеного у зовнішній частині арени, 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).

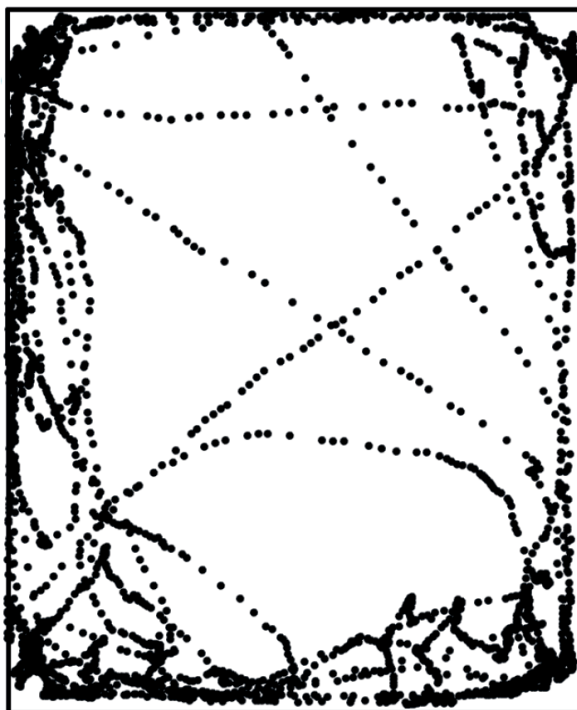


Рисунок 3.4. Репрезентативна траєкторія переміщення контрольної тварини в експериментальній установці “відкрите поле”.



Рисунок 3.5 Репрезентативна траєкторія переміщення тварини під дією сполуки 5b в експериментальній установці “відкрите поле”.

3.2.2 Зміни у електричній активності гіпокампа під дією блокатора протон-чутливих іонних каналів

Відомо, що головним молекулярним механізмом гальмування у нейронних мережах гіпокампа є активація ГАМК-рецепторів. Наші експерименти з епілептиформною активністю викликаною кайнатом показали, що пригнічення активності ASIC-каналів підвищує частоту гальмівної синаптичної передачі та зменшує частоту виникнення епілептиформних явищ. Такий результат дає змогу зробити висновок, що ASIC-канали у 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 нам 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 ми вирішили проаналізувати зміни електричної активності гіпокампа під впливом антагоніста ASIC-каналів сполуки 5b (рис. 3.6 - 3.7).

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

Так, у щурів обох груп ЕЕГ 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. 3.6) у контрольній та дослідній групі відповідно. Сумарна потужність тета-діапазону (4-10 Гц) становила у контрольній групі 1267 [756; 3644] мкВ² та у дослідній 1905 [1098; 4835] мкВ² ($p=0.79$).

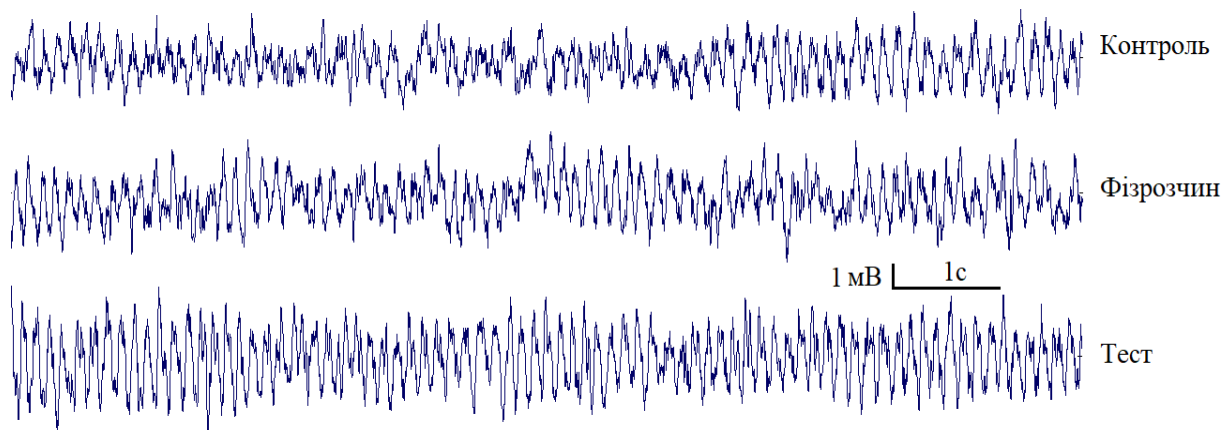


Рисунок 3.6 Електрична активність гіпокампа щура контрольної групи під час знаходження у домашній клітці (Контроль), після ін'єкції фізрозчину у домашній клітці (Фізрозчин) та під час поведінкового тесту “відкрите поле” (Тест).

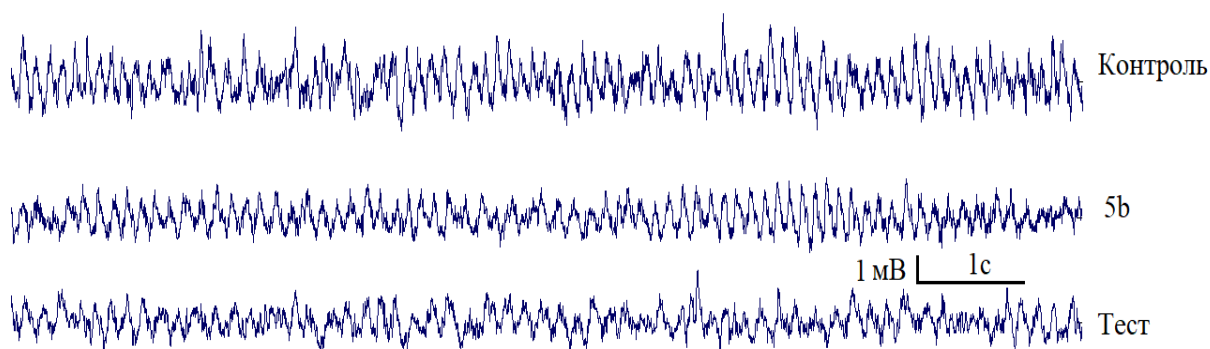


Рисунок 3.7. Електрична активність гіпокампа щура дослідної групи під час знаходження у домашній клітці (Контроль), після ін'єкції сполуки 5b у домашній клітці (5b) та під час поведінкового тесту “відкрите поле” (Тест).

Під час виконання тесту потужність тета-діапазону залишилася однаковою у тварин обох груп: 1345 [656; 5263] мкВ² у контрольних та 3004 [1094; 4553] мкВ² у тварин під дією сполуки 5b ($p=0.84$, рис. 3.8). 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. 3.9).

Зниження частоти тета-ритму, незалежно від клітинного механізму його генерації, є маркером для речовин, що мають анксиолітичну дію (McNaughton et. al., 2007), таких як опіоїди, барбітурати, бензодіазепіни та селективні блокатори зворотного захоплення серотоніну.

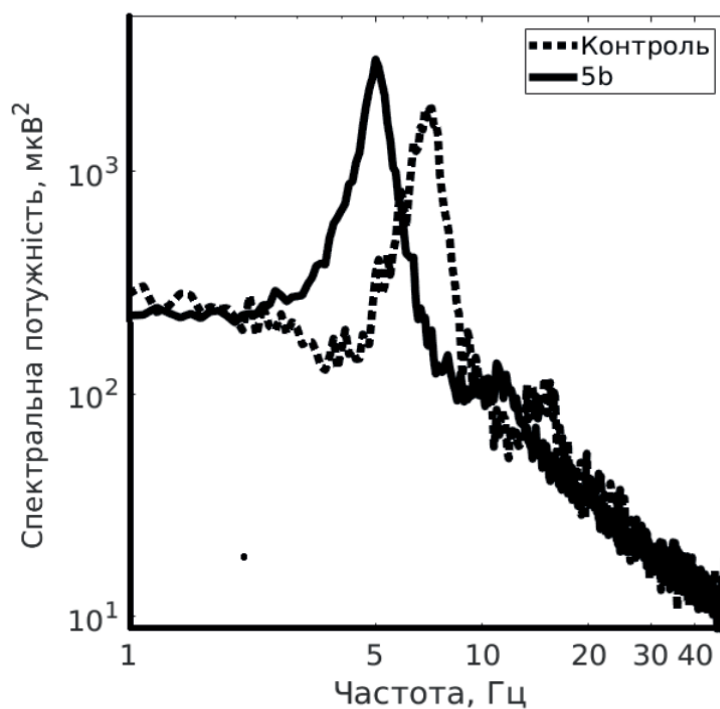


Рисунок 3.8. Усереднені спектри потужності електричної активності гіпокампа у щурів контрольної та дослідної (під дією сполуки 5b) груп під час перебування в експериментальній установці “відкрите поле”

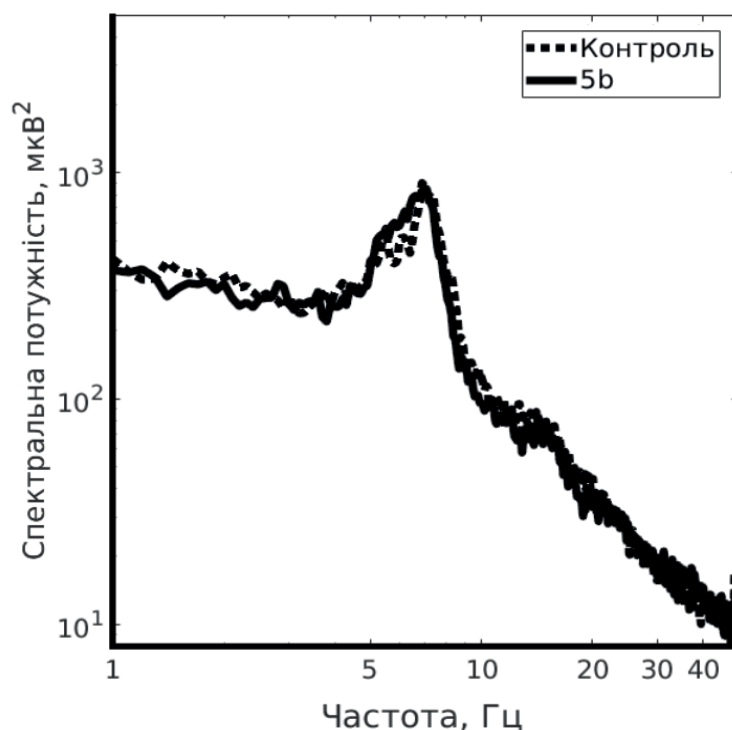


Рисунок 3.9. Усереднені спектри потужності електричної активності гіпокампа у щурів контрольної та дослідної (під дією сполуки 5b) груп під час перебування в домашній клітці на початку експерименту

3.3 Залучення протон-чутливих іонних каналів до змін поведінкових реакцій тварин з індукованою епілепсією у поведінкових моделях

Експеримент проводили 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 - 9/9/14, контроль+5b - 10/7/9, ІЕ - 10/6/10, ІЕ+5b - 8/7/10. Для порівняння незалежних вибірок використовували критерій МаннаУїтні, а для пов'язаних – критерій Вілкоксона (програмний пакет GraphPad Prism). Відмінності вважалися вірогідними при $p < 0,05$

3.3.1 Зміни у поведінці тварин з індукованою епілепсією у тесті “відкрите поле”

Аналіз поведінки тварин у тесті “відкрите поле” виявив, що поведінка тварин із індукованою епілепсією характеризувалась більшою варіабельністю обох параметрів – локомоторної активності та часу знаходження у зовнішньому периметрі (рис. 3.10 - 3.13).

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).

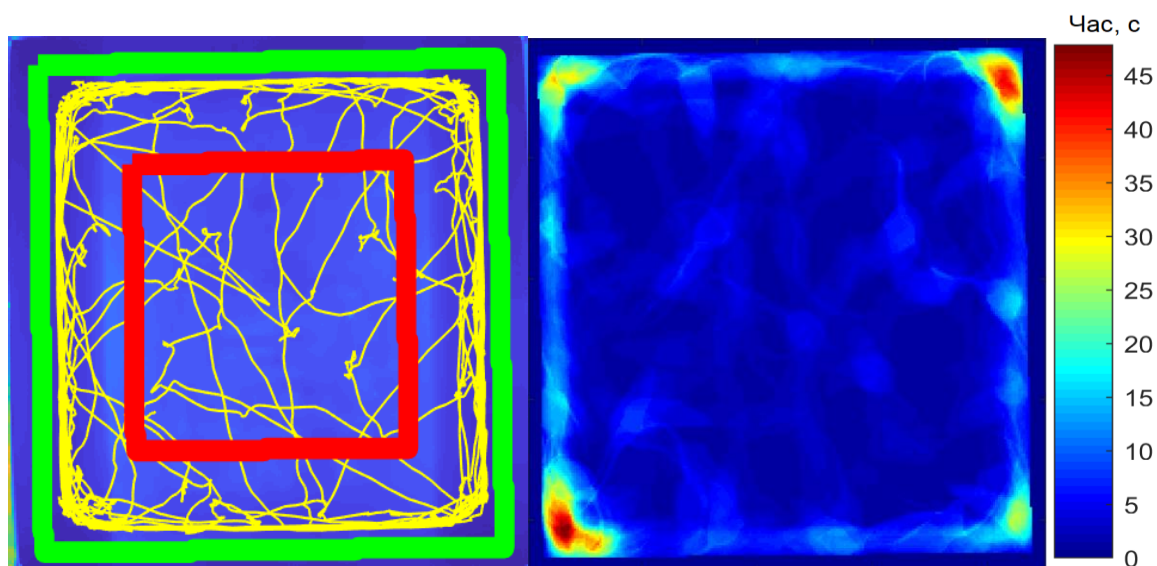


Рисунок 3.10. Репрезентативна траєкторія руху щура з індукованою епілепсією у поведінковому тесті “відкрите поле”. Щур з ІЕ демонстрував більшу локомоторну активність та менший час знаходження у зовнішньому периметрі тестової установки.

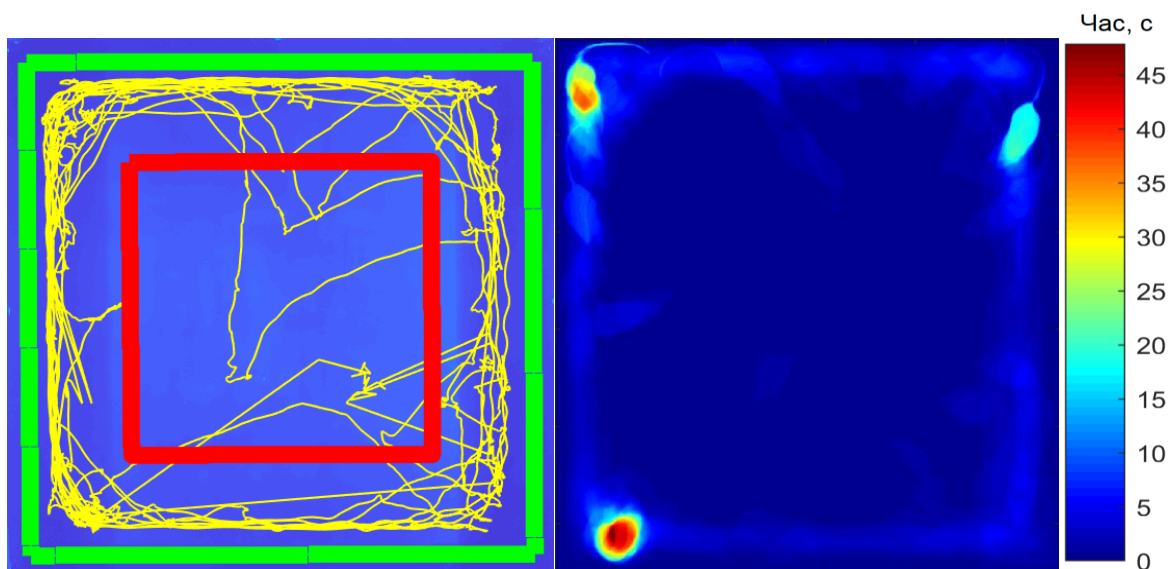


Рисунок 3.11. Репрезентативна траєкторія руху контрольного щура у поведінковому тесті “відкрите поле”.

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.

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, $P < 0.001$).

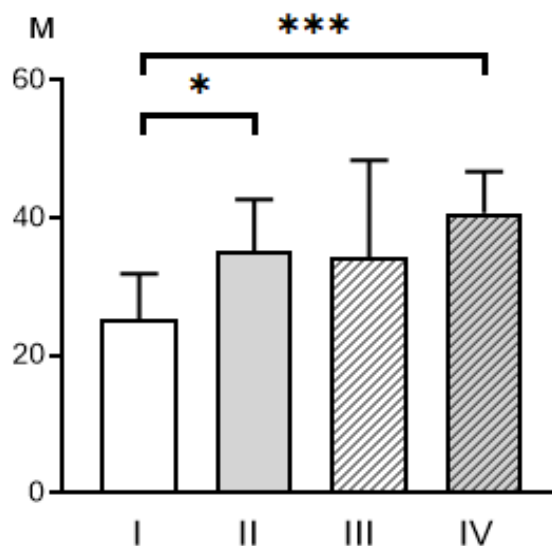


Рисунок 3.12. Загальна пройдена дистанція щурів у тесті “відкрите поле”: I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

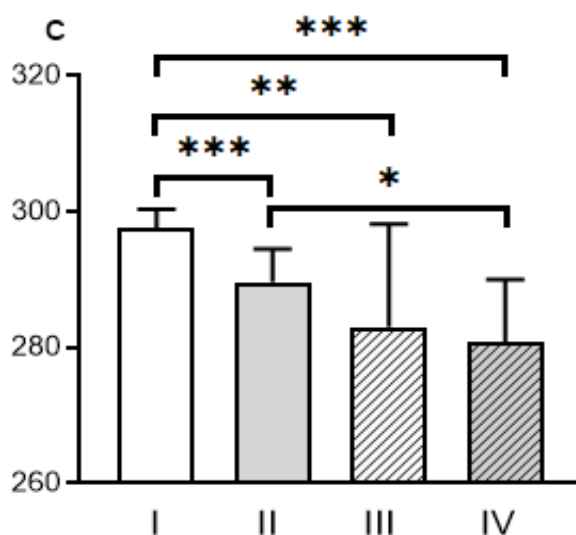


Рисунок 3.13. Час знаходження у зовнішньому периметрі щурів у тесті “відкрите поле”: I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

3.3.2 Зміни у поведінці тварин з індукованою епілепсією у тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”

Основна ідея тесту базується на природній схильності щурів уникати відкритого оточення та тенденції до уникання виходу з більш захищених частин установки (рис. 3.14). Тварини, які проводять більше часу у відкритих рукавах (рис. 3.15), демонструють менший рівень тривожності порівняно з тваринами, які віддають перевагу знаходженню у закритих рукавах. Цей тест дозволяє також оцінити локомоторну активність щурів, яка може корелюватися з даними у тесті “відкрите поле”. Оцінка поведінки проводилась за наступними основними параметрами: загальна пройдена дистанція та час знаходження у відкритих та закритих рукавах.

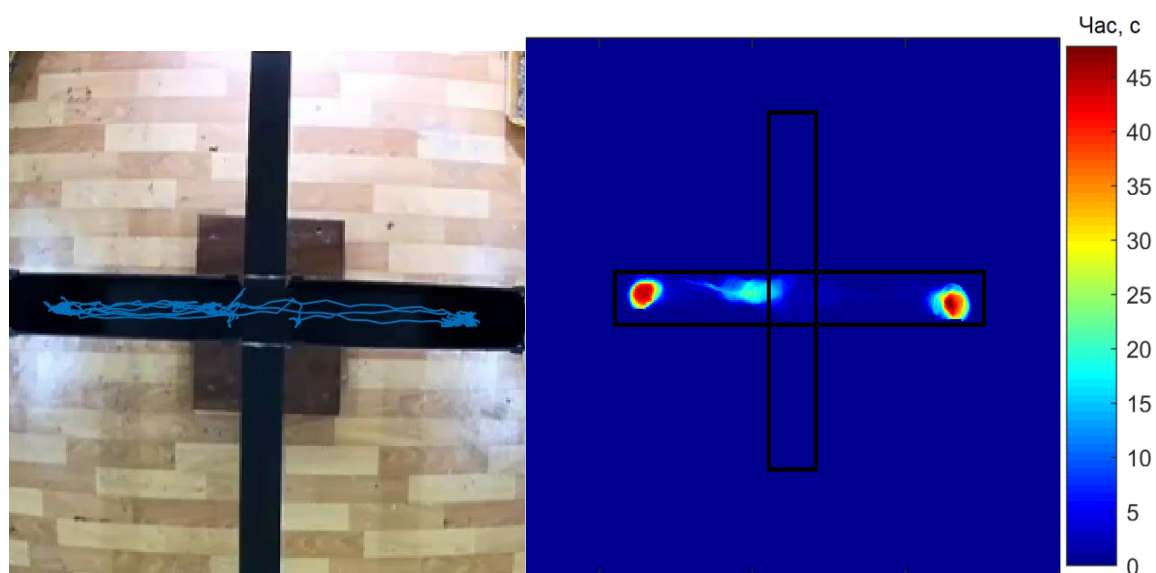


Рисунок 3.14. Репрезентативна траєкторія руху контрольного щура у поведінковому тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”.

Поведінка тварин у “піднятому хрестоподібному лабіринті” характеризувалася більшою кількістю міжгрупових відмінностей. Так, тварини з ІЕ сумарно проходили значно більшу відстань у порівнянні із

контрольними (контроль 6.1 [5.8; 6.7] м, ІЕ 16.8 [10.5; 19.6] м, $p < 0.001$, рис. 3.16).

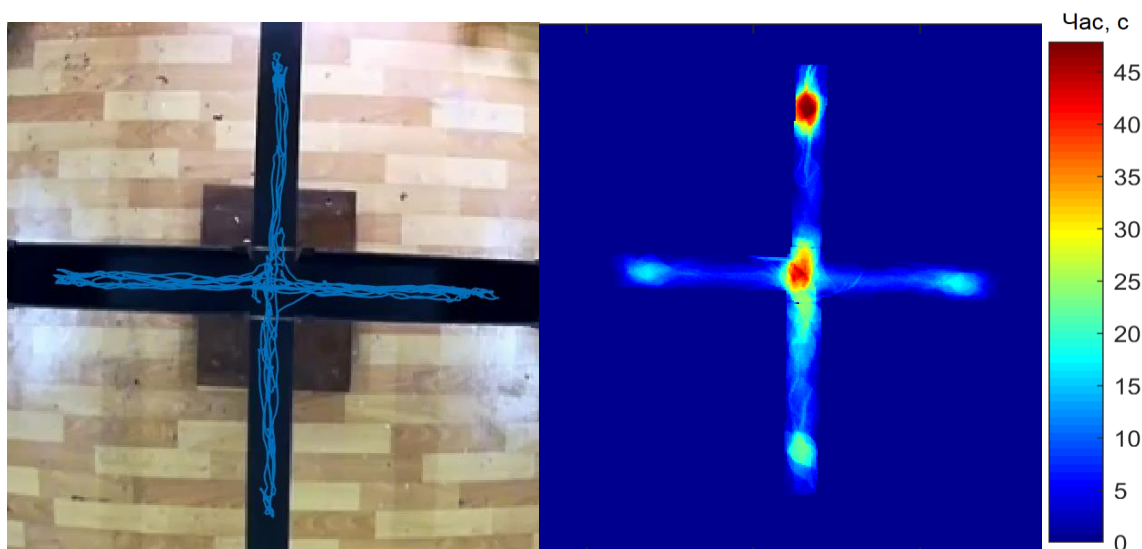


Рисунок 3.15. Репрезентативна траєкторія руху щура з індукованою епілепсією у поведінковому тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”. Щур з ІЕ демонстрував більшу локомоторну активність та менший час знаходження у закритих рукавах тестової установки.

При цьому, на відміну від контролю, вони проводили більшу частину часу у відкритих, а не закритих рукавах (контроль 9.5 [0; 26] с, ІЕ 189.5 [109.5; 225.8] с, $p < 0.001$, рис. 3.17).

Дія сполуки 5b призводила в тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт” у контрольних тварин до збільшення сумарної пройденої дистанції (контроль+5b 7.8 [7.5; 9.5] м, $p < 0.01$) та зниження часу перебування у відкритих рукавах лабіринту (контроль+5b 32 [2; 52] с, $p < 0.01$, рис. 3.17).

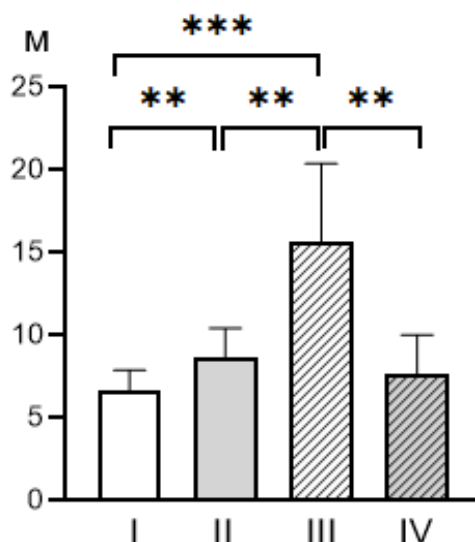


Рисунок 3.16. Сумарна пройдена дистанція щурів у поведінковому тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт”: I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

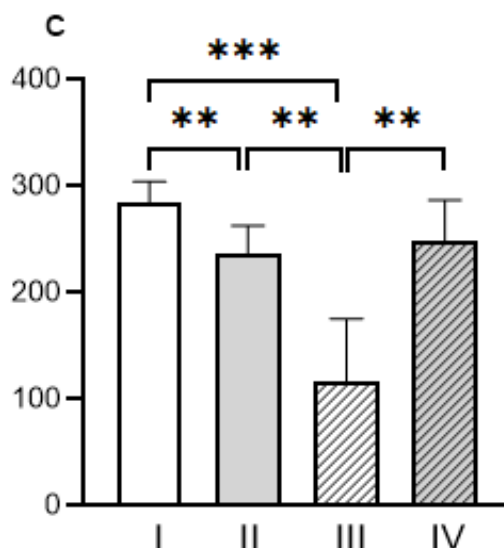


Рисунок 3.17. Час знаходження щурів у закритих рукавах у поведінковому тесті “припіднятий хрестоподібний лабіринт”: I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

Натомість, у тварин з індукованою епілепсією зміни, обумовлені дією блокатору, мали протилежний характер: зниження пройденої відстані (IE+5b 8.4 [5.6; 9.8] м, $p < 0.01$) та зменшення часу перебування у відкритих рукавах (IE+5b 59 [5; 87] с, $p < 0.01$). Як наслідок, значущої різниці обох параметрів поведінки в тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт” між групами “IE+5b” та обома “контроль+5b” і “контроль” не спостерігалось.

3.3.3 Ефект фармакологічної блокади протон-чутливих іонних каналів у формуванні пам'яті, що зумовлена страхом у щурів з індукованою епілепсією

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 контролі – 3,5 с, у контроль+5b – 8,5 с (рис. 3.18).

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 контролю і IE, а також контроль+5b та IE+5b.

Перше пред'явлення звуку на перший день експерименту без підкріплення больовим стимулом супроводжувалося розвитком помірною завмирання у перших двох групах (контроль – 0,7 с, контроль+5b – 0,7 с, рис. 3.19), час якого був дещо більшим у тварин інших груп (IE – 2,3 с, IE+5b – 1,4 с), але ця різниця не сягала рівня статистичної значущості.

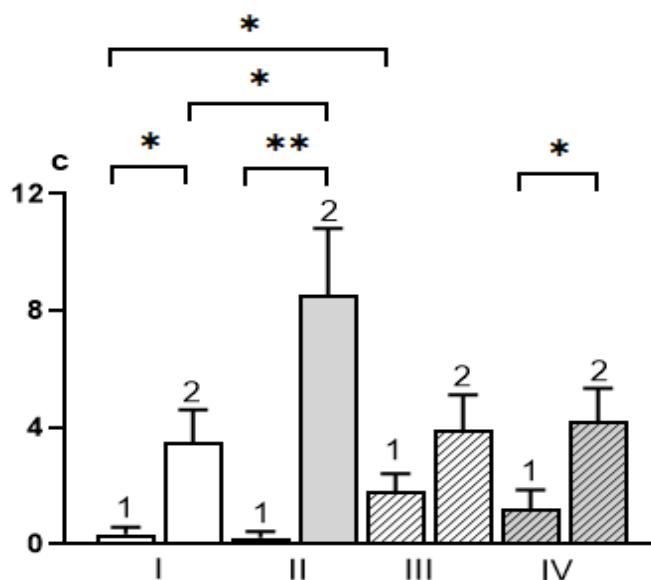


Рисунок 3.18. Час завмирання щурів в перший та на другий день експерименту до звукового стимулу: 1, 2 - дні експерименту; I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

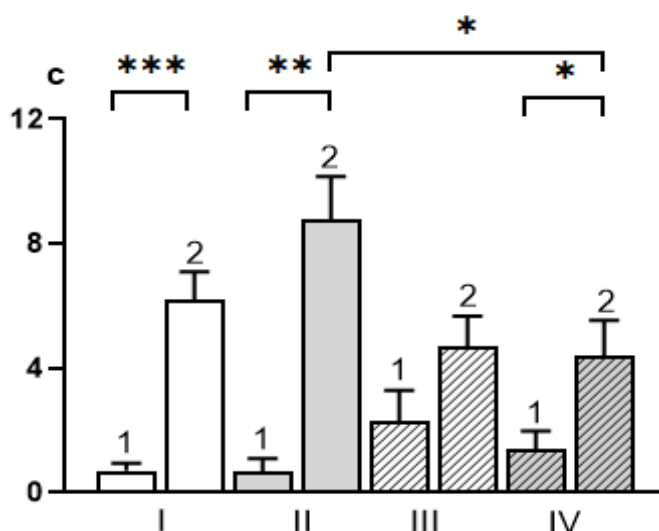


Рисунок 3.19. Час завмирання щурів в перший та на другий день експерименту під час звукового стимулу: 1, 2 - дні експерименту; I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

Порівняння часу завмирання після першого стимулу струмом показало, що у тварин з індукованою епілепсією він був меншим за контроль (контроль – 18,93 с, ІЕ – 10,9 с, рис. 3.20). Дія сполуки 5b майже не змінила цей час (контроль+5b – 18,8 с, ІЕ+5b – 9,0 с).

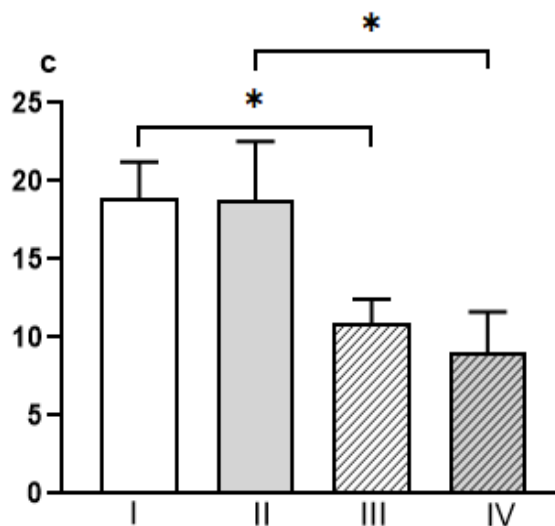


Рисунок 3.20. Час завмирання щурів викликаний реакцією на електричний стимул: I - контроль, II - контроль і блокатор, III - індукована епілепсія, IV - індукована епілепсія і блокатор; * $p < 0.05$. Результати представлені як середнє значення+стандартна похибка середнього.

4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1 Протон-чутливі іонні канали 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 pH (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. Каїнова кислота – аналог збуджуючого нейротрансмітера – глутамата. Первинний інтерес до каїнату випливає з його здатності виробляти відносно селективні ураження соми нейронів у мозку, зберігаючи при цьому аксони. Каїнат має особливо виражений токсичний вплив на гіпокамп, навіть при системному введенні або на ділянках мозку, віддалених від гіпокампу. У дозах, менших, ніж необхідні для отримання клітинної травми він може викликати судоми в гіпокампі. Тварини, які отримували каїнат у дозах 4 мг/кг внутрішньовенно або 0.8-2.0 мкг внутрішньогіпокампаально, демонстрували періодичну зупинку активності, жувальні рухи, складну рухову активність, а іноді і напружену до генералізованої тонічно-клонічної активності. Каїнат є прототипом ексцитотоксичної сполуки. Тим не менш, при порогових судомних дозах в

ділянці CA1 гіпокампального зрізу судомний ефект є результатом дезінгібування, ймовірно, відображаючи функціональну недостатність інгібуючих міжнейронних клітин до основних нейронів. Каїнат виробляє гострий або підгострий тип припадків, тривалістю від годин до днів (Fisher, 1989).

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.

4.2 Частота гіпокампального тета-ритму щурів знижується під дією блокатора протон-чутливих іонних каналів

Наукові дослідження з лікування емоційних розладів значно збільшились за останні кілька десятиліть (Farach et al., 2012), хоча найбільш вивчені анксиолітичні препарати, випробувані в експериментальних та клінічних випробуваннях все ще схильні викликати порушення толерантності та специфічні побічні ефекти під час лікування (Nutt, 2005; Pollack et al., 2008). Тому все ще необхідні дослідження нових підходів та різних клітинних механізмів, що беруть участь у реакціях тривожності.

Кілька робіт продемонстрували роль холінергічної системи в регуляції лімбічних структур, а також поведінкових реакцій, що беруть участь у цих емоційних станах (Degroot and Treit, 2003; Duarte et al., 2010; 2013 ; Graef et al., 2011).

Було зроблене припущення, що гіпокамп залучений до регулювання тривожності за допомогою активації холінергічних аферентних факторів, які діють на лімбічну систему (Gray and McNaughton, 1983). В основному, зміни активності тета-ритму можуть лежати в основі нормальних явищ і патологічних процесів, пов'язаних із тривогою, оскільки ураження цієї системи або введення анксиолітичних препаратів може інгібувати тета-ритм гіпокампа щурів (McNaughton and Gray, 2000).

Відомо, що ASIC-канали у гіпокампі виконують збуджувальну функцію на системному рівні (Zha, 2006; Zha, 2013). Механізмом цього може бути пресинаптичне гальмування шляхом ASIC-обумовленої деполяризації синаптичної терміналі у відповідності до моделі пресинаптичного гальмування (Hoeller et al., 2013). У експерименті з епілептиформною активністю спричиненою каїнатом було показано, що пригнічення ASIC1a-каналів підвищує частоту гальмівної синаптичної передачі та зменшує частоту виникнення епілептиформних явищ, що обумовлено модуляцією ГАМК-рецепторів. ГАМК-провідність також відіграє істотну роль у генерації тета-ритму, який відображає дослідницьку активність щурів (Hoeller et al., 2013). Зокрема, відомо, що частота тета-ритму позитивно корелює зі швидкістю локомоції (Shin та Talnov, 2001). Ми показали, що сполука 5b суттєво не порушує функціонування фізіологічних механізмів генерації тета-активності гіпокампу, проте призводить до значних змін її домінуючої частоти, що може бути наслідком збільшення мережевої гальмівної активності. Такий ефект може мати наслідок і щодо надмірної збудливості нервової тканини, яка є підґрунтям розвитку епілептичних нападів. З'ясування глибинних механізмів ефектів активації чи блокування ASIC1a-каналів головного мозку все ще потребує

подальшого вивчення. У нашому експерименті сполука 5b суттєво не порушувала функціонування фізіологічних механізмів генерації тета-активності гіпокампа, проте призводила до значних змін домінуючої частоти. Це, 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. 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.

4.3 Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів нормалізує поведінку щурів з індукованою епілепсією у тестах відкрите поле та піднятий хрестоподібний лабіринт.

Епілепсія - це складне неврологічне захворювання з різноманітними проявами, етіологіями та патогенезом (Jingjing Fan et al., 2020). Скронева епілепсія є найпоширенішим видом епілепсії, яка характеризується повторюваними спонтанними судомними нападами, які пов'язані зі значною втратою нейронів та морфологічними змінами, що зачіпають головним чином мезіальні скроневі структури, такі як утворення мигдалини та гіпокампа (French et al., 1993; Bernasconi et al., 2003). У індукції епілепсії епілептичний статус є одним з найважчих станів, який спричинений гіперсинхронною активацією нейронів. Якщо його не лікувати, це може

призвести до серйозних пошкоджень мозку або смерті (Hellier and Dudek, 1999; Leitinger et al., 2019).

Для нашого дослідження обрано літій-пілокарпінову модель індукованої епілепсії. У літій-пілокарпіновій моделі пілокарпін, інтраперітоніальна ін'єкція якого застосовується після попередньої ін'єкції літію, щоб викликати постійні судоми, є холінергічним мускариновим агоністом прямої дії. Розвиток епілепсії відбувається протягом від декількох днів до тижнів після індукції (Lévesque et al., 2016). Модель епілепсії, індукована пілокарпіном, може відтворити основні клінічні та патофізіологічні характеристики скроневої епілепсії людини, тобто склероз гіпокампа, проростання мохоподібних волокон, дисперсію клітин у зубчастій звивині та гліоз (Leite et al., 1990; Curia et al., 2008). Крім того, ця модель може відтворити серйозне ураження нейронів у мезіальних структурах мозку (Kandratavicius et al., 2014).

Наявні в публікаціях дані щодо впливу епілептичних нападів на рівень тривожності тварин неоднозначні та свідчать як про збільшення, так і про зменшення даного параметру залежно від експериментальної моделі епілепсії, вираженості нападів, видової належності та віку тварин (Bogovuk et al., 2017). В цілому поведінка щурів з індукованою літій-пілокарпіном епілепсією на відміну від контрольних щурів характеризувалась збільшенням пройденої відстані та зростанням часу, проведеного у центрі відкритого поля або ж у відкритих рукавах піднятого хрестоподібного лабіринту.

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 відкритого поля, так і у відкритих рукавах піднятого хрестоподібного лабіринту (Lin та Shing-Hong, 2015). Натомість, фармакологічна блокада даних каналів не впливає на поведінку мишей у Zero-maze (аналогу піднятого хрестоподібного лабіринту) за системного

введення сполук (Dwyer et al., 2009), та збільшує ознаки тривожності при мікроін'єкції в базолатеральну мигдалину (Pidoplichko, 2014). Отримані результати свідчать на користь анксиолітичності дії сполуки 5b в дозі 1 мкмоль/кг. Цікаво, що більша доза даного блокатору викликає протилежний патерн змін, пригнічуючи рівень локомоторної активності тварин, проте істотно не впливаючи на їх розташування стосовно стінок установки. Така різниця може бути пояснена 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 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 піднятого хрестоподібного лабіринту. Так, блокування ASIC-каналів за допомогою сполуки 5b спричинило ефекти, протилежні до таких у контрольних тварин: зменшення загальної пройденої дистанції та часу, проведеного у відкритих рукавах. Внаслідок цього тварини групи ІЕ+5b статистично не відрізняються параметрами поведінки від контрольних. Іншими словами, блокування ASIC1a-каналів певним чином нормалізує поведінку, порушену внаслідок епілептичного статусу .

4.4 Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів має значний ефект у формуванні пам'яті, що обумовлена 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. У нашому дослідженні на емоційне навчання щури з індукованою епілепсією демонстрували значно менший час реакції на токовий стимул ніж щури інших груп. Це говорить про те, 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. У нашому експерименті жодної міжгрупової різниці щодо неї не виявлено.

Блокування досліджуваних каналів нівелювало різницю між значеннями у тварин з індукованою епілепсією та контрольними - вона лишалася помітною, але не набувала достовірності. Отже, дія блокатора 5b дещо нормалізує характер реагування на больовий стимул у тварин з індукованою епілепсією.

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; Bogovuk 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 оцінено 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 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Alexander A, Maroso M, Soltesz I. 2016. Organization and control of epileptic circuits in temporal lobe epilepsy. In: Progress in Brain Research. Vol 226. ; 2016:127-154. doi:10.1016/bs.pbr.2016.04.007
2. Ali, Alaa E.; Mahdy, Heba M.; Elsherbiny, Doaa M.; Azab, Samar S. 2018. Rifampicin ameliorates lithium-pilocarpine-induced seizures, consequent hippocampal damage and memory deficit in rats: Impact on oxidative, inflammatory and apoptotic machineries. In Biochemical pharmacology 156, pp. 431–443. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.09.004.
3. Allen NJ, Attwell D. 2002 Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals. J. Physiol. 543, 521–529. (doi:10.1113/jphysiol.2002.020297)
4. Alyu F, Dikmen M. 2017. Inflammatory aspects of epileptogenesis: Contribution of molecular inflammatory mechanisms. Acta Neuropsychiatr. 29(1):1-16. doi:10.1017/neu.2016.47
5. Askwith CC, Cheng C, Ikuma M, Benson C, Price MP, and Welsh MJ. 2000. Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. Neuron 26:133–141.
6. Alijevic O and Kellenberger S. 2012. Subtype-specific modulation of acid-sensing ion channel (ASIC) function by 2-guanidine-4-methylquinazoline. J Biol Chem 287: 36059–36070.
7. Adams CM, Snyder PM, and Welsh MJ. 1999. Paradoxical stimulation of a DEG/ENaC channel by amiloride. J Biol Chem 274:15500–15504.
8. Bacongus, Isabelle; Bohlen, Christopher J.; Goehring, April; Julius, David; Gouaux, Eric. 2014. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel. In Cell 156 (4), pp. 717–729. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.011.
9. Bacongus I and Gouaux E. 2012. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes. Nature 489:400–405.

10. Baron A, Deval E, Salinas M, Lingueglia E, Voilley N, and Lazdunski M. 2002. Protein kinase C stimulates the acid-sensing ion channel ASIC2a via the PDZ domain-containing protein PICK1. *J Biol Chem* 277:50463–50468.
11. Baron A, Diochot S, Salinas M, Deval E, Noël J, and Lingueglia E. 2013. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels. *Toxicon* 75:187–204.
12. Baron A, Schaefer L, Lingueglia E, Champigny G, and Lazdunski M. 2001. Zn²⁺ and H⁺ are coactivators of acid-sensing ion channels. *J Biol Chem* 276:35361–35367.
13. Baron A, Voilley N, Lazdunski M, and Lingueglia E. 2008. Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. *J Neurosci* 28:1498–1508.
14. Blanchard MG, Rash LD, and Kellenberger S. 2012. Inhibition of voltage-gated Na(+) currents in sensory neurons by the sea anemone toxin APETx2. *Br J Pharmacol* 165:2167–2177.
15. Bogovyk, Ruslan; Lunko, Oleksii; Fedoriuk, Mihail; Isaev, Dmytro; Krishtal, Oleg; Holmes, Gregory L.; Isaeva, Elena. 2017. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. In *Epilepsy & behavior : E&B* 67, pp. 66–69. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.11.003.
16. Boiko, Nina; Kucher, Volodymyr; Eaton, Benjamin A.; Stockand, James D. 2013. Inhibition of neuronal degenerin/epithelial Na⁺ channels by the multiple sclerosis drug 4-aminopyridine. In *The Journal of biological chemistry* 288 (13), pp. 9418–9427. DOI: 10.1074/jbc.M112.449413.
17. Boiko N, Kucher V, Wang B, and Stockand JD. 2014. Restrictive expression of acidsensing ion channel 5 (asic5) in unipolar brush cells of the vestibulocerebellum. *PLoS ONE* 9:e91326.
18. Bonifacio, Gaetano; Lelli, Cláudia Igutti Suenaga; Kellenberger, Stephan. 2014. Protonation controls ASIC1a activity via coordinated movements in

- multiple domains. In *The Journal of general physiology* 143 (1), pp. 105–118. DOI: 10.1085/jgp.201311053.
19. Buta, Andriy; Maximyuk, Oleksandr; Kovalskyy, Dmytro; Sukach, Volodymyr; Vovk, Mykhailo; Ievglevskiy, Oleksandr et al. 2015. Novel Potent Orthosteric Antagonist of ASIC1a Prevents NMDAR-Dependent LTP Induction. In *Journal of medicinal chemistry* 58 (11), pp. 4449–4461. DOI: 10.1021/jm5017329.
 20. Cadiou H, Studer M, Jones NG, Smith ES, Ballard A, McMahon SB, and McNaughton PA. 2007. Modulation of acid-sensing ion channel activity by nitric oxide. *J Neurosci* 27:13251–13260.
 21. Chauviere L, Rafrafi N, Thinus-Blanc C, Bartolomei F, Esclapez M, Bernard C. 2009. Early Deficits in Spatial Memory and Theta Rhythm in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci*. 29(17):5402-5410. doi:10.1523/JNEUROSCI.4699-08.2009
 22. Chen, Xuanmao; Kalbacher, Hubert; Gründer, Stefan. 2005. The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. In *The Journal of general physiology* 126 (1), pp. 71–79. DOI: 10.1085/jgp.200509303.
 23. Chen, Xuanmao; Kalbacher, Hubert; Gründer, Stefan. 2006. Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. In *The Journal of general physiology* 127 (3), pp. 267–276. DOI: 10.1085/jgp.200509409.
 24. Chen X, Qiu L, Li M, Dürrnagel S, Orser BA, Xiong ZG, and MacDonald JF. 2010. Diarylamidines: high potency inhibitors of acid-sensing ion channels. *Neuropharmacology* 58:1045–1053.
 25. Cho, Jun-Hyeong; Askwith, Candice C. 2007. Potentiation of acid-sensing ion channels by sulfhydryl compounds. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C2161–C2174.

26. Chu, Xiang-Ping; Xiong, Zhi-Gang. 2013. Acid-sensing ion channels in pathological conditions. In *Advances in experimental medicine and biology* 961, pp. 419–431. DOI: 10.1007/978-1-4614-4756-6_36.
27. Chu XP, Close N, Saugstad JA, and Xiong ZG. 2006. ASIC1a-specific modulation of acid-sensing ion channels in mouse cortical neurons by redox reagents. *JNeurosci* 26: 5329–5339.
28. Chu XP, Papasian CJ, Wang JQ, and Xiong ZG. 2011. Modulation of acid-sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3:288–309.
29. Chu XP, Wemmie JA, Wang WZ, Zhu XM, Saugstad JA, Price MP, Simon RP, and Xiong ZG. 2004. Subunit-dependent high-affinity zinc inhibition of acid-sensing ion channels. *J Neurosci* 24:8678–8689
30. Coric T, Zhang P, Todorovic N, and Canessa CM. 2003. The extracellular domain determines the kinetics of desensitization in acid-sensitive ion channel 1. *J Biol Chem* 278:45240–45247.
31. Coryell MW, Wunsch AM, Haenfler JM, Allen JE, Schnizler M, Ziemann AE, Cook MN, Dunning JP, Price MP, and Rainier JD, et al. 2009. Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala, a novel therapeutic target in depression-related behavior. *Journal of the Society for Neuroscience* 29 (17), pp. 5381–5388. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0360-09.2009.
32. Coryell MW, Ziemann AE, Westmoreland PJ, Haenfler JM, Kurjakovic Z, Zha XM, Price M, Schnizler MK, and Wemmie JA. 2007. Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit. *Biol Psychiatry* 62: 1140–1148
33. Coscoy S, de Weille JR, Lingueglia E, and Lazdunski M. 1999. The pretransmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. *J Biol Chem* 274:10129–10132.
34. Curia, Giulia; Longo, Daniela; Biagini, Giuseppe; Jones, Roland S. G.; Avoli, Massimo. 2008. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. In

- Journal of neuroscience methods 172 (2), pp. 143–157. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
35. Cushman KA, Marsh-Haffner J, Adelman JP, and McCleskey EW. 2007. A conformation change in the extracellular domain that accompanies desensitization of acid-sensing ion channel (ASIC) 3. *J Gen Physiol* 129:345–350.
 36. Dawson, Roger J. P.; Benz, Jörg; Stohler, Peter; Tetaz, Tim; Joseph, Catherine; Huber, Sylwia et al. 2012. Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1. In *Nature communications* 3, p. 936. DOI: 10.1038/ncomms1917.
 37. Delaunay A, Gasull X, Salinas M, Noël J, Friend V, Lingueglia E, and Deval E. 2012. Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the extracellular pH in both acidic and alkaline directions. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:13124–13129.
 38. Deval E, Noël J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, and Lingueglia E. 2008. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 27:3047–3055.
 39. Deval E, Salinas M, Baron A, Lingueglia E, and Lazdunski M. 2004. ASIC2bdependent regulation of ASIC3, an essential acid-sensing ion channel subunit in sensory neurons via the partner protein PICK-1. *J Biol Chem* 279:19531–19539.
 40. Diochot S, Baron A, Rash LD, Deval E, Escoubas P, Scarzello S, Salinas M, and Lazdunski M. 2004. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J* 23:1516–1525.
 41. Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay AS, Debayle D, Friend V, Alloui A, and Lazdunski M, et al. 2012. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490:552–555.

42. Djeridane Y, Lemmer B, Touitou Y. 2005. Diazepam affects both level and amplitude of rat locomotor activity rhythm but has no effect on core body temperature. *Chronobiol Int.* 22(6):975-85.
43. Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, Bolshakov KV, and Magazanik LG. 2008. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J Neurochem* 106:429–441.
44. Dos Santos, Jair Guilherme; Longo, Beatriz Monteiro; Blanco, Mirian Marcela; Menezes de Oliveira, Maria Gabriela; Mello, Luíz Eugênio. 2005. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. In *Brain Research* 1066 (1-2), pp. 37–48. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.09.037.
45. Drew LJ, Rohrer DK, Price MP, Blaver KE, Cockayne DA, Cesare P, and Wood JN. 2004. Acid-sensing ion channels ASIC2 and ASIC3 do not contribute to mechanically activated currents in mammalian sensory neurones. *J Physiol* 556:691–710.
46. Du J, Reznikov LR, Price MP, Zha XM, Lu Y, Moninger TO, Wemmie JA, and Welsh MJ. 2014. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (24), pp. 8961–8966. DOI: 10.1073/pnas.1407018111.
47. Duan B, Wang YZ, Yang T, Chu XP, Yu Y, Huang Y, Cao H, Hansen J, Simon RP, and Zhu MX, et al. 2011. Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis. *J Neurosci* 31:2101–2112.
48. Duan B, Wu LJ, Yu YQ, Ding Y, Jing L, Xu L, Chen J, and Xu TL. 2007. Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci* 27:11139–11148.
49. Dubé GR, Lehto SG, Breese NM, Baker SJ, Wang X, Matulenko MA, Honoré P, Stewart AO, Moreland RB, and Brioni JD. 2005.

- Electrophysiological and *in vivo* characterization of A-317567, a novel blocker of acid sensing ion channels. *Pain* 117:88–96.
50. Dudek FE, Hellier JL, Williams PA, Ferraro DJ, Staley KJ. 2002. The course of cellular alterations associated with the development of spontaneous seizures after status epilepticus. *Prog. Brain Res.* 135, 53–65. doi:10.1016/S0079-6123(02)35007-6
51. Dwyer, Jason M.; Rizzo, Stacey J. Sukoff; Neal, Sarah J.; Lin, Qian; Jow, Flora; Arias, Robert L. et al. 2009. Acid sensing ion channel (ASIC) inhibitors exhibit anxiolytic-like activity in preclinical pharmacological models. In *Psychopharmacology* 203 (1), pp. 41–52. DOI: 10.1007/s00213-008-1373-7.
52. Eastwood, Amy L.; Goodman, Miriam B. 2012. Insight into DEG/ENaC channel gating from genetics and structure. In *Physiology (Bethesda, Md.)* 27 (5), pp. 282–290. DOI: 10.1152/physiol.00006.2012.
53. Escoubas, Pierre; Bernard, Cédric; Lambeau, Gérard; Lazdunski, Michel; Darbon, Hervé. 2003. Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels. In *Protein science : a publication of the Protein Society* 12 (7), pp. 1332–1343. DOI: 10.1110/ps.0307003.
54. Escoubas P, De Weille JR, Lecoq A, Diochot S, Waldmann R, Champigny G, Moinier D, Ménez A, and Lazdunski M. 2000. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem* 275:25116–25121.
55. Friedman J. 2011. Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? In: *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology*. 19-27. doi:10.1007/978-1-60327-514-9
56. Friese MA, Craner MJ, Etzensperger R, Vergo S, Wemmie JA, Welsh MJ, Vincent A, and Fugger L. 2007. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med* 13: 1483–1489.

57. Hingray C, McGonigal A, Kotwas I. 2019. The Relationship Between Epilepsy and Anxiety Disorders. *Curr Psychiatry Rep.* Apr 29;21(6):40.
58. Hoeller, Alexandre Ademar; Duzzioni, Marcelo; Duarte, Filipe Silveira; Leme, Leandro Rinaldi; Costa, Ana Paula Ramos; Santos, Evelyn Cristina da Silva et al. 2013. GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. In *Brain Research* 1532, pp. 21–31. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.07.045.
59. Hu K, Li S-Y, Xiao B, Bi F, Lu X-Q, Wu X-M. 2011. Protective effects of quercetin against status epilepticus induced hippocampal neuronal injury in rats: involvement of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Acta Neurol Belg.*111(3):205-212
60. Ievglevskiy, O. 2016. Acid-sensing ion channels regulate spontaneous inhibitory activity in the hippocampus: possible implications for epilepsy. In *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 371 (1700). DOI: 10.1098/rstb.2015.0431.
61. Jasti, Jayasankar; Furukawa, Hiroyasu; Gonzales, Eric B.; Gouaux, Eric. 2007. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. In *Nature* 449 (7160), pp. 316–323. DOI: 10.1038/nature06163.
62. Jonghan Shin. 2001. A single trial analysis of hippocampal theta frequency during nonsteady wheel running in rats. In *Brain Research* 897, pp. 217–221. DOI: 10.1016/S0006-8993(01)02015-7.
63. Kellenberger, Stephan; Schild, Laurent. 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel. In *Pharmacological reviews* 67 (1), pp. 1–35. DOI: 10.1124/pr.114.009225.
64. Kemppainen, E. J. Samuli. 2006. Fear Conditioning Is Impaired in Systemic Kainic Acid and Amygdala-stimulation Models of Epilepsy. In *Epilepsia* 47 (5), pp. 820–829. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2006.00542.x.
65. Khazipov Roustem. 2003. Synchronization of Kainate-Induced Epileptic Activity via. In *The Journal of Neuroscience* 23 (12), pp. 5337–5341.

66. Kondratyev A, Gale K. 2004. Latency to onset of status epilepticus determines molecular mechanisms of seizure-induced cell death. *Mol Brain Res.*121(1-2):86-94. doi:10.1016/j.molbrainres.2003.11.005.
67. Krauson, Aram J.; Rued, Anna C.; Carattino, Marcelo D. 2013. Independent contribution of extracellular proton binding sites to ASIC1a activation. In *The Journal of biological chemistry* 288 (48), pp. 34375–34383. DOI: 10.1074/jbc.M113.504324.
68. Kreple, Collin J.; Lu, Yuan; Taugher, Rebecca J.; Schwager-Gutman, Andrea L.; Du, Jianyang; Stump, Madeliene et al. 2014. Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity. In *Nature neuroscience* 17 (8), pp. 1083–1091. DOI: 10.1038/nn.3750.
69. Krishtal, O. 1980. A RECEPTOR FOR PROTONS IN THE NERVE CELL MEMBRANE. In *Neuroscience letters* 5, pp. 2325–2327.
70. Kweon, Hae-Jin; Suh, Byung-Chang. 2013. Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation. In *BMB reports* 46 (6), pp. 295–304. DOI: 10.5483/bmbrep.2013.46.6.121.
71. Leitinger, Markus; Trinkka, Eugen; Giovannini, Giada; Zimmermann, Georg; Florea, Cristina; Rohrer, Alexandra et al. 2019. Epidemiology of status epilepticus in adults: A population-based study on incidence, causes, and outcomes. In *Epilepsia* 60 (1), pp. 53–62. DOI: 10.1111/epi.14607.
72. Leng, Tian-dong; Xiong, Zhi-Gang. 2013. The pharmacology and therapeutic potential of small molecule inhibitors of acid-sensing ion channels in stroke intervention. In *Acta pharmacologica Sinica* 34 (1), pp. 33–38. DOI: 10.1038/aps.2012.81.
73. Lin, Shing-Hong. 2015. Genetic mapping of ASIC4 and contrasting phenotype to ASIC1a in modulating innate fear and anxiety. In *The European journal of neuroscience* 41 (12), pp. 1553–1568. DOI: 10.1111/ejn.12905.

74. Liu J, Wang A, Li L, Huang Y, Xue P, Hao A. 2010. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure*.19(3):165-172. doi:10.1016/j.seizure.2010.01.010.
75. Liu YF, Gao F, Li XW, Jia RH, Meng XD, Zhao R, et al. 2012. The anticonvulsant and neuroprotective effects of Baicalin on pilocarpine-induced epileptic model in rats. *Neurochem Res*.37(8):1670-1680. doi:10.1007/s11064-012-0771-8
76. Lopez-Meraz ML, Niquet J, Wasterlain CG. 2010. Distinct caspase pathways mediate necrosis and apoptosis in subpopulations of hippocampal neurons after status epilepticus. In: *Epilepsia*. Vol 51.56-60. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02611.x
77. Löscher, Wolfgang. 2002. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. In *Epilepsy Research* 50 (1-2), pp. 105–123. DOI: 10.1016/S0920-1211(02)00073-6.
78. Löscher, Wolfgang; Brandt, Claudia. 2010. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. In *Pharmacological reviews* 62 (4), pp. 668–700. DOI: 10.1124/pr.110.003046.
79. Löscher, Wolfgang; Klitgaard, Henrik; Twyman, Roy E.; Schmidt, Dieter. 2013. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. In *Nature reviews. Drug discovery* 12 (10), pp. 757–776. DOI: 10.1038/nrd4126.
80. Lv, Rui-Juan; He, Jin-Sheng; Fu, Yuan-Hui; Zhang, Ya-Qing; Shao, Xiao-Qiu; Wu, Li-Wen et al. 2011. ASIC1a polymorphism is associated with temporal lobe epilepsy. In *Epilepsy research* 96 (1-2), pp. 74–80. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2011.05.002.
81. Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, et al. 2009. Antagonism of Peripheral Inflammation Reduces the Severity of Status Epilepticus. *Neurobiol Dis*. 33(2):171-181. doi: 10.1016/j.nbd. 2008.10.002

82. McElroy PB, Liang LP, Day BJ, Patel M. 2017. Scavenging reactive oxygen species inhibits status epilepticus-induced neuroinflammation. *Exp Neurol*. 298:13-22/ doi:10.1016/j.expneurol.2017.08.009
83. McNaughton, Neil; Gray, Jeffrey A. 2000. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. In *Journal of Affective Disorders* 61 (3), pp. 161–176. DOI: 10.1016/S0165-0327(00)00344-X.
84. McNaughton N, Kocsis B, Hajos M. 2007. Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? *Behav Pharmacol*. 18(5-6):329-46
85. Méndez-Armenta M, Nava-Ruíz C, Juárez-Rebollar D, Rodríguez-Martínez E, Yescas Gómez P. 2014. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxid Med Cell Longev*. doi:10.1155/2014/293689
86. Patel M. 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 37(12):1951-1962.
87. Patel, Tapan P. 2014. An open-source toolbox for automated phenotyping of mice in behavioral tasks. In *Frontiers in behavioral neuroscience* 8, p. 349. DOI: 10.3389/fnbeh.2014.00349.
88. Pestana RRF, Kinjo ER, Hernandes MS, Britto LRG. 2010. Reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are involved in neurodegeneration in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*. 484(3):187-191. doi:10.1016/j.neulet.2010.08.049
89. Pidoplichko, Volodymyr I. 2006. Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, pp. 11376–11380.
90. Pidoplichko, Volodymyr I. 2014. ASIC1a activation enhances inhibition in the basolateral amygdala and reduces anxiety. In *The Journal of neuroscience* :

- the official journal of the Society for Neuroscience 34 (9), pp. 3130–3141. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4009-13.2014.
91. Pitkänen A, Lukasiuk K. 2009. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* 14(1 SUPPL. 1):16-25. doi:10.1016/j.yebeh.2008.09.023
 92. Prut, Laetitia. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. In *European Journal of Pharmacology* 463 (1-3), pp. 3–33. DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01272-X.
 93. Puttachary S, Sharma S, Stark S, Thippeswamy T. 2015. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed Res Int.* doi:10.1155/2015/745613
 94. Scharfman HE. 2007. The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 7(4):348-354. doi:10.1007/s11910-007-0053-z.
 95. Scorza, Fulvio A. 2009. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? In *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 81 (3), pp. 345–365. DOI: 10.1590/S0001-37652009000300003.
 96. Sukach V. A. 2011. (3-CARBOXAMIDINO -2-OXO-2H- CHROMEN-7-YL) -4-GUANIDINOBENZOATES ARE NOVEL BLOCKERS OF ACID SENSING ION CHANNELS. In *Fiziologichnyi Zhurnal* 57 (6).
 97. Takács VT, Cserép C, Schlingloff D, Pósfai B, Szőnyi A, Sos KE, et al. 2018. Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nat Commun.* 9(1):2848.
 98. Thom M, Eriksson S, Martinian L, Caboclo LO, McEvoy AW, Duncan JS, et al. 2009. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68(8):928-938. doi:10.1097/NEN.0b013e3181b05d67.
 99. Tombini M, Assenza G, Quintiliani L, Ricci L, Lanzone J, Ulivi M, Di Lazzaro V. 2020. Depressive symptoms and difficulties in emotion regulation in adult patients with epilepsy: Association with quality of life and stigma. *Epilepsy Behav.* 107:107073.

100. Turski, L. 1989. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: A novel experimental model of intractable epilepsy. In *Synapse* 3 (2), pp. 154–171. DOI: 10.1002/syn.890030207
101. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. 2011. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 7(1):31-40. doi:10.1038/nrneurol.2010.178
102. Vezzani, Annamaria; Fujinami, Robert S.; White, H. Steve; Preux, Pierre-Marie; Blümcke, Ingmar; Sander, Josemir W.; Löscher, Wolfgang. 2016. Infections, inflammation and epilepsy. In *Acta neuropathologica* 131 (2), pp. 211–234. DOI: 10.1007/s00401-015-1481-5.
103. Waldmann R. 1997. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. In *Nature* 386, pp. 173–177.
104. Wang WZ, Chu XP, Li MH, Seeds J, Simon RP, and Xiong ZG. 2006. Modulation of acid-sensing ion channel currents, acid-induced increase of intracellular Ca²⁺, and acidosis-mediated neuronal injury by intracellular pH. *J Biol Chem* 281: 29369–29378
105. Wang X, Li WG, Yu Y, Xiao X, Cheng J, Zeng WZ, Peng Z, Xi Zhu M, and Xu TL. 2013. Serotonin facilitates peripheral pain sensitivity in a manner that depends on the nonproton ligand sensing domain of ASIC3 channel. *J Neurosci* 33:4265–4279
106. Wemmie, John A. 2002. The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory. In *Neuron* 34, pp. 463–477.
107. Wemmie, John A. 2003. Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning. In *The Journal of Neuroscience* 23 (13), pp. 5496–5502.
108. Wemmie, John A. 2004. Overexpression of acid-sensing ion channel. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (10), pp. 3621–3626.

109. Wemmie, John A. 2006. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. In *Trends in neurosciences* 29 (10), pp. 578–586. DOI: 10.1016/j.tins.2006.06.014.
110. Wu CL, Huang LT, Liou CW, Wang TJ, Tung YR, Hsu HY, et al. 2001. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in immature rats result in long-term deficits in spatial learning and hippocampal cell loss. *Neurosci Lett.* 312(2):113-117. doi:10.1016/S0304-3940(01)02202-9
111. Wu LJ, Duan B, Mei YD, Gao J, Chen JG, Zhuo M, Xu L, Wu M, and Xu TL. 2004. Characterization of acid-sensing ion channels in dorsal horn neurons of rat spinal cord. *J Biol Chem* 279:43716–43724
112. Wu, Pu-Yeh. 2013.: Acid-sensing ion channel-1a is not required for normal hippocampal LTP and spatial memory. In *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (5), pp. 1828–1832. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4132-12.2013.
113. Xiong, Zhi-Qi; Saggau, Peter; Stringer, Janet L. 2000. Activity-Dependent Intracellular Acidification Correlates with the Duration of Seizure Activity. In *J. Neurosci.* 20 (4), pp. 1290–1296. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-04-01290.2000.
114. Xiong, Zhi-Gang; Zhu, Xiao-Man; Chu, Xiang-Ping; Minami, Manabu; Hey, Jessica; Wei, Wen-Li et al. 2004. Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. In *Cell* 118 (6), pp. 687–698. DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.026.
115. Xiong, Zhi-Gang; Pignataro, Giuseppe; Li, Minghua; Chang, Su-youne; Simon, Roger P. 2008. Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases. In *Current opinion in pharmacology* 8 (1), pp. 25–32. DOI: 10.1016/j.coph.2007.09.001.
116. Yogarajah et al. 2019. Social cognition, psychiatric comorbidities, and quality of life in adults with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 100(Pt B):106321.
117. Zeng, Wei-Zheng; Liu, Di-Shi; Liu, Lu; She, Liang; Wu, Long-Jun; Xu, Tian-Le. 2015. Activation of acid-sensing ion channels by localized proton

- transient reveals their role in proton signaling. In *Scientific reports* 5, p. 14125. DOI: 10.1038/srep14125.
118. Zha, Xiang-ming. 2006. Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. In *PNAS* 103 (44), pp. 16556–16561.
119. Zha, Xiang-ming. 2013. Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function. In *Molecular brain*. Available online at <http://www.molecularbrain.com/content/6/1/1>.
120. Ziemann, Adam E.; Schnizler, Mikael K.; Albert, Gregory W.; Severson, Meryl A.; Howard, Matthew A.; Welsh, Michael J.; Wemmie, John A. 2008. Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a. In *Nature neuroscience* 11 (7), pp. 816–822. DOI: 10.1038/nn.2132.
121. Ziemann, Adam E.; Allen, Jason E.; Dahdaleh, Nader S.; Drebot, Iuliia I.; Coryell, Matthew W.; Wunsch, Amanda M. et al. 2009. The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. In *Cell* 139 (5), pp. 1012–1021. DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.029.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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.

В яких опубліковані основні результати роботи:

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. М.Р. Fedoriuk, А.О. Cherninskyi, О.Р. 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>

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

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, Kyiv, 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