

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

На правах рукопису

ІСАЄВА ОЛЕНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК 612.82:576.54:577.3

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

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

**Дисертація на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук**

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

Київ 2016

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ.	20
1.1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЕПІЛЕПТИЧНІ НАПАДИ ТА ЕПІЛЕПСІЮ	20
1.1.1. <i>Поширеність</i>	21
1.1.2. <i>Основні причини виникнення епілептичних нападів.....</i>	23
1.1.3. <i>Класифікація епілептичних нападів.....</i>	25
1.1.4. <i>Епілептиформна активність.....</i>	27
1.2. ЕПІЛЕПТИЧНІ НАПАДИ В ПЕРІОД РАНЬОГО РОЗВИТКУ	28
1.2.1. <i>Вплив епілептичних нападів на розвиток нервової системи .</i>	29
1.2.2. <i>Експериментальні моделі епілепсії у вивченні наслідків</i> <i>епілептиформної активності.....</i>	35
1.2.2.1. <i>Моделі епілептичних нападів, викликаних гіпоксією</i>	35
1.2.2.2. <i>Моделі фебрильних нападів.....</i>	37
1.2.2.3. <i>Моделі епілептичного статусу.....</i>	38
1.2.2.4. <i>Флуротилова модель неонатальних судомних нападів.....</i>	43
1.3. СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗ ТА СКРОНЕВУ ЕПІЛЕПСІЮ	45
1.3.1. <i>Причини розвитку набутої епілепсії.....</i>	45
1.3.2. <i>Моделі скроневої епілепсії у вивченні механізмів</i> <i>епілептогенезу.</i>	47
1.3.3. <i>Патофізіологія розвитку скроневої епілепсії.</i>	48
1.3.3.1. <i>Загибель нейронів і гліоз.....</i>	48
1.3.3.2. <i>Проростання аксонів моховитих клітин</i>	52
1.3.3.3. <i>Нейрогенез</i>	54
1.3.3.4. <i>Внутрішньоклітинний кальцій і окислювальний стрес</i>	54
1.3.3.5. <i>Потенціалзалежні та лігандкеровані іонні канали.....</i>	56
1.3.3.6. <i>Запальні процеси</i>	61

1.3.3.7. Порухення цілісності гематоенцефалічного бар'єру	64
1.3.4. <i>Роль тромбіну та протеазаактивованих рецепторів в функціонуванні ЦНС у нормі та при патологічних станах</i>	<i>66</i>
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	71
2.1. Об'єкти дослідження.....	71
2.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ АКТИВНОСТІ.....	82
2.2.1. <i>Флуротилова модель повторюваних неонатальних судомних нападів</i>	<i>82</i>
2.2.2. <i>Бікукулінова модель повторюваної локальної епілептиформної активності в період раннього розвитку.....</i>	<i>88</i>
2.2.3. <i>Літій-пілокарпінова модель епілептичного статусу.....</i>	<i>89</i>
2.3. ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ <i>IN VITRO</i>	91
2.3.1. <i>Виготовлення свіжоізолюваних зрізів мозку щурів.....</i>	<i>92</i>
2.3.2. <i>Позаклітинне відведення фокальних потенціалів у зрізах мозку щурів.</i>	<i>93</i>
2.3.2.1. <i>Реєстрація епілептиформної активності</i>	<i>94</i>
2.3.2.2. <i>Метод дослідження розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі.</i>	<i>95</i>
2.3.2.3. <i>Реєстрація викликаних постсинаптичних потенціалів та індукція синаптичної пластичності.</i>	<i>96</i>
2.3.3. <i>Реєстрація постсинаптичних струмів та потенціалів дії від поодиноких нейронів.....</i>	<i>97</i>
2.4. ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ <i>IN VIVO</i>	100
2.4.1. <i>Процедура імплантації ЕЕГ-електродів.....</i>	<i>100</i>
2.4.2. <i>Реєстрація зовнішньоклітинних потенціалів in vivo</i>	<i>102</i>
2.5. ГІСТОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	103
2.5.1. <i>Приготування зрізів мозку для гістологічних досліджень... ..</i>	<i>103</i>

2.5.2. Імуногістохімічні методи дослідження.....	103
2.5.3. Візуалізація нервових клітин за допомогою тіонінового забарвлення.	105
2.6. ПОВЕДІНКОВІ ТЕСТИ.....	106
2.6.1. Апарат для проведення тесту на рівень поведінкової гнучкості та «затриманого-невідповідного-до-проби»-тесту.....	106
2.6.2. Тест на рівень поведінкової гнучкості	108
2.6.3 «Затриманий-не-відповідний-до-проби»-тест	109
2.6.4. Тест «відкрита арена»	111
2.6.5. Тест «перегородка».....	112
2.6. ХІМІЧНІ РЕАКТИВИ І РОЗЧИНИ	114
2.7. МЕТОДИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ	119

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ НЕОНАТАЛЬНИХ СУДОМНИХ ЕПІЛЕПТИЧНИХ НАПАДІВ НА СИНАПТИЧНУ АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА. 121

3.1. Розвиток функціональних ГАМК-ергічних синапсів	121
3.2. Розвиток збуджувальної синаптичної передачі.....	127

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ НЕОНАТАЛЬНИХ СУДОМ НА АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ СОМАТОСЕНСОРНОЇ КОРИ ЩУРІВ..... 136

4.1. Поріг виникнення епілептиформної активності.	136
4.2. Процес поширення ГАБАЗІН-ІНДУКОВАНОЇ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ АКТИВНОСТІ.....	144
4.3. Гальмівна синаптична передача в нейронах соматосенсорної кори.	147
4.4. Збуджувальна синаптична передача в нейронах соматосенсорної кори.....	154
4.5. Синаптична пластичність	160

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НЕОНАТАЛЬНИХ СУДОМНИХ НАПАДІВ НА НЕРВОВУ АКТИВНІСТЬ МЕДІАЛЬНОЇ ЗОНИ ПРЕФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ ЩУРІВ 170

- 5.1. Синаптична передача в нейронах медіальної зони префронтальної
кори..... 171
- 5.2. Викликані постсинаптичні потенціали 176
- 5.3. Короткотривала синаптична пластичність 179

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ПОВТОРЮВАНОЇ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ АКТИВНОСТІ, ЛОКАЛІЗОВАНОЇ В МЕЖАХ ПРЕФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ, НА СИНАПТИЧНУ ПЛАСТИЧНІСТЬ НЕЙРОНІВ МЕДІАЛЬНОЇ ЗОНИ ПРЕФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ І ПОВЕДІНКОВІ ФЕНОМЕНИ..... 193

- 6.1. Модель епілептиформної активності, локалізованої в межах
префронтальної кори. 193
- 6.2. Викликані постсинаптичні потенціали та синаптична
пластичність..... 199
- 6.3. Архітектоніка медіальної зони префронтальної кори 209
- 6.4. Поведінкові феномени. 211
 - 6.4.1. Поведінкова гнучкість..... 212
 - 6.4.2. «Затриманий-не-відповідний-до-проби»- тест 215
 - 6.4.3. Тест «відкрита арена» 220
 - 6.4.4. Тест «перегородка»..... 222

РОЗДІЛ 7. МОРФОЛОГІЧНІ, ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ТА ПОВЕДІНКОВІ ЗМІНИ ПІД ЧАС ВИКЛИКАНОГО ЕПІЛЕПТИЧНИМ СТАТУСОМ ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗУ ТА РОЛЬ ПРОТЕАЗААКТИВОВАНИХ РЕЦЕПТОРІВ 1 В ЦИХ ПРОЦЕСАХ. ... 225

- 7.1. Локалізація PAR1 в зоні CA1 гіпокампа 226

7.2. Вплив інгібування PAR1 на рівень тромбіну і PAR1 та забарвлення тіоніном в зоні CA1 гіпокампа після епілептичного статусу	228
7.3. Вплив інгібування PAR1 на відновлення втраченої ваги та смертність тварин після епілептичного статусу	234
7.4. Вплив селективного антагоніста PAR1 на епілептиформну активність та спонтанні епілептичні напади	237
РОЗДІЛ 8. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	244
8.1. Вплив неонатальних повторюваних судомних нападів на синаптичну передачу в різних ділянках мозку.....	244
8.1.1. Гіпокамп.....	244
8.1.2. Соматосенсорна кора.....	248
8.1.3. Медіальна зона префронтальної кори.....	254
8.2. Вплив безсудомної епілептиформної активності, спричиненої ін'єкціями букукуліну в префронтальну кору в період раннього розвитку, на синаптичну пластичність та поведінкові феномени.	258
8.3. Роль протеазаактивованих рецепторів 1 в епілептогенезі, спровокованому епілептичним статусом	263
8.3.1. Ефекти блокування PAR1 на гістопатологічні зміни в зоні CA1 гіпокампа, спричинені епілептичним статусом.....	263
8.3.2. Вплив інгібування PAR1 на виживаність тварин після епілептичного статусу	265
8.3.3. Ефект антагоніста PAR1 на епілептиформну активність та спонтанні судоми після епілептичного статусу.....	266
8.3.4. Ймовірні механізми впливів PAR1-опосередкованої сигналізації на епілептогенез.....	267
ВИСНОВКИ	271
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	275

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ACSF – штучна спинномозкова рідина
D-APV – D-аміно-5-фосфоновалеріанова кислота
АМПА – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
ВПСП – викликані постсинаптичні потенціали
ГАМК – γ -аміномасляна кислота
ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр
ГПСС – гальмівні постсинаптичні струми
ДП – довготривала пластичність
ЕЕГ – електроенцефалограма
ЕН – електрографічні напади
ЕФА – епілептиформна активність
ЕС – епілептичний статус
ІПА – інтеріктально-подібна активність
КТП – короткотривала пластичність
ЗПСС – збуджувальні постсинаптичні струми
мПФК – медіальна зона префронтальної кори
НМДА – N-метил-D-аспартатна кислота
ПАР1 – протеазаактивований рецептор 1
ПТП – посттетанічна потенціація
СЕ – скронева епілепсія
ССК – соматосенсорна кора
СН – судомні напади
ФБ – фосфатно-буферний розчин
ФТ – флуротил
ЦНС – центральна нервова система
ЧМТ – черепномозкова травма

ВСТУП

Актуальність теми. Епілепсія є поширеним психоневрологічним захворюванням, основним симптомом якого є спонтанні епілептичні напади різної інтенсивності, зумовлені надмірно синхронізованою активністю великої кількості нейронів мозку [1]. Епілептиформна активність (ЕФА) часто зустрічається у дітей і може обумовлюватися різноманітними причинами – бути спадковою або набутою, найчастіше в результаті пошкодження головного мозку різного генезу [2, 3]. Приблизно у 30 % випадків наявність епілептичних нападів у дитячому віці спричиняє розвиток хронічної епілепсії у подальшому житті [4]. У переважній більшості випадків наявність електрографічної ЕФА в складі ЕЕГ пов'язана з серйозними хронічними когнітивними та поведінковими розладами [5–7].

Епілептичні напади у новонароджених можуть істотно перешкоджати нормальному розвитку ЦНС, впливати на координацію і упорядкування синаптичних зв'язків під час онтогенезу і навіть призводити до загибелі великих популяцій нервових клітин [8]. Інтенсивність негативних впливів ЕФА на функціонування мозку значною мірою залежить від віку організму; вона справляє різну дію на незрілі нейрони з невеликою кількістю синапсів та на більш розвинені нейрони, що мають велику кількість функціональних синапсів [9]. Ця особливість найбільш важлива щодо приматів, для яких характерна велика тривалість періоду розвитку головного мозку. Дозрівання різних структур мозку є гетерохронним. Першими закінчують своє формування стовбурові відділи, відповідальні за реалізацію природжених, безумовних рефлексів, тоді як дозрівання вищих відділів (таких, як великі півкулі головного мозку), котрі забезпечують контроль вищої нервової діяльності і відповідають за реалізацію індивідуально набутих умовних рефлексів, відбувається пізніше [10]. Як зазначалось вище, ЕФА в критичний

період розвитку ЦНС може суттєво впливати на нормальний розвиток мозку, що спричиняє різноманітні поведінкові і когнітивні дефекти. Добре відомо, що такі фактори, як вік дитини, в якому відбувся перший епілептичний напад, тривалість та частота нападів, дози застосованих протиепілептичних препаратів, як правило, істотно впливають на загальний рівень когнітивних порушень у дітей з епілепсією [11]. Для вивчення механізмів і наслідків епілептичних нападів у дитячому віці були розроблені експериментальні моделі на тваринах із моделюванням ЕФА, спричиненої різноманітними факторами [12]. Проте, незважаючи на значну кількість фундаментальних та клінічних досліджень цієї проблеми, розуміння механізмів, які обумовлюють негативний вплив ЕФА на розвиток ЦНС, залишається обмеженим. Зокрема, подальшої деталізації потребує характеристика впливу ЕФА в неонатальний період на функції неокортекса. Питання, чи є неврологічні розлади наслідком наявності ЕФА, або вони є результатом впливу фармакологічного втручання, також значною мірою залишається відкритим. Тому дослідження впливів ЕФА в період раннього розвитку на функціонування ЦНС є однією з найактуальніших проблем сучасної нейрофізіології.

У 30 – 40 % усіх випадків розвиток епілепсії може бути спровокований різноманітними пошкодженнями мозку, черепномозковими травмами, ішемічними інсультами, внутрішньомозковими крововиливами, інфекціями, пухлинами, корковою дисплазією, деякими нейродегенеративними захворюваннями, симптоматичними епілептичними нападами (такими, як складні фебрильні судоми)[1]. Незважаючи на велику різноманітність етіології, загальною ознакою відповідних розладів є наявність пароксизмальних змін збудливості ЦНС, що індукує подібні патологічні особливості: останні в кінцевому рахунку проявляються клінічно як епілептичне захворювання. Дослідження останніх років на різних експериментальних моделях набуті епілепсії значно розширили наше

розуміння молекулярних і клітинних процесів, які відбуваються в перебігу епілептогенезу і можуть сприяти формуванню анормальних нейронних мереж, здатних до спонтанної генерації ЕФА[13]. Тим не менш, слід визнати: поки що немає надійної стратегії запобігання розвитку набутої епілепсії. Тому пошук нових молекулярних мішеней, залучених у епілептогенез, є одним з найпріоритетніших завдань сучасної нейрофізіології.

Відомо, що низька ушкоджень мозку різної етіології, які можуть стати причиною розвитку епілепсії, пов'язані з порушенням цілісності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ)[14]. Як клінічні спостереження, так і дослідження на різних експериментальних моделях переконливо вказують на те, що дисфункція ГЕБ може бути важливим фактором ризику розвитку набутої епілепсії у подальшому житті [15]. Як вважають, підвищення проникливості ГЕБ може призводити до екстравазації клітин крові і білків плазми (таких, як альбумін, тромбін, плазміноген) у внутрішньомозкове середовище. Ці фактори здатні безпосередньо або опосередковано активувати різні патологічні процеси та призводити до формування епілептичного вогнища [16]. Втім, незважаючи на значні досягнення в дослідженнях специфічних шляхів, що активуються у результаті порушень ГЕБ, і можуть брати участь у розвитку набутої епілепсії, на сьогодні зв'язок між відповідними процесами залишається значною мірою невивченим.

Існують докази того, що, окрім ключової ролі в коагуляції крові, білок сироватки тромбін задіяний у численні механізми, важливі для функціонування мозку, як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах [17]. На можливе залучення тромбіну і його молекулярних рецепторів – протеазаактивованих рецепторів 1 (ПАР1) – у процес розвитку епілепсії вказують наступні спостереження: 1) інтрацеребральне введення тромбіну в базальні ганглії щурів викликає епілептичні напади; 2) тромбін, активуючи ПАР1, може ініціювати ушкодження нейронів, впливати на нейрогенез,

викликати гліоз, запалення та інші процеси, які часто спостерігаються при епілептогенезі; 3) інгібування ПАР1 зумовлює нейропротекторні і протизапальні ефекти в умовах різних моделей ушкодження головного мозку; 4) ПАР1 бере участь у регуляції встановлених молекулярних мішеней анти-епілептогенної терапії [17–19]. Проте, незважаючи на значну кількість встановлених фактів, нині не має прямих досліджень участі тромбіну і ПАР1 в епілептогенезі.

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

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

Робота виконана в рамках наукових програм відділів загальної фізіології нервової системи і фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: "Молекулярні механізми інтегративної функції нервових клітин в нормі та при мозковій патології" (№ державної реєстрації 197U0009158), "Молекулярні механізми, відповідальні за специфіку функцій різних мозкових структур" (№ державної реєстрації 0100U002062), «Дослідження молекулярно-генетичних механізмів фізіологічних та патофізіологічних процесів та розробка методів їх корекції» (№ державної реєстрації: 0107U005336); «Механізми внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації; вивчення шляхів їх модуляції та пошук нових фармакологічних впливів» (№ державної реєстрації: 0107U010843); «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології»

(№ державної реєстрації: 0110U004750); на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології – «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» (№ державної реєстрації UF45.2/001); в рамках проекту Українського науково-технологічного центру «Використання заряджених наночасток для регуляції збудливості нервових клітин: новий підхід до боротьби з епілепсією» (№ державної реєстрації 102/58).

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

Завдання дослідження:

1. Встановити вплив неонатальних судомних нападів на поріг виникнення ЕФА у корі головного мозку дорослих щурів.
2. Ідентифікувати вплив неонатальних повторюваних судомних нападів на характеристики синаптичної передачі в нейронах різних відділів ЦНС у дослідях *in vitro*.
3. Визначити вплив ЕФА, виниклої під час раннього розвитку, на різні форми синаптичної пластичності в корі головного мозку дорослих щурів.
4. Охарактеризувати наслідки ЕФА, індукованої під час раннього розвитку, щодо параметрів поведінки дорослих щурів.
5. Описати морфологічні та електрофізіологічні зміни у головному мозку щурів, спровоковані епілептичним статусом.
6. Оцінити можливість залучення змін у системі тромбін - ПАР1 у процес епілептогенезу з використанням літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії.
7. З'ясувати вплив модуляції активності ПАР1 на розвиток епілепсії, спричинений епілептичним статусом.

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

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

Методи дослідження. Експериментальне моделювання різних типів ЕФА (дослідження впливу індукованої судомної і безсудомної ЕФА на функціонування різних ділянок ЦНС); петч-клемп-реєстрація постсинаптичних струмів (оцінка змін характеристик синаптичної передачі, спричинених ЕФА); мікроелектродна реєстрація мембранного потенціалу (визначення збудливості і синаптичної пластичності нейронних мереж, дослідження динаміки розвитку «гальмівної» функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі); гістологічні методи (оцінка життєздатності та загибелі клітин, визначення рівня тромбіну і ПАР1 у нервовій тканині), оцінка параметрів поведінкових феноменів у тварин (локомоторної активності, рівня тривожності, вмотивованості, поведінкової гнучкості, оперативної пам'яті, уваги та соціальної поведінки); оцінка впливів фармакологічних агентів, статистичний аналіз числових даних.

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

Продемонстровано, що наявність епілептичних нападів у ранній період життя щурів призводить до суттєвого зниження амплітуди гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС) у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа і не впливає на розвиток збуджувальної синаптичної передачі в цих нейронах.

Отже, виявлено порушення балансу збудження/гальмування в гіпокампі, пов'язане з історією судом в період раннього розвитку.

Вперше встановлено, що повторювані неонатальні епілептичні напади, викликані інгаляцією флуротилу (ФТ), призводять до хронічного зниження порогу виникнення ЕФА в соматосенсорній корі (ССК) щурів. Підвищення збудливості нервових мереж може (принаймні частково) бути пов'язане з порушеннями функції гальмівної та збуджувальної синаптичної передачі у нейронах цієї ділянки кори головного мозку. Виявлене значне зниження амплітуди спонтанних ГПСС та частоти мініатюрних ГПСС у пірамідних клітинах шару 2/3 ССК, без змін амплітуди мініатюрних ГПСС у щурів експериментальної групи, вказує на пресинаптичний характер змін гальмівної синаптичної передачі. Вперше показано, що неонатальні судоми зумовлюють значні зміни амплітуди і частоти спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (ЗПСС) у нейронах ССК. Збільшення частоти мініатюрних ЗПСС у пірамідних нейронах шару 2/3 ССК у щурів з історією неонатальних епілептичних нападів, швидше за все, вказує на пресинаптичну природу змін глутаматергічної синаптичної передачі. Виявлено, що порушення функції збуджувальної синаптичної передачі в нейронах ССК таких тварин значною мірою зумовлена модифікацією стану НМДА-рецепторів.

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

Вперше детально проаналізовано вплив повторюваних неонатальних епілептичних нападів на синаптичну пластичність в ССК та мПФК щурів. Встановлено, що такі напади не впливають на вірогідність виникнення довготривалої потенціації, на депресію постсинаптичних потенціалів,

викликану високочастотною стимуляцією, та на максимальну посттетанічну потенціацію постсинаптичних відповідей в синаптичних зв'язках шарів 2/3 і 4 ССК, але призводять до хронічного посилення феномену довготривалої потенціації в цих синапсах. Встановлено також, що епілептичні напади під час раннього розвитку призводять до хронічних змін короткотривалої пластичності при передачі між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК.

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

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

З використанням літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії вперше продемонстровано роль тромбіну і протеазаактивованого рецептора 1 (ПАР1) в епілептогенезі, спровокованому ЕС. Встановлено, що ЕС, індукований ін'єкцією пілокарпіну, спричиняє підвищення рівня тромбіну і зниження щільності ПАР1 в зоні CA1 гіпокампа. З використанням специфічного антагоніста ПАР1 доведено, що пригнічення активності цих рецепторів призводить до значного зниження спричинених ЕС смертності і захворюваності тварин, відновлення експресії ПАР1 у зоні CA1, зниження

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

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

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

У дисертаційній роботі вперше отримані дані, щодо участі системи тромбін - ПАР1 у епілептогенезі, спричиненому епілептичним статусом. Отримані дані щодо антиепілептогенного і нейропротекторного ефектів інгібування ПАР1 вказують на те, що ПАР1 може стати новою перспективною мішенню антиепілептогенної терапії.

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

Апробація результатів дисертації. Усі матеріали дисертації доповідались на семінарах Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, а також на наукових симпозіумах і з'їздах: конференції Фізіологічного товариства Великобританії (2000), щорічних конференціях Американського товариства нейронаук, (США, 2009, 2010), Американської

епілептичної спілки (2006, 2007, 2009, 2010), Європейському конгресі епілептологів (2008, 2012), Міжнародній конференції “Molecular mechanisms of intracellular calcium signaling” (Київ, 2009), 5-й міжнародній конференції Українського фізіологічного товариства, присвяченій пам’яті П. Г. Костюка (Київ, 2011), а також на засіданнях сектору молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

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

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, восьми розділів, висновків та списку використаної літератури.

У першому розділі наведено критичний аналіз сучасних наукових літературних джерел щодо стану вивчення функціональних змін у головному мозку, спричинених ЕФА в ранньому віці, а також щодо механізмів розвитку набутої епілепсії.

У другому розділі «Матеріали і методи дослідження» описані експериментальні моделі різних типів ЕФА у молодих і дорослих щурів; методи виготовлення зрізів мозку щурів; процедура імплантації електродів для внутрішньомозкової реєстрації польових потенціалів; електрофізіологічні методи дослідження постсинаптичних струмів, позаклітинних мембранних потенціалів і синаптичної пластичності; гістологічні методи; методи вивчення поведінкових феноменів піддослідних тварин.

У третьому-сьомому розділах наведено результати експериментальних досліджень і статистичний аналіз отриманих даних.

У восьмому розділі «Обговорення результатів» здійснено аналіз і узагальнення одержаних результатів, на основі яких зроблено висновки.

Список використаної літератури нараховує 473 джерел.

Обсяг дисертації складає 332 сторінок, із них основного тексту – 267 сторінок. Дисертаційна робота ілюстрована 115 рисунками і 9 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ.

1.1. Загальні уявлення про епілептичні напади та епілепсію

Епілепсія (від грецького *ἐπιληψία* – схоплюю, нападаю) є одним з найбільш поширених психоневрологічних розладів функціонування ЦНС, що характеризується повторними спонтанними епілептичними нападами та супроводжується іншими клінічними й параклінічними ознаками, найбільш важливими з яких є психічні розлади та зміни ЕЕГ. Епілепсія не може бути розглянута як ізольоване захворювання, а має сприйматися як сукупність симптомів із різними ознаками, основним проявом яких є повторні, спонтанно виникаючі епілептичні напади.

Епілепсія відома з найдавніших часів. У стародавніх Греції та Римі її пов'язували з чарами і магією та називали "священною хворобою". В епоху середньовіччя епілепсію сприймали як невиліковну хворобу, що передається через дихання хворого під час нападу. На хворих на епілепсію влаштовували гоніння, їх оголошували пов'язаними з потойбічними силами, спалювали на вогнищах. У той же час наукові уявлення про епілепсію були висловлені дуже давно. Ще Гіппократ у своєму великому трактаті «Про священну хворобу» писав про епілепсію таке: «Наскільки мені здається, вона ні божественна, ні більш священна, ніж інші, природне її походження таке ж, як і інших хвороб. Мені здається, що першими, хто визнав цю хворобу священною, були такі ж люди, якими й тепер являються маги, шарлатани й дурисвіти. Але якщо знати її причини, будь-яка святість виключається. Отож аніскільки не божественне, а щось людське вбачається мені в усьому цьому... Причина ж цієї хвороби... є мозок». У Стародавньому Римі Гален ввів поняття аури, як особливого стану, що часто передуює парціальним епілептичним нападам. У одинадцятому

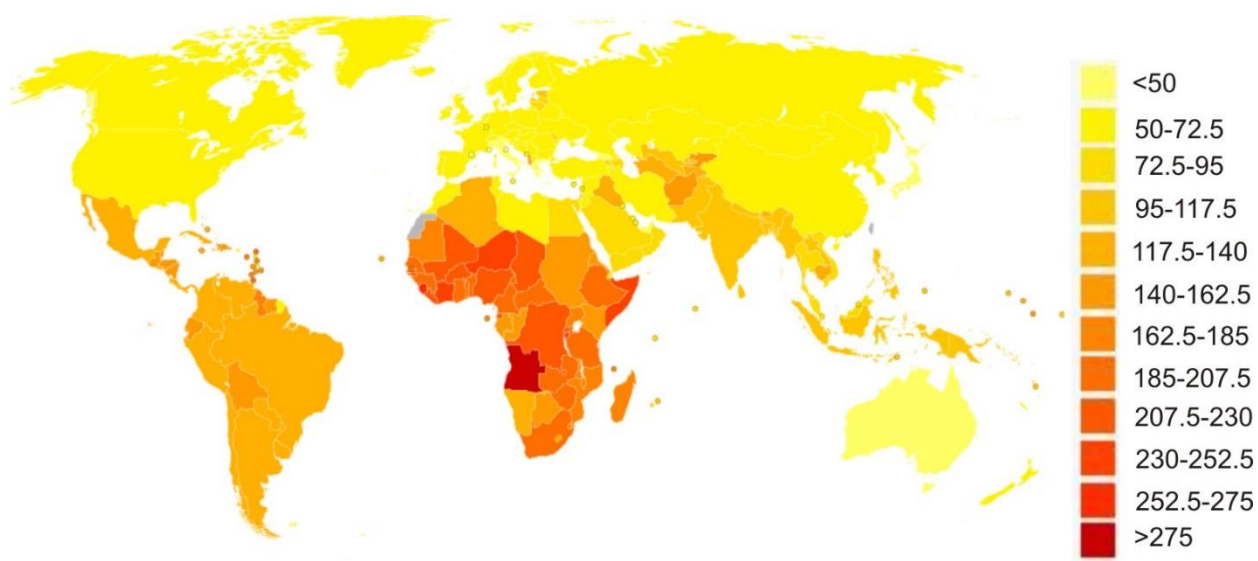
столітті арабський учений і філософ Авіценна (Абу Алі Ібн Сіна) вперше застосував термін епілепсія і описав її клінічну картину.

Основоположником сучасних уявлень про епілепсію є видатний англійський вчений Джон Х'юлінгс Джексон, який вважав, що судом є результатом спонтанних коротких електрохімічних розрядів мозку. Він також висунув припущення, що клінічні ознаки, ступінь і характер поширення епілептичного розряду в мозку, а також симптоми нападів залежать від місця розташування у корі головного мозку популяцій нейронів, залучених в ЕФА. Отже, Джон Х'юлінгс Джексон заклав фундамент сучасного розуміння функціональних особливостей мозку за епілепсії.

1.1.1. Поширеність

Близько 10 % населення у всьому світі хоча б раз у житті мали епілептичні судом, але діагноз епілепсія вимагає появи повторюваних спонтанних судом, які спостерігалися два або більше разів. За оцінкою Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я більше 65 мільйонів населення у світі нині страждає на епілепсією протягом життя і майже 80 % випадків захворювання реєструється у країнах, що розвиваються (**Рис. 1.1**).

Аналіз даних державної статистичної звітності свідчить про достатньо високі показники поширення захворюваності та інвалідності з приводу епілепсії в Україні. На кінець 2013 року кількість зареєстрованих хворих на епілепсію у нашій країні складала 0,25 % від загальної кількості населення, що відповідає 246 особам на 100 тис. населення. За 13-річний період показник поширення епілепсії збільшився з 235 до 246 на 100 тис. населення [20]. Були зареєстровані значні, різницею у 3 - 4 рази, коливання цих показників у різних регіонах країни. Особи працездатного віку склали 63,6 % зареєстрованих хворих на епілепсію [20].



***Рис 1.1.** Статистика захворювання на епілепсію в країнах світу з розрахунку на 100 000 жителів, дані за 2004 рік*

Залежність частоти виникнення епілептичних нападів від віку та статі людини зображена на **Рис. 1.2.** Напади спостерігаються приблизно у 7 з 1000 дітей у віці до 16 років; і у 1 з 200 дорослих. Число випадків епілептичних нападів різко збільшується серед людей старше 60-ти років. Їх вірогідність в ці періоди життя підвищена у чоловіків, порівняно з жінками [21].

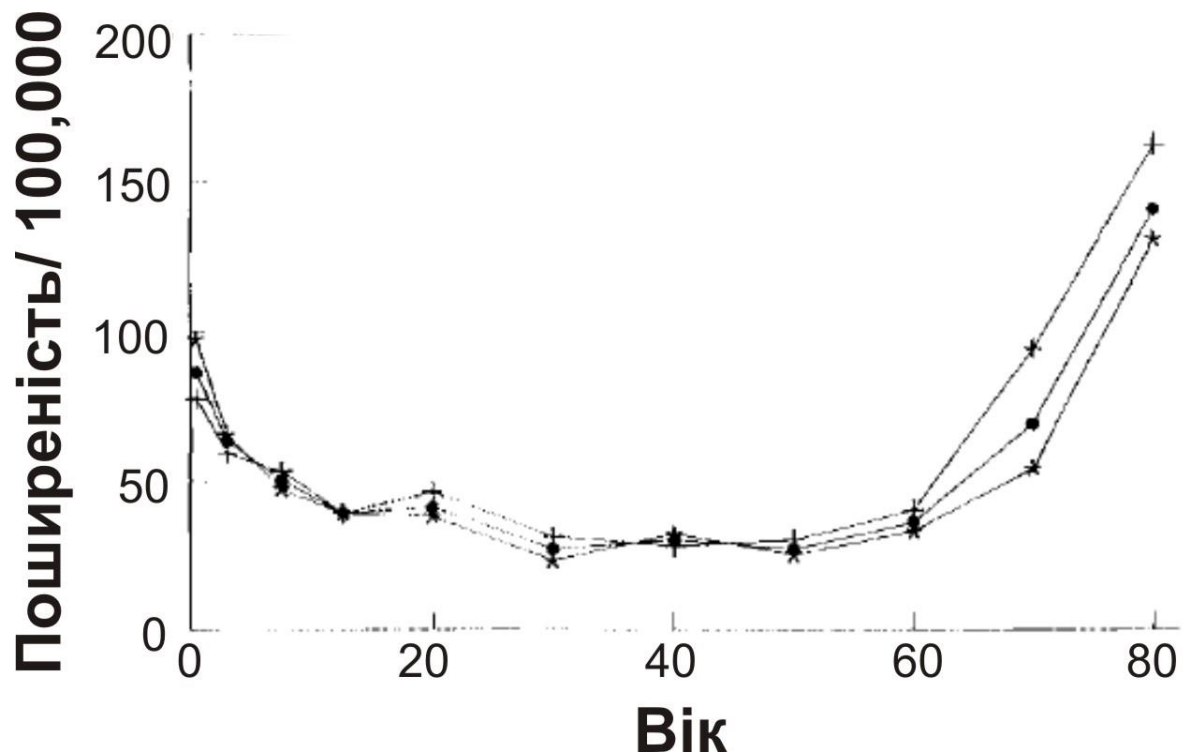


Рис 1.2. Залежність частоти виникнення епілептичних нападів від віку та статі людини (частоти виникнення у жінок (зірочка), у чоловіків (хрестик) та в загальній популяції (чорний кружечок))

1.1.2. Основні причини виникнення епілептичних нападів

Причини виникнення епілептичних нападів залежать від віку людини.

Основними причинами епілептичних нападів у дітей є:

- внутрішньочерепні крововиливи (травматичні, гіпоксичні напади у недоношених новонароджених);
- гіпоксемія, ішемія головного мозку;
- родові травми або вроджені пошкодження головного мозку, каліцтва, пороки розвитку, зокрема аневризми судин мозку;

- вірусні, бактеріальні або протозойні інфекції (менінгіт, енцефаліт, краснуха, герпес, токсоплазмоз, сифіліс, стафілококові, лістеріозні, колібацитарні інфекції тощо);

- інфекційно-токсичні і метаболічні порушення при гострих захворюваннях шлунково-кишкового тракту або органів дихання;

- метаболічні порушення: гіпоглікемія, гіперглікемія, гіпокальціємія, гіпомагнезія, гіпернатріємія, підвищена в'язкість крові, вроджені (генетичні) порушення обміну речовин;

- інтоксикації організму: ендогенна (уремія, білірубінемія тощо), екзогенна (харчові інтоксикації, пеніцилін, барбітурати та ін.);

- гіпертермія при інфекціях, інтоксикаціях.

Причинами судом у дорослому віці виступають:

- травми голови,

- інфекції;

- вживання алкоголю та стимуляторів;

- пухлини;

- внутрішньочерепні крововиливи, пов'язані з травмами, інсультом, аневризмами;

- побічні ефекти лікування.

Причинами судом у літніх людей є:

- інсульт;

- пухлини головного мозку;

- травми;

- нейродегенеративні захворювання.

Приблизно у 70 % пацієнтів з діагнозом епілепсія причина виникнення епілептичних нападів не може бути ідентифікована (**Рис. 1.3**). Ці

ідіопатичні епілепсії пов'язані переважно із спадковою схильністю, мають типовий віковий проміжок і добре піддаються лікуванню.

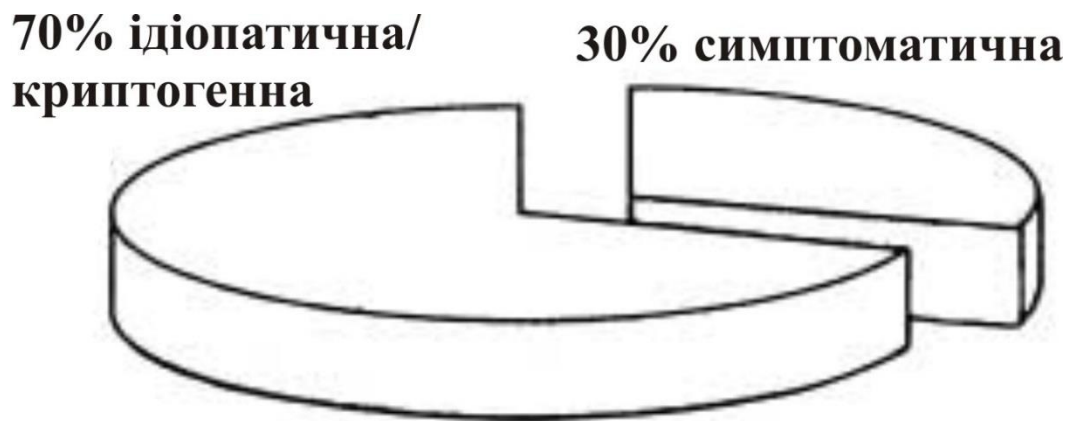


Рис. 1.3. *Причини виникнення епілептичних нападів і епілепсії.*

У випадку, коли при аналізі особливостей клінічного синдрому передбачається ймовірність віднесення епілепсії до симптоматичної, але причини залишаються не визначеними, говорять про криптогенну епілепсію.

1.1.3. Класифікація епілептичних нападів

Епілептичні напади можуть мати різні прояви залежно від їх етіології, локалізації ураження, електроенцефалографічних характеристик. Для зручності роботи з ними використовують різноманітні класифікації. В основі численних класифікацій лежать різносторонні характеристики.

За осередковими проявами розрізняють:

1) парціальні або фокальні напади, які виникають при пошкодженні нервових клітин у специфічній зоні однієї з півкуль головного мозку;

серед них виділяють:

- а) прості – напади без порушення свідомості;
- б) складні – напади з порушеннями або зміною свідомості, обумовлені різними за локалізацією ділянками; вони часто переходять у генералізовані;
- в) вдруге генералізовані напади – початок нападу проявляється у вигляді судомного або безсудомного парціального нападу чи абсансу з подальшим двостороннім поширенням судомної рухової активності на всі групи м'язів;

2) первинно-генералізовані напади – двосторонні симетричні, без осередкових проявів у момент виникнення (на ЕЕГ відмічаються групи генералізованих комплексів пік-хвиля в усіх ділянках мозку);

серед них виділяють:

- а) абсанси – проявляються у короткочасному та глибокому потьмаренні свідомості, коли хворі застигають в одній позі; особа при цьому червоніє або блідне, очі її спрямовані в одну точку і не блимають; хворі не реагують на подразники та можуть випускати предмети з рук (тривалість такого нападу від 20 до 40 с, частота – від 5 до 10 разів на добу); про напади хворі нічого не пам'ятають (на ЕЕГ під час нападу реєструються комплекси пік-хвиля); найчастіше такі напади починаються у віці 4 – 5 років;

б) міоклонічні напади – характеризуються посмикуванням різних груп м'язів, вони частіше двосторонні, симетричні, поодинокі або множинні, мінливі за амплітудою (на ЕЕГ виділяються характерні періодичні генералізовані сплески активності, які включають нерегулярні спайки частотою 4 – 6 Гц та хвильову активність);

в) атонічні напади – характеризуються раптовою втратою тону однієї групи м'язів або всіх, внаслідок чого хворий раптово падає, втрачає свідомість (на ЕЕГ за генералізованою активністю комплексів пік-хвиля

спостерігається фаза дифузного зменшення активності); тривалість таких нападів 5 – 10 с;

г) тонічні напади – характеризуються різким напруженням всієї мускулатури (на ЕЕГ реєструється низьковольтна активність високої частоти); такі напади можуть спостерігатися уві сні;

д) клонічні напади – характеризуються короткими, неритмічними, сильними поштовхами усіх м'язів (на ЕЕГ реєструється повільна високовольтна активність в обох півкулях мозку); вони тривають від 2 – 3 до 5 хв;

е) тоніко-клонічні напади – характеризуються відключенням свідомості, тонічними судомами тулуба та кінцівок, посмикуванням тулуба та кінцівок (клонічні судоми) (на ЕЕГ виявляється високочастотна 10 Гц або більше низьковольтна активність під час тонічної фази, яка поступово змінюється на більш повільні та високі гострі хвилі у відведеннях потенціалів від обох півкуль);

є) епілептичний статус – це невідкладний медичний стан, впродовж якого спостерігаються великі тонічні напади, що постійно повторюються; при чому між ними хворий не приходить до свідомості; такий стан може загрожувати життю, тому хворий повинен перебувати під постійним медичним наглядом; триває епілептичний статус понад 30 хв.

1.1.4. Епілептиформна активність

ЕФА включає в себе різноманітні характерні прояви активності нейронів, що реєструються на ЕЕГ пацієнтів з епілепсією під час епілептичного нападу або в інтервалах між нападами (інтеріктальна активність). ЕФА реєструється тільки у 2 % пацієнтів, які не страждають на епілепсію, проте різні різновиди ЕФА фіксуються на ЕЕГ 50 – 90 % пацієнтів

з епілепсією в залежності від обставин проведення запису та тривалості виконаних досліджень. У переважній більшості пацієнтів з епілепсією епілептичний напад спостерігається приблизно раз на тиждень. Тривалість судом кортикального генезу становить 1 - 2 хв, тому електрографічні епілептичні напади при проведенні ЕЕГ у пацієнтів з епілепсією спостерігаються доволі рідко. Навпаки наявність інтеріктальної активності на ЕЕГ зустрічається часто і добре корелює з клінічними проявами епілепсії. Деякі різновиди інтеріктальної активності мають виразну морфологію і спостерігаються на ЕЕГ у більшості пацієнтів із судомними нападами, але рідко реєструються у пацієнтів з відсутністю типової для епілепсії клінічної симптоматики. Ці патерни включають спорадичні спайки, гострі хвилі і комплекси спайк-повільна хвиля.

ЕФА в експериментальних моделях епілепсії та епілептичних нападів має дуже схожі прояви активності, що реєструються як на анестезованих тваринах під час впливу проепілептичних сполук, так і на неанестезованих тваринах під час епілептичного нападу або в проміжні інтервали [22, 23]. Також з використанням експериментальних моделей *in vitro* було показано, що аплікація проепілептичних фармакологічних агентів призводило до тривалої ЕФА на ізольованих зрізах різних ділянок мозку [24]. *In vivo* та *in vitro* моделі ЕФА широко використовуються у дослідженнях механізмів епілептичних нападів, а також для тестування антиепілептичних препаратів.

1.2. Епілептичні напади в період раннього розвитку

Як було зазначено вище, перші роки життя людини пов'язані з особливо високим ризиком розвитку епілептичних нападів та епілепсії. Цей ризик знижується в пубертатний період і залишається відносно стабільним протягом дорослого життя [25]. Прояв, перебіг, прогноз і підходи до лікування

епілепсії та епілептичних нападів у дитячому віці істотно розрізняються від епілепсії, що спостерігається у дорослих. Тільки у дітей існують як доброякісні (можуть проходити самостійно), так і злоякісні (резистентні до терапії) форми захворювання. У період раннього постнатального розвитку часто спостерігаються клонічні судоми, які досить легко виявити, але деякі напади можуть мати набагато більш тонкі клінічні особливості. Доволі часто у немовлят можуть спостерігатися електрографічні напади без будь-яких чітких клінічних ознак. Це ускладнює діагностику епілепсії у період раннього розвитку.

1.2.1. Вплив епілептичних нападів на розвиток нервової системи

Неонатальний період життя являє собою час різких змін структури і функцій мозку. При народженні мозок дитини в чотири рази менший за розміром, ніж мозок дорослої людини. Протягом першого року життя мозок дитини набирає приблизно 70 % від розміру у дорослому віці (**Рис 1.4**). Це збільшення маси мозку протягом першого року життя є найбільш яскраво вираженим в мозочку, підкіркових ділянках, і корі головного мозку, яка збільшується в об'ємі до вражаючих 88 % [26].

За зовнішнім виглядом мозок дитини в загальних рисах нагадує мозок дорослого, хоча борозни виражені слабше, а деяких зовсім немає. Проте за своєю мікроскопічною будовою головний мозок у цей час є незрілим органом. Тканина мозку у новонароджених дуже багата на воду. Майже немає мієлінових оболонок нервових волокон. На розрізі сіра речовина мало розрізняється від білої. Ця особливість головного мозку мікроскопічно визначається до 4 - 5 років, коли він ще розвивається морфологічно.

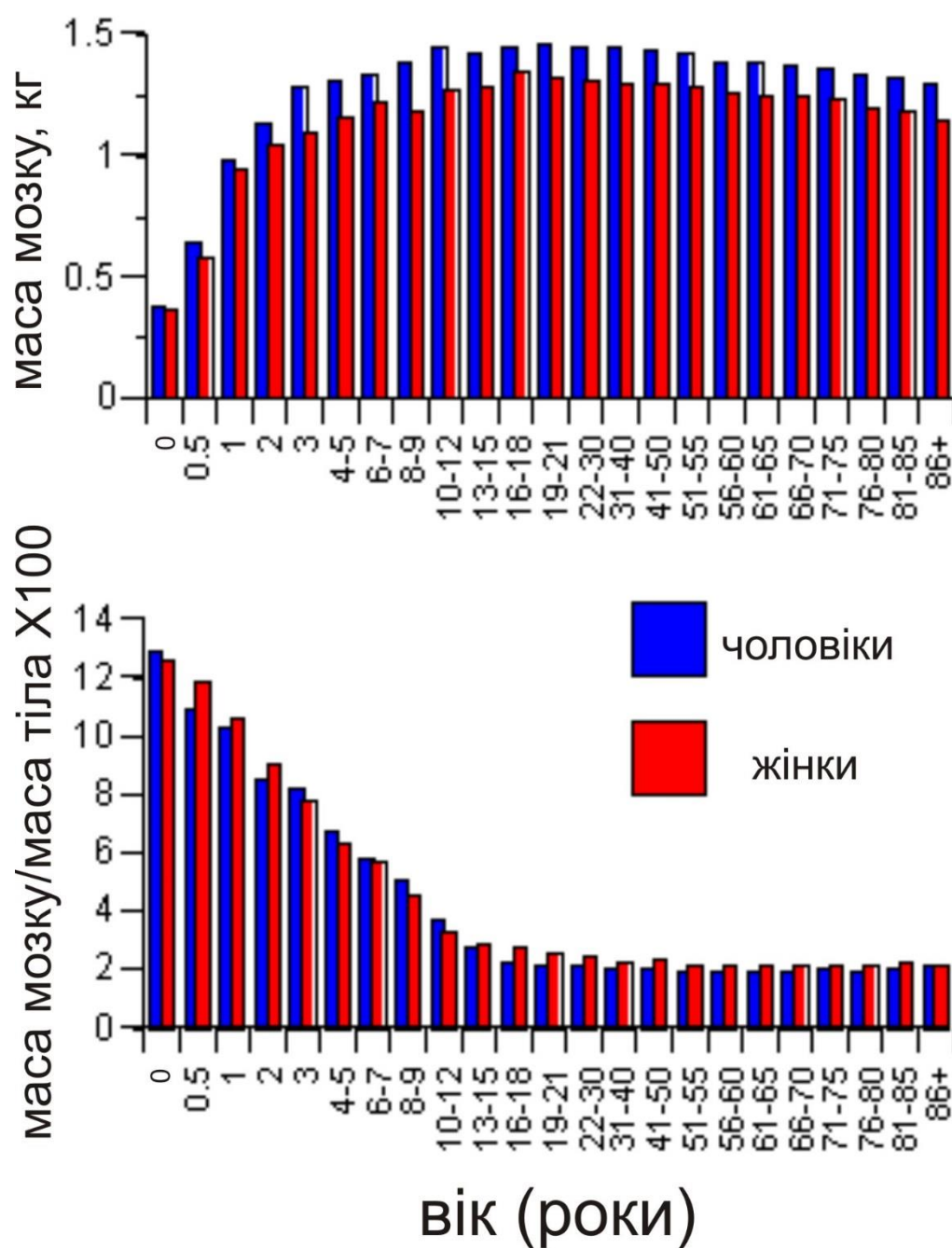


Рис. 1.4. Зміни у масі головного мозку та відношення маси мозку до маси тіла протягом життя людини [27].

Постнатальний розвиток нервових мереж кори головного мозку є багаторівневим процесом, у результаті якого відбувається формування зрілих

нейронів та ускладнення міжклітинних взаємодій, а також інтеграція нервових клітин у складні та високоорганізовані мережі.

Різноманітні внутрішні та зовнішні фактори мають істотний вплив на розвиток нервових мереж. Під впливом цих факторів протягом перших років життя відбуваються процеси організації та реорганізації нервових мереж. У перші 10 - 12 років життя людини найбільш інтенсивно протікають процеси мієлінізації нейронів. Кількість дендритних відростків фронтальних пірамідних нейронів подвоюється. Пірамідні нейрони глибоких шарів кори подвоюють свій об'єм протягом приблизно того ж періоду.

У період від народження до перших шести місяців життя кількість кортикальних синапсів зростає в десятки разів з приголомшливою швидкістю: у деяких ділянках кори до 100 000 нових синапсів утворюється за секунду [17]. Збільшення кількості синапсів та розвиток аксонів і дендритів досягає свого піку протягом перших двох років життя після чого настає період координації та упорядкування нервових мереж в залежності від внутрішніх та зовнішніх подразників.

Існує суттєва різниця у проміжку часу формування і розвитку збуджувальної та гальмівної систем мозку. В неонатальний період активація ГАМК-ергічної синаптичної передачі призводить до деполяризації клітинних мембран, і як результат, має парадоксальну збуджувальну дію в усіх структурах мозку різних видів тварин, включаючи ссавців [28]. Ці дані свідчать про те, що даний механізм був збережений протягом еволюції. У щурів, ГАМК має деполяризуючу дію протягом перших двох тижнів після народження, а у людини протягом двох перших триместрів. Незрілі нейрони розрізняються високою внутрішньоклітинною концентрацією іонів хлору, що призводить до його витоку з клітин замість притоку під час активації ГАМК-рецепторів [29, 30]. Нерівномірність розвитку збуджувальної та гальмівної систем мозку проявляється у особливостях зовнішньої поведінки дітей;

молодші школярі мало здатні стримувати свої дії, невгамовані, не можуть глибоко аналізувати інформацію, не концентрують увагу.

У процесі розвитку ЦНС відбувається поступове зниження мозкового об'єму сірої речовини разом із супутнім збільшенням мозкового об'єму білої речовини [31, 32]. Наприкінці дитинства і юності ці зміни переважають в лобовій і тім'яній областях [33, 34]. Вважається, що описані зміни є нейроанатомічним корелятом нормального когнітивного розвитку дитини [10, 35].

Як було зазначено вище, неонатальний період (інтервал з моменту народження до 28 діб життя) пов'язаний із значним ризиком появи епілептичних нападів та епілепсії, порівняно з будь-якими іншим періодом життя. Епілептичні напади у цей час найчастіше спостерігаються протягом першого тижня життя людини. Незрілий мозок є дуже сприйнятливим до судом і викликаних ними уражень. Така особлива сприйнятливість незрілого мозку до збудливості була продемонстрована з використанням різноманітних моделей ЕФА [36–40], і значною мірою полягає у дисбалансі роботи збуджувальної та гальмівної систем у період раннього розвитку. Відсутність ефективного гальмування ГАМК-ергічної синаптичної передачі, внаслідок затримки розвитку її функцій описаному вище, збільшує загальну збудливість і може сприяти підвищенню вірогідності синхронізації нервових мереж [40]. Затримка розвитку ГАМК_Б-рецептор-опосередкованого інгібування також сприяє збільшенню збудливості нейронів.

Підвищення збудливості у період раннього розвитку також залежить від змін у експресії різних субодиниць НМДА-рецепторів, що впливає на спад НМДА-опосередкованих збуджувальних постсинаптичних струмів. Так, у незрілих нейронах спад НМДА-опосередкованих збуджувальних постсинаптичних струмів значно повільніший, ніж в дорослих нейронах за рахунок значної експресії NR2B субодиниці порівняно з NR2A, яка

експресується в дорослих нейронах та забезпечує швидкий спад цих струмів [41].

Дитяча епілепсія є можливо, найстрашнішою та руйнівною формою епілепсії. Епілептичні напади в критичний період розвитку нервової системи більш шкідливі, ніж у будь-якому іншому віці. Неонатальні судоми часто призводять до розвитку хронічної епілепсії. Др. Легідо А та його колеги в своєму дослідженні показують, що у 33 % немовлят наявність ЕФА пов'язана зі смертністю, у 56 % немовлят спостерігаються повторні судоми, у 63 % - церебральний параліч, у 67 % - загальна затримка розвитку [42]. Інші дослідження загалом підтверджують ці дані [43, 44]

До 85 % дітей з епілепсією мають супутні захворювання. У переважній більшості вони представлені різноманітними когнітивними та поведінковими дефіцитами [45]. Такі неврологічні розлади та дефіцити, як депресія, біполярні розлади, тривога, obsесивно-компульсивний розлад, розлади настрою, дефіцит виконавчих функцій, поведінкові розлади, синдром дефіциту уваги і гіперактивності (СДУГ) та аутизм значно частіше спостерігаються у дітей з епілепсією, ніж в загальній популяції [46, 47]. У дослідженнях др. Девіса С і його колег 36 % дітей, які страждали на епілепсію, мали супутні психічні розлади у порівнянні з 11 % дітей з хронічним не-неврологічним захворюванням (цукровий діабет) і 9 % дітей контрольної популяції [48]. Добре відомо, що у дітей з епілепсією часто спостерігаються суттєві порушення пам'яті та здатності до навчання [49]. Такі фактори, як вік дитини, в якому спостерігався перший епілептичний напад, тривалість та частота нападів, доза застосованих протиепілептичних препаратів, як правило, істотно впливають на загальний рівень когнітивних порушень у дітей з епілепсією [11].

Клінічні дані вказують на те, що у дітей з діагнозом епілепсія спостерігаються гістопатологічні зміни в мозку [50]. Вони мають значне

уповільнення збільшення обсягу білої речовини мозку і значну різницю її об'єму в різних ділянках мозку порівняно з контрольною групою (**Рис 1.5**)[50]. Ці гістологічні зміни може бути підґрунтям психічних, когнітивних та поведінкових розладів, представлених у цій групі населення.

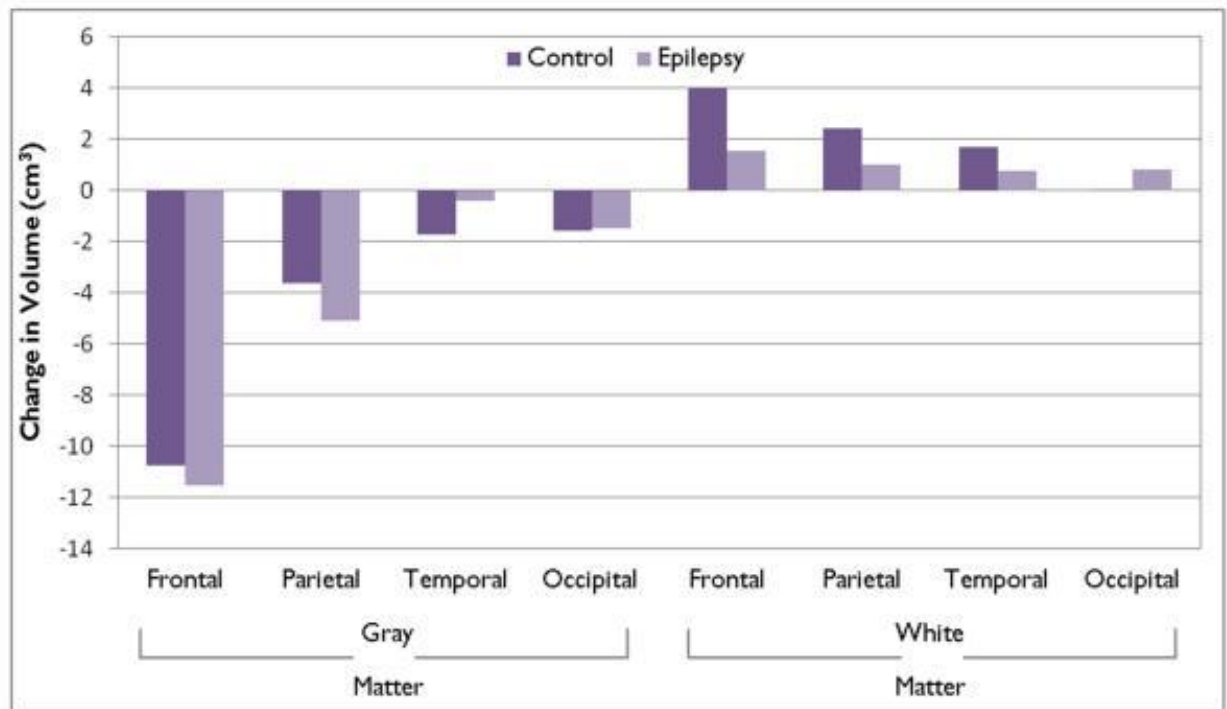


Рис. 1.5. Регіональний розподіл змін обсягу білої і сірої речовини в ЦНС контрольної групи дітей і дітей з діагнозом епілепсія [50].

Узагальнюючи наведені результати досліджень, можна зробити висновок, що діти з діагнозом епілепсія і епілептичними нападами у період раннього розвитку мають значно більший ризик виникнення супутніх захворювань, ніж діти з іншими хронічними хворобами. Питання, чи є цей ризик наслідком епілептичних нападів, або вони є результатом впливу фармакологічного втручання, чи можливо, супутніх захворювань у значній мірі залишається нез'ясованим. Проте дослідження на експериментальних

моделях епілепсії в період раннього розвитку, описані в наступних розділах, свідчать, що самі епілептичні напади, щонайменше частково, є відповідальними за дуже високий показник хронічних морфологічних, електрофізіологічних, когнітивних та поведінкових порушень в подальшому житті.

1.2.2. Експериментальні моделі епілепсії у вивченні наслідків епілептиформної активності.

В попередніх розділах зазначено, що, хоча більшість епілептичних нападів у дітей є доброякісними, численні дані переконливо свідчать, що повторювана або тривала ЕФА може суттєво впливати на розвиток нервової системи і спричиняти довгострокові негативні наслідки. Для вивчення таких негативних впливів епілептичних нападів у дитячому віці були розроблені різноманітні експериментальні моделі, які здатні моделювати епілептичні напади, спричинені різноманітними факторами.

1.2.2.1. Моделі епілептичних нападів, викликаних гіпоксією

Гіпоксично-ішемічні енцефалопатії (ГІЕ) є основною причиною епілептичних нападів у неонатальних період. Довготривалі та рефрактерні до антиепілептичних препаратів судоми виступають поширеним ускладненням (~30 %) у дітей з діагнозом ГІЕ [51]. Наслідками ГІЕ можуть бути різноманітні хронічні неврологічні захворювання, в тому числі психічна відсталість, дитячий церебральний параліч, нездатність до навчання, епілепсія [51–53]. Для вивчення механізмів і наслідків епілептичних нападів, спричинених гіпоксичним та гіпоксично-ішемічним ушкодженнями головного мозку, були розроблені різні експериментальні моделі [54–57].

Гарним прикладом моделі неонатальних судом, пов'язаних з перинатальним гіпоксичним ураженням, є експериментальна модель глобальної церебральної гіпоксії [38]. Короткотривале часткове заміщення кисню на азот в повітрі експериментальної камери призводить до тоніко-клонічних епілептичних нападів у досліджуваних тварин. Епілептичні напади, спричинені гіпоксією, є рефрактерними до класичних антиепілептичних препаратів і викликають хронічне підвищення збудливості нервових мереж [58, 59]. Серед інших наслідків судомних нападів, викликаних глобальною церебральною гіпоксією, можна також виділити лактат-ацидоз [60] і зміни в експресії GLUR2 мРНК [61]. Нещодавні дослідження продемонстрували зниження частки «silent» синапсів через 48 - 72 год після епілептичних нападів, спричинених гіпоксією, в зоні CA1 гіпокампа, про що свідчить збільшення співвідношення частот АМПА спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (сЗПСС) до НМДА ЗПСС [62]. Також в зоні CA1 гіпокампа, було виявлено зниження частки синапсів, які містять тільки НМДА-рецептори і збільшення частки синапсів, які містять АМПА- і НМДА-рецептори разом [62]. Відмічалось зниження довготривалої посттетаничної потенціації в гіпокампі щурів з історією епілептичних нападів спричинених гіпоксією. Використання поведінкових тестів дозволило виявити, що епілептичні напади, спричинені гіпоксією в неонатальний період, викликали хронічні порушення просторової пам'яті у досліджуваних тварин [63].

Серед інших експериментальних моделей ішемії-гіпоксії в неонатальний період слід виділити модель унілатеральної оклюзії сонної артерії (УОСА), і модель, де УОСА була скомбінована з глобальною церебральною гіпоксією. З використанням моделі УОСА/глобальна церебральна гіпоксія неонатальні тоніко-клонічні напади викликали у 70 - 80 % щурів [64]. Встановлено, що перманентна перев'язка правої сонної артерії у семиденних щурів призводила до аномального розростання аксонів

гранулярних нейронів зубчастої звивини та розвитку хронічної епілепсії у тварин [65].

1.2.2.2. Моделі фебрильних нападів.

Фебрильні (гарячкові) епілептичні напади є одними з найкращих прикладів підвищеної сприйнятливості незрілого мозку до судом. Лихоманка, яка рідко призводить до судом у дорослих, спричиняє судоми у 2 - 4 % дітей у всьому світі, і є найбільш поширеним типом нападів в період раннього розвитку [2]. Хоча фебрильні судоми, як правило, цілком доброякісні, діти з історією фебрильних судом мають в п'ять разів більшу вірогідність розвитку фебрильних судом в майбутньому житті. Також встановлено, що тривалі фебрильні судоми можуть призвести до розвитку скроневої епілепсії [66, 67]. Тим не менш, значною мірою залишається не з'ясованим питання, чи є тривалі гарячкові напади самі по собі причиною розвитку скроневої епілепсії або лише грають роль маркера інших провокуючих факторів, таких як генетична схильність [68].

Для вивчення наслідків фебрильних нападів використовують експериментальні моделі, де судомні напади у гризунів викликаються гіпертермією [69–71]. Було показано, що експериментальні тривалі гарячкові напади не призводять до загибелі нейронів в гіпокампі і мигдалині. У роботах доктора Бендера Р і його колег мітили уразливі до пошкоджень групи клітин, такі як моховиті клітини і специфічні інтернейрони [72], і спостерігали за їх реакцією на фебрильні судоми. Було встановлено, що фебрильні напади не спричиняють зниження чисельності цих клітин. Інші дослідження показали, що швидкість нейрогенезу в гіпокампі експериментальних тварин з історією фебрильних нападів не була змінена. Проте, було встановлено, що довготривалі напади, спричинені гіпертермією, викликали довготривале

підвищення збудливості гіпокампа та у деяких щурів призводили до розвитку хронічної епілепсії [56]. Ці вражаючі хронічні зміни не супроводжувалися втратою клітин, тому можуть вважатися наслідком самих нападів, а не супутніх нейродегенеративних процесів.

З використанням електрофізіологічних і молекулярних досліджень показано, що протягом кількох годин після фебрильних нападів відбувається зниження експресії GluR2 і утворення пов'язаних з АМПА-рецепторами каналів проникних для кальцію [73]. Також було встановлено, що через кілька діб після нападів відбуваються зміни експресії іонних каналів. Так, наприклад, було встановлено, що фебрильні напади викликають хронічні зміни кінетичних характеристик HCN каналів [74]. Ці спостереження, принаймні частково, пояснюють молекулярні механізми, що можуть лежати в основі підвищеної збудливості нервової тканини після тривалих фебрильних судом.

1.2.2.3. Моделі епілептичного статусу

Епілептичний статус (ЕС) є небезпечним для життя надзвичайним станом, що характеризується тривалими безперервними судомами. Пацієнти з ЕС потребують невідкладної медичної допомоги, через загрозу спричиненого ЕС пошкодження мозку і навіть смерті. Щорічна захворюваність на судомну форму ЕС серед дітей в розвинених країнах становить близько 20 осіб на 100 000 населення. Найбільш вразливим віком для появи ЕС є вік < 1 року (51 особа на 100 000 на рік) у порівнянні з віком 1 - 4 років (29 осіб на 100 000 на рік), 5 - 9 років (від 9 осіб на 100 000 на рік) і 10 - 15 років (2 особи на 100 000 на рік) [75]. Окрім високої смертності серед несприятливих наслідків ЕС можна відзначити когнітивні порушення, хронічні неврологічні дефіцити і розвиток епілепсії.

Для дослідження механізмів ЕС і підходів до його контролю були розроблені різноманітні експериментальні моделі, що імітують ЕС (Табл. 1.1). ЕС може бути викликаним як фармакологічними агентами, так і електричною стимуляцією у тварин.

Таблиця 1.1.

Класифікація експериментальних моделей ЕС

Класифікація	Модель	Посилання
Електричні Моделі	Стимуляція перфорантних шляхів	[76][77, 78]
	«Self-sustaining» стимуляція	[79][80]
Фармакологічні моделі <i>in vivo</i>	Каїнова кислота	[81–84]
	Пілокарпін	[85]
	Літій-пілокарпін	[86, 87]
	Органофосфати	[88]
	Флуротил	[89]
Фармакологічні моделі <i>in vitro</i>	Низький магній у зрізах мозку	[24, 90, 91]
	4-амінопіридин у зрізах мозку	[92]
	Високий калій у зрізах мозку	[93–95]
	Блокатори ГАМК _A -рецепторів у зрізах мозку	[96, 97]

	Органотипічна культура зрізів мозку	[98]
--	--	------

Дослідження на експериментальних моделях скроневої епілепсії, спричиненої ЕС, показали, що патофізіологічні наслідки ЕС для незрілого та зрілого мозку мають суттєві відмінності [99]. У дорослих тварин, епілептичний статус викликає значну загибель нейронів у зонах СА1 і СА3 гіпокампа та зубчастій звивині [100]. Тривалі судоми у дорослих тварин також призводять до синаптичної реорганізації з аномальним розростанням моховитих волокон (аксонів нейронів зубчастої звивини) у супрагранулярну зону зубчастої звивини та в інфрапірамідну ділянку зони СА3 [101, 102]. Розростання аксонів та формування нових синапсів відбуваються і в інших ділянках мозку, зокрема в зоні СА1 гіпокампа, де новоутворені синапси в пірамідних нейронах призводять до збільшення частоти глутаматергічної спонтанної синаптичної передачі та формування нових «aberrant» синапсів [103, 104]. Крім того, ЕС у дорослих щурів призводить до хронічного дефіциту оперативної пам'яті, когнітивних та поведінкових розладів [76, 105, 106].

На відміну від цього, молоді тварини у віці менш ніж два тижні від народження є менш уразливими до загибелі клітин гіпокампа після тривалого нападу, ніж дорослі тварини [107–109]. Реактивна пластичність моховитих волокон, яка є відмінною рисою скроневої епілепсії, також менш виразна у молодих тварин [110, 111]. Хоча гіпокамп після тривалих судом залишається у значній мірі не ушкодженим, загибель клітин після ЕС була встановлена в інших ділянках ЦНС [112]. Цікаво, що незрілий мозок має слабку сприйнятливості до ушкоджень не тільки відносно епілептичних нападів. Незрілі нейрони гіпокампа є менш чутливими до ішемічних інсультів і здатні

реагувати на стимуляцію синаптичною відповіддю в безкисневому середовищі більш тривалий час, ніж нейрони дорослих тварин [113].

У науковій літературі описано різноманітні фактори, які сприяють розумінню молекулярних механізмів низької сприйнятливості до ушкоджень незрілого мозку [99]. Так було показано, що незрілий мозок є менш уразливим до токсичного ефекту глутамату, ніж зрілий мозок [114–116]. Така несприйнятливість до ураження, ймовірно, є результатом зниженого потрапляння іонів кальцію у клітини, меншою щільністю активних синапсів, більш низькими витратами енергії, і відносною незрілістю біохімічних каскадів, які призводять до загибелі клітин після ушкоджень ЦНС. Серед додаткових захисних факторів слід також виділити високу концентрацію мозкового нейротрофічного фактора у мозку новонароджених [117], знижену експресію запальних цитокінів, пов'язану з нападами [118]. Більш ефективно підтримання синтезу ГАМК під час епілептичного статусу спостерігається у незрілому мозку, порівняно з мозком дорослих щурів [119]. Неонатальні судоми, також спричиняють менший окислювальний стрес порівняно з судомами в дорослому віці [120]. Була висунута гіпотеза, що за рахунок багатого на жир материнського молока, в мозку новонароджених утворюються високі концентрації мітохондріального білка (UCP2), який забезпечує зниження утворення активних форм кисню і захищає мітохондрії від викликаного епілептичними нападами ушкодження [121].

Вплив епілептичного статусу на поведінку також пов'язаний з віком тварини на момент нападу. Дорослі тварини, які зазнали ЕС, мають суттєві зрушення у процесах навчання, пам'яті та поведінки; у той час як молоді щури (до двотижневого віку) після епілептичного статусу мають менш когнітивних та поведінкових дефіцитів [106].

Спонтанні судоми після епілептичного статусу з більшою вірогідністю розвиваються у дорослих тварин, ніж у молодих [122].

Різноманітні зміни в експресії глутаматних та ГАМК-ергічних рецепторів після ЕС були описані на експериментальних моделях дитячої епілепсії [123]. Доведено, що експресія мРНК глутаматного рецептора 2 та концентрації протеїнів зменшується у зубчастій звивині після ЕС, спричиненого ін'єкцією пілокарпіну, і в корі головного мозку та гіпокампі після гіпоксії, викликаной епілептичними нападами у молодих щурів [61, 123]. Експресія протеїну-носія збуджувальних амінокислот 1 збільшувалась у зубчастій звивині після ЕС [123]. Професор Занг Г з колегами [124] продемонстрували, що ЕС у молодих щурів призводив до збільшення експресії $\alpha 1$ субодиниці ГАМК-рецептора. Цікаво, що у дорослих щурів ЕС викликав протилежні зміни $\alpha 1$ субодиниці ГАМК-рецептора [125, 126].

Отже, численні дослідження продемонстрували, що тривалі напади в період раннього розвитку призводять до набагато меншого ушкодження мозку, ніж напади подібної тривалості в дорослому віці. Знижена загибель клітин, ймовірно, є наслідком зниженої уразливості незрілих нейронів до викликаной глутаматом токсичності. Тим не менш, відсутність значної загибелі клітин після епілептичного статусу не означає, що тривалі напади не впливають на розвиток нервової системи. Зміни в експресії та конфігурації субодиниць глутаматних- і ГАМК-рецепторів, реорганізація синаптичних зв'язків є тільки деякими наслідками тривалих епілептичних судом у ранньому дитинстві і завдання вчених полягає у визначенні, які з цих змін є шкідливими для функціонування мозку і можуть призвести до хронічних поведінкових та когнітивних розладів і розвитку набутої епілепсії в подальшому житті.

1.2.2.4. Флуротилова модель неонатальних судомних нападів

Повторювані судомні напади у дітей, як і тривалі напади, також можуть спричиняти довготривалі негативні впливи і бути шкідливими для незрілого мозку [44, 127]. Нещодавні дослідження показали, що повторювані напади в період раннього розвитку можуть призвести до довгострокових морфологічних та поведінкових змін [128–130]. Повторювані неонатальні судоми, спровоковані у щурів інгаляцією флуротилу (ФТ) з першого по п'яту добу після народження, викликали погіршення візуальної просторової пам'яті у щурів при проведенні поведінкового тесту «водний лабіринт Морріса» в дорослому віці [8]. Також було показано, що повторювані напади, викликані ФТ у тварин з 15-ї по 20-у добу після народження, спричиняли хронічні порушення слухової дискримінації [131]. Хоча в дослідженнях на статевонезрілих щурах загибель клітин після повторюваних неонатальних нападів не була виявлена, було показано, що такі напади можуть негативно впливати на нейрогенез [132]. Так, повторювані судомні напади під час раннього розвитку призводять до значного зменшення кількості новоутворених гранульованих клітин в зубчастій звивині порівняно з контрольними тваринами. Цікаво, що судомні напади, викликані ФТ у дорослих щурів, призводили до протилежного ефекту на нейрогенез у цій ділянці мозку. Було показано, що після серії з 25-ти, спровокованих ФТ, епілептичних нападів спостерігалось значне збільшення новоутворених гранульованих клітин порівняно з контрольною групою тварин. Морфологічні, поведінкові та фізіологічні зміни у щурів з історією спровокованих інгаляцією ФТ неонатальних нападів відбувались на фоні відсутності помітної загибелі клітин мозку [133].

На молекулярному рівні неонатальні судоми призводили до значного зниження експресії ГАМК-рецепторів [134] і підвищення експресії GluR1- та

НМДА-рецепторів [135], що свідчить про суттєві зміни балансу збудження і гальмування в гіпокампі у тварин з історією судом в період раннього розвитку. Також після повторюваних нападів спостерігалася істотна реорганізація аксонів гранулярних клітин зубчастої звивини [8, 128, 129]. Цікаво, що реорганізація аксонів гранулярних клітин зубчастої звивини спостерігалася як після ФТ судом у неонатальний період, так і після, спровокованих інгаляцією ФТ, судом у дорослих щурів. Як і в разі ЕС, у дорослих тварин проростання моховитих волокон в супрагранулярну зону зубчастої звивини та в інфрапірамідну ділянку зони СА3 гіпокампа може бути поясненим спровокованою нападами загибеллю клітин в зоні СА3 та зубчастій звивини [101, 102]. Оскільки проростання аксонів, спровоковане повторюваними нападами в неонатальний період, відбувається за відсутності загибелі клітин, було висунуто припущення, що воно є результатом хронічного підвищення збудливості нервових мереж.

На рівні поведінки, щури з історією неонатальних нападів мали хронічні порушення візуальної просторової пам'яті у тесті «водний лабіринт Морріса» [136] і робили більшу кількість референсних помилок у радіальному лабіринті [137], що вказує на дефіцит оперативної пам'яті. Було доведено, що неонатальні напади впливають на так звані «клітини місця» в гіпокампі, які, як вважають вчені, відіграють фундаментальну роль у просторовому орієнтуванні [137]. Зовсім недавно в нашій лабораторії були описані спричинені неонатальними нападами поведінкові та когнітивні дефіцити, які можуть залежати від змін у функціонуванні фронтальної кори неокортекса. У тварин з історією судомних нападів під час раннього розвитку спостерігались порушення оперативної пам'яті та дефіцит поведінкової гнучкості, що може свідчити про те, що повторювані неонатальні судомні напади можуть спричиняти негативний вплив на більш широке коло пізнавальних здібностей, ніж це вважалося раніше [138, 139].

1.3. Сучасні уявлення про епілептогенез та скроневу епілепсію

1.3.1. Причини розвитку набутої епілепсії

Приблизно в 30 – 40 % усіх випадків, причини розвитку епілепсії відомі. Різноманітні ушкодження головного мозку, черепномозкові травми (ЧМТ), ішемічні інсульти, внутрішньомозкові крововиливи, інфекції, пухлини, коркова дисплазія, деякі нейродегенеративні захворювання, симптоматичні епілептичні напади, такі як складні фебрильні судоми або ЕС [140] можуть призвести до розвитку набутої епілепсії. Незважаючи на велику різноманітність етіології, загальною ознакою епілептичних розладів є пароксизмальна збудливість нервової системи, яка здатна відтворювати схожі патологічні особливості, що, в кінцевому рахунку, були визначені клінічно як епілептичне захворювання. Період часу від ушкодження головного мозку відомого генезу до появи першого неспровокованого епілептичного нападу називається **епілептогенезом**.



Рис. 1.6. Стадії розвитку медіальної скроневої епілепсії, спровокованої ЕС або фебрильними нападами.

Під час епілептогенезу нормальна мозкова тканина перетворюється на тканину, здатну генерувати спонтанні епілептичні напади. Тривалість епілептогенезу значно варіює та може становити від кількох діб та кількох тижнів (у тварин) до тижнів та десятків років (у людей) [141]. Різноманітні

патологічні процеси були описані в тканині пацієнтів з епілепсією, отриманої після хірургічної резекції епілептичного вогнища, і в головному мозку тварин з експериментально викликаною скроневою епілепсією, під час гострої, латентної (епілептогенез) та хронічній стадії цього захворювання (**Рис. 1.6**) [142]. Було встановлено, що впродовж епілептогенезу поступово збільшується збудливість нервової тканини за рахунок комплексних молекулярних та структурних змін у нервових мережах, які з рештою призводять до появи спонтанних епілептичних нападів. Ці дані дозволили припустити, що перехід від епілептогенезу до фази хронічної епілепсії не є ступінчастим процесом [143]. На підтримку цієї гіпотези недавні дослідження з використанням тривалого відео–ЕЕГ моніторингу показали, що процес розвитку набутої епілепсії є сигмовидною функцією часу [144]: після появи першого спонтанного епілептичного нападу це захворювання продовжує прогресувати.

Найбільш вивченими прикладами епілептогенезу у дорослих є розвиток набутої епілепсії внаслідок ЧМТ, інсульту та епілептичного статусу. Було показано, що після помірної або важкої ЧМТ у майже 25 % випадків спостерігаються гострі ранні напади [145], а хронічна епілепсія розвивається у 10 – 25 % випадках [141, 146]. У 11 % випадків розвиток набутої епілепсії у дорослих пов'язаний із судомами після інсульту. Доведено, що перебіг епілепсії корелює з тяжкістю та розміром інсульту [147]. Серед дорослих у близько 25 % хворих вперше діагностована епілепсія проявляється епілептичним статусом. Розвиток епілепсії також може відбуватися у період раннього постнатального розвитку та у ранньому дитинстві. Було показано, що у майже 30 % дітей неонатальні судоми призводять до розвитку епілепсії в подальшому житті [4]. Також, встановлена кореляція між тривалими складними фебрильними нападами в період раннього постнатального розвитку та розвитком когнітивних порушень та епілепсії надалі у житті [148].

1.3.2. Моделі скроневої епілепсії у вивченні механізмів епілептогенезу.

Для вивчення розвитку набутої епілепсії були розроблені різноманітні експериментальні моделі, в яких ушкодження мозку різного генезу, такі як ЧМТ, ішемія, гіпертермія, епілептичний статус призводили до розвитку набутої епілепсії. Серед них кіндлінгова модель та модель епілептичного статусу, викликана хімічним або електричним подразненням, є найбільш поширеними та рекомендованими Інтернаціональною Лігою по Боротьбі з Епілепсією експериментальними моделями для вивчення епілептогенезу, а також тестування сполук розроблених для запобігання розвитку набутої епілепсії. Ці моделі є моделями скроневої епілепсії, найбільш поширеної форми фокальної епілепсії у дорослих.

Скронева епілепсія характеризується епілептичними нападами локалізованими в скроневій ділянці головного мозку [149]. Ця форма епілепсії є часто резистентною до антиепілептичних препаратів, і майже завжди пов'язана з порушенням когнітивних та поведінкових функції у пацієнтів. Основними особливостями скроневої епілепсії зі склерозом гіпокампа є: а) втрата пірамідних нейронів та інтернейронів в гіпокампі, б) зміни складу або експресії рецепторів і каналів, які обумовлюють хронічні зміни збудливості нейронних мереж; в) структурні адаптивні реакції, такі як проростання аксонів і нейрогенез; г) гліоз, у тому числі зміни у функціонуванні гліальних клітин; д) дисфункція ГЕБ; е) нейрозапалення; є) хронічні когнітивні та поведінкові розлади. Всі ці особливості були описані у пацієнтів, які страждали на фармакорезистентну форму скроневої епілепсії [150–152], а також були продемонстровані на її експериментальних моделях [102, 143, 153, 154].

1.3.3. Патофізіологія розвитку скроневої епілепсії.

1.3.3.1. Загибель нейронів і гліоз

Як зазначалось вище, первинне ураження, що є пусковим гачком епілептогенезу, часто призводить до гістопатологічних змін в мозку. Найбільш поширеною гістопатологічною особливістю скроневої епілепсії є втрата нейронів, розташованих в зоні зубчастої звивини, також відомих як "моховиті клітини". До інших поширених гістопатологічних змін відноситься склероз зон CA1-3 гіпокампа, який характеризується втратою пірамідних нейронів і гліозом в зоні CA1, в секторі Sommer, а також в зоні CA3b гіпокампа. Найчастіше у пацієнтів зі скроневою епілепсією спостерігаються двосторонні та асиметричні зміни в гіпокампі, оскільки один гіпокамп найчастіше є більш пошкодженим, ніж інший [155]. Гістопатологічні зміни також були описані в енторінальній корі та мигдалині пацієнтів з медіальною формою скроневої епілепсії [156], а також в інших відділах мозку [157–159]. Характер та ступінь нейронного пошкодження у пацієнтів з цією формою епілепсії може бути вельми неоднорідним [160].

В експериментальних моделях скроневої епілепсії, заснованих на хімічній або електричній індукції епілептичного статусу, спостерігається пошкодження нейронів у відповідних зонах скроневої ділянки та в інших відділах головного мозку, яке значною мірою залежить від протоколу дослідження: 1) моделі епілепсії, застосованої концентрації хемоконвульсанта та шляху його введення (наприклад, внутрішньочеревинно або внутрішньочеребрально); 2) часу та тяжкості ЕС; 3) застосування фармакологічних агентів (наприклад, діазепаму) для припинення повторюваних судом, і багатьох інших змінних (наприклад, вік або лінія тварин) [161].

Кінділінгова модель є однією з найстаріших та найвивченіших експериментальних моделей скроневої епілепсії. Явище кіндлінгу, полягає в тому, що повторювана електрична стимуляція однієї з ділянок головного мозку в решті решт призводить до зниження порогу виникнення епілептичних судом у відповідь на електричну стимуляцію. Зазвичай така стимуляція не призводить до розвитку спонтанних епілептичних нападів [162, 163]. Характерною ознакою кіндінгової моделі є відсутність або несуттєве пошкодження нейронів порівняно з моделями скроневої епілепсії, спровокованими ЕС. Однак, гістопатологічні дані свідчать про те, що навіть поодинокий епілептичний напад, спровокований електричною стимуляцією у дорослих щурів, може призвести до загибелі нейронів ЦНС [164]. Показано, що повторювана електрична стимуляція перфорантних шляхів у анестезованих тварин викликає значну загибель нейронів у зубчастій звивині і, в меншій мірі, в зонах СА3 і СА1 гіпокампа [78]. В експериментальних моделях скроневої епілепсії спричиненої ЕС, індукованим ін'єкцією проепілептичних сполук (пілокарпіну, каїнової кислоти) загибель нейронів спосерігається і в інших відділах головного мозку [165, 166]. ЕС, спричинений ін'єкцією каїнової кислоти, викликає значну загибель нейронів в наступних ділянках мозку: гіпокампі, мигдалині, грушоподібній корі, енторінальній корі, таламусі. Пошкодження гіпокампа в цій моделі ЕС включає пірамідні нейрони зон СА1 і СА3 та нейрони зубчастої звивини [167]. В дослідженнях з використанням пілокарпінової моделі ЕС виявлена загибель клітин нюхової кори, мигдалини, мигдалеподібного комплексу, таламуса, кори головного мозку, гіпокампа і чорної субстанції [85]. Як зазначалось вище, втрата інтернейронів та моховитих клітин хілусу зубчастої звивини є відмінною рисою ЕС [168]. Було припущено, що спровокована нападами загибель цих нейронів може лежати в основі розгальмування аферентних шляхів, що

приходять до гіпокампа, і, таким чином, відігравати важливу роль в патофізіології скроневої епілепсії [77].

Ще однією гістопатологічною ознакою епілептичної тканини є гліоз. Відомо, що активація мікроглії та астроцитів протягом ЕС призводить до збільшення інтерлейкіну 1 бета [169]. Крім того, др. Янг Т і колеги показали, що суттєві та хронічні зміни морфології астроцитів призводять до тривалих підвищень рівня інтерлейкіну 1 бета, аденозинкінази та посиленню активності цитокінів. Було встановлено, що всі ці фактори залучені в склероз гіпокампа при скроневій епілепсії [170–174]. Активація астроцитів в межах епілептогенезу також призводить до зниження експресії Kir4.1, локальної втрати AQP4 на «ніжках» астроцитів, а також дисфункції “gap junction”, що може бути підґрунтям погіршення гомеостазу води і K^+ та хронічного підвищення збудливості нейронів в епілептичній тканині [175].

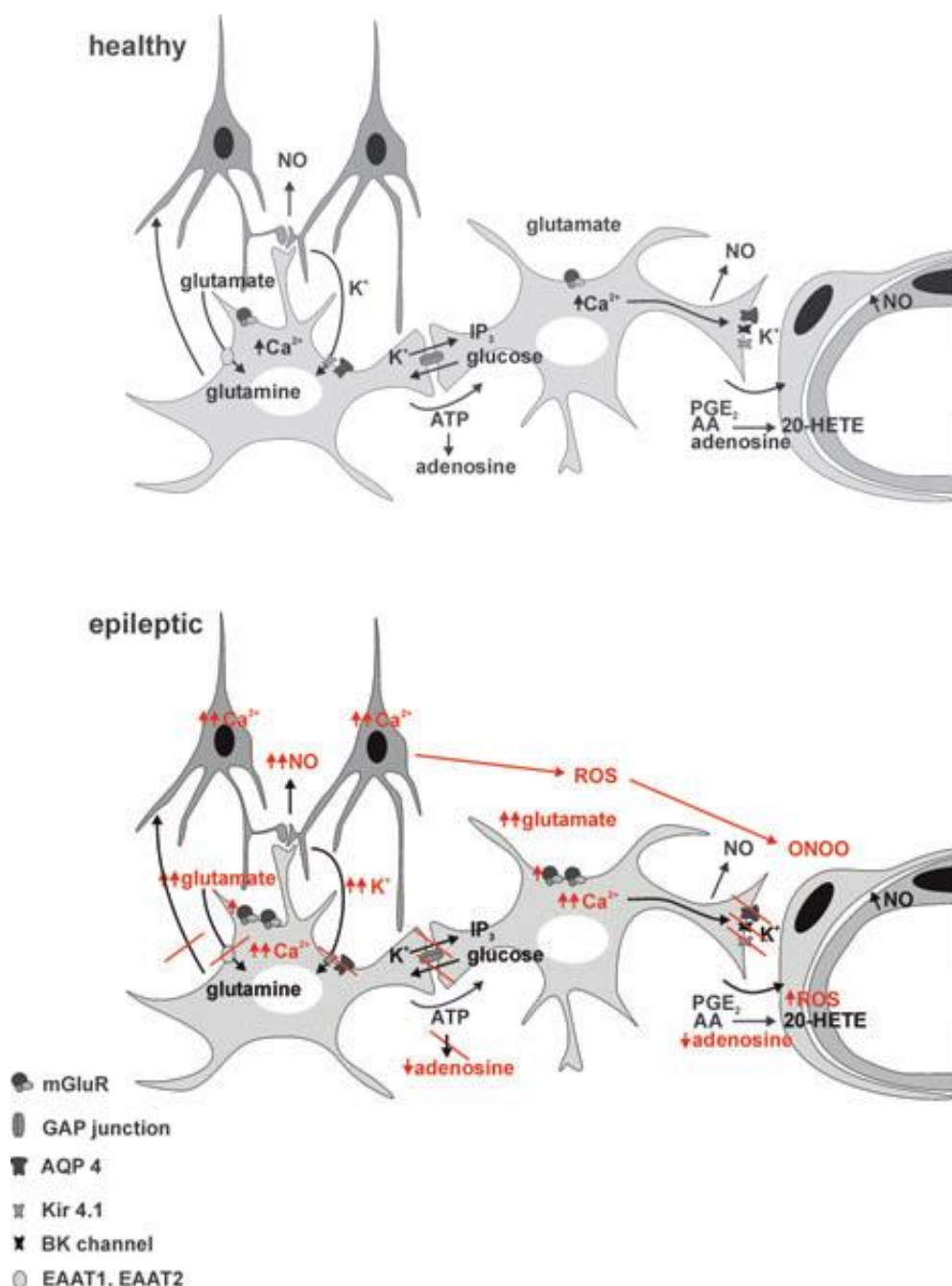


Рис. 1.7. Зміни функціональних властивостей активованих астроцитів в епілептичній тканини. Здатність астроцитів акумулювати іони калію забезпечується калієвими каналами Kir4.1, AQP4 і коннексінами 43 і 30. Зниження експресії Kir4.1, локальна втрата AQP4 на «ніжках» астроцитів, а також дисфункція “gap junction” призводить до погіршення гомеостазу води і іонів калію та підвищення збудливості нейронів. Це в свою

чергу приводить до порушення калій-залежних механізмів між судинами і нейронами. Дисфункція “gap junction” в астроцитах призводить до порушення переносу метаболічних субстратів, таким чином поглиблює порушення процесів метаболічного відтворення втрати енергії внаслідок епілептичних нападів. Зниження експресії транспортерів глутамату і глутамінсінтетази може призводити до підвищення рівня зовнішньоклітинного глутамату і зниження ефективності гальмівних синапсів[175].

1.3.3.2. Проростання аксонів моховитих клітин

Пошкодження нейронів та гліоз можуть призводити до структурних змін в організації нервових мереж. Реорганізація синаптичних мереж в гіпокампі після первинного ушкодження була вивчена на експериментальних моделях скроневої епілепсії, та описана в нервовій тканині пацієнтів з цією формою епілепсії [169, 176–179]. Загибель великої кількості моховитих клітин в зубчастій звивині і їх просторове зміщення може призвести до гістопатологічного проростання аксонів цих клітин, і, як наслідок, опосередковувати аномальні збуджуючі зв'язки в зубчастій звивині та в зоні СА3 гіпокампа створюючи патологічний збуджувальний контур зворотного зв'язку [180] (**Рис. 1.8**). Показано, що новоутворені аномальні зв'язки мають високу ймовірність активації за рахунок збільшення кількості АМПА-рецепторів в «старих» синапсах та калієвих-рецепторів в «нових» рецепторах [104, 181]. Експериментальні дослідження показали, що дисбаланс роботи збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі між зубчастою звивиною та гіпокампом в результаті навіть незначного збільшення кількості

збуджувальних колатералей може бути достатньою умовою хронічного підвищення збудливості нейронів в цій ділянці ЦНС [180].

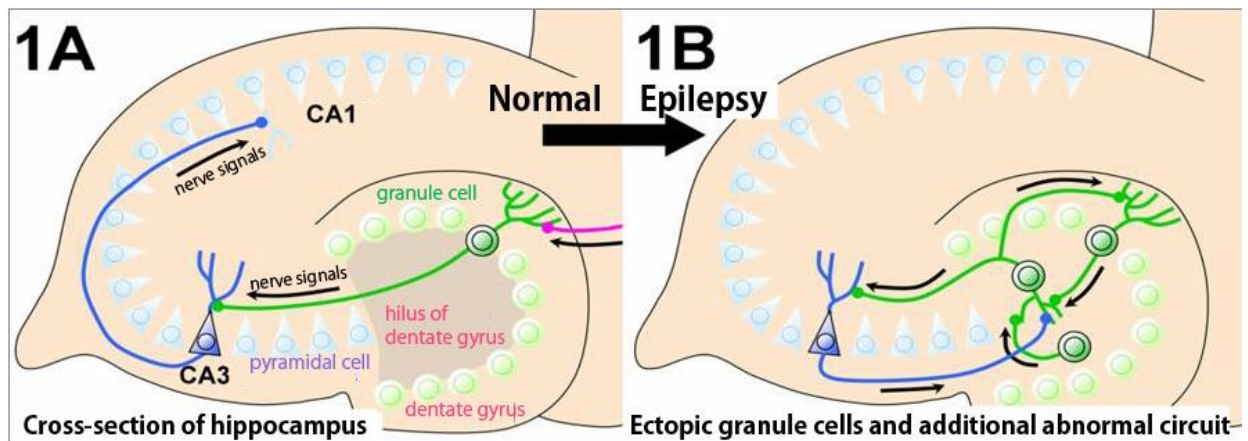


Рис. 1.8. Утворення аномальних нейронних ланцюгів в гіпокампі в експериментальній моделі скроневої епілепсії. Зліва: зріз гіпокампа контрольного щура. Гранулярні клітини утворюють щільний шар в зубчастій звивині гіпокампа (ГК, зелений). ГК отримують нервові входи через дендрити на зовнішній стороні зубчастої звивини, які звідки передаються за допомогою довгих аксонів в зону СА3 гіпокампа. Пірамідні клітини зони СА3 передають сигнал в зону СА1 гіпокампа (чорні стрілки). Справа: гіпокамп епілептичного щура. Аксони зміщених ГК (ectopic granule cells) передають сигнали на клітини зони СА3, на сусідні зміщені ГК і на дендрити ГК розташовані у зовнішньому шарі зубчастої звивини. Пірамідні нейрони зони СА3 утворюють додатковий аномальний ланцюг шляхом іннервації ГК.

1.3.3.3. Нейрогенез

Нейрогенез – це процес розвитку, який включає проліферацію, міграцію і диференціювання нейробластів та синаптичну інтеграцію новоутворених нейронів в існуючі нервові мережі [182]. Доведено, що в дорослому віці нейрогенез відбувається в субвентрікулярній зоні передніх бічних шлуночків та субгранулярній зоні зубчастої звивини в гіпокампі [183, 184]. Різноманітні фактори можуть регулювати нейрогенез в зубчастій звивині в дорослому віці (такі, наприклад, як старіння, стрес, фізичні вправи, фактори росту, нейромедіатори, гормони). Була виявлена залежність нейрогенезу в цій ділянці мозку від судомної активності. Значне збільшення нейрогенезу відбувається в гіпокампі людини [185–187] та у тварин після епілептичних нападів, викликаних «кіндлінгом» [164] або електричною стимуляцією [188], та після ЕС, спровокованому ін'єкціями пілокарпіну [189] або каїнової кислоти [190]. Також було встановлено, що епілептичні напади можуть впливати на міграцію новоутворених клітин, що призводить до появи ектопічних гранулярних клітин. Як зазначалось вище, новоутворені клітини аномально інтегруються в мережу зубчаста звивина - СА3 [191], встановлюють аферентні зв'язки з аксонами моховитих клітин [192], і є здатними до спонтанної генерації потенціалів дії [191], отже, можуть сприяти підвищенню загальної збудливості нервової мережі.

1.3.3.4. Внутрішньоклітинний кальцій і окислювальний стрес

Тільки нещодавно була визнана роль окислювального стресу у регуляції активності збудливих тканин. Підвищення збудливості клітин може призводити до збільшення вмісту внутрішньоклітинного кальцію, що може

призводити до посилення утворення активних форм кисню. Кальцій є універсальним вторинним месенджером, що контролює критичні клітинні процеси у всіх еукаріотичних клітинах [193]. Кальцієві сигнали регулюють як швидкі біологічні процеси, що відбуваються за мілісекунди і секунди, наприклад скорочення м'язів або генерація нервових імпульсів, так і довгострокові процеси, які можуть тривати кілька днів, наприклад, проліферація клітин та синаптична пластичність [194]. Специфічність клітинних кальцієвих сигналів контролюється складною системою, що включає численні іонні канали, насоси, обмінники, що управляють потоками іонів кальцію через плазматичну мембрану і через мембрану внутрішньоклітинних органел. Розвиток новітніх технологій, спрямований на вивчення конкретних внутрішньоклітинних процесів, висвітлив центральну роль, яку виконують ендоплазматичний ретикулум та мітохондрії у регуляції кальцію [195–197]. Ендоплазматичний ретикулум є основним внутрішньоклітинним кальцієвим запасником клітин, від якого у великій мірі залежить рівень і динаміка внутрішньоклітинних кальцієвих концентрацій. Останнім часом велику увагу у наукових дослідженнях привертають механізми кальцієвого гомеостазу мітохондрій. Мітохондрії формують та декодують клітинні кальцієві сигнали та виконують центральну роль у клітинному метаболізмі та загибелі клітин. Здатність мітохондрій активно накопичувати і віддавати кальцій має важливі наслідки на формування цитозольних кальцієвих сигналів [196, 197]. У збудливих клітинах, мітохондрії, локалізуються в безпосередній близькості від потенціал-керованих кальцієвих каналів та впливають на буферну ємність кальцію у плазматичній мембрані. Було показано, що тривале збільшення внутрішньоклітинного кальцію може викликати відкриття мітохондріальних пор, що веде до загибелі клітин шляхом апоптозу [198, 199]. В нейронах основним пусковим механізмом окислювального стресу є збудження

глутаматних рецепторів, при цьому іонотропні рецептори забезпечують надходження позаклітинного кальцію в клітину, а метаботропні стимулюють вивільнення внутрішньоклітинного кальцію з клітинних депо. До відомих кальцій-залежних процесів, які активуються внаслідок підвищення збудливості нейронних мереж, відносяться утворення арахідонової кислоти під дією фосфоліпази А, окислення ксантину за участю ксантиноксидази, синтез NO при активації NO-синтази. Встановлено, що окислювальний стрес спостерігається на початку епілептичного нападу, але може бути відповідальним за довгострокові дисфункції ЦНС. Дисбаланс роботи збуджувальної та гальмівної систем, а також окислювальний стрес можуть бути визначальними у епілептичному патогенезі нейронних мереж, обумовлюючи порушення саморегуляції гомеостатичних механізмів [200].

1.3.3.5. Потенціалзалежні та лігандкеровані іонні канали

НМДА-рецептори відіграють ключову роль в синаптичній пластичності [201], ексайтотоксичності [202, 203] та ЕФА [204]. НМДА-рецептор є тетрамерним комплексом, що формується комбінацією двох субодиниць: NR1 і NR2. Активація цього рецептора викликає відкриття іонного каналу проникного для іонів Na^+ , K^+ і Ca^{2+} . Наряду з класичною локалізацією на постсинаптичній мембрані, НМДА-рецептори, що містять NR2В субодиницю, також можуть бути розташованими на пресинаптичній мембрані і навіть за межами синапса [205–207]. Було встановлено, що в нейронах енторінальної кори тварин з хронічною епілепсією спостерігається підвищена експресія пресинаптичних НМДА-рецепторів. Активація цих рецепторів спричиняє полегшення вивільнення глутамату [208], що може сприяти ексайтотоксичності та погіршенню епілептичних нападів.

Різноманітні зміни експресії мРНК або білків NR1 та NR2B субодиниць або їх фосфорилювання були описані в різних відділах мозку у пацієнтів з епілепсією і у тварин після індукції епілептичних нападів [209–211] або на хронічній стадії хвороби [212, 213]. Рівень NR2B субодиниці був підвищений в пресинаптичній та екстрасинаптичній ділянці. Проте зниження фосфорилювання цих субодиниць спостерігалось в межах епілептогенезу, спровокованого ЕС [214]. Крім того, ектопічна експресія NR2B та NR1 була виявлена в астроцитах після індукції ЕС. Блокада NR2B з використанням іфенпроділу після ЕС значно знижувала рівень загибелі нейронів в зонах СА1 та СА3 гіпокампа, що свідчить про роль NR2B субодиниці НМДА-рецептора в ексайтотоксичності, що спостерігається впродовж епілептогенезу [214].

Серед інших глутаматергічних рецепторів найбільш широко вивченими, щодо ролі в епілептогенезі скроневої епілепсії є **каїнатні рецептори**. Було продемонстровано, що високочастотна стимуляція може призводити до підвищення експресії каїнатних рецепторів з субодиницею GluK1, залучених у пресинаптичну регуляцію вивільнення глутамату, що може призводити до подальшого підвищення збудливості нейронних мереж [215]. Підвищення експресії GluK1 спостерігалось також на зразках тканин пацієнтів зі скроневою епілепсією, що може вказувати на залучення каїнатних рецепторів у генерацію та підтримання спонтанних епілептичних нападів [216]. Як зазначалось вище підвищення експресії каїнатних рецепторів спостерігалось в новоутворених синапсах аксонів моховитих клітин, що припускає їх залучення у дисбаланс збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі в мережі зубчаста звивина - СА3. Окрім прямого впливу, активація цих рецепторів на пресинаптичній мембрані може впливати на збудливість нейронів опосередковано через регуляцію вивільнення гальмівного нейромедіатора ГАМК [215].

Участь **ГАМК-рецепторів** у патогенезі епілепсії відома ще з античних часів, коли для пригнічення судом використовувались різноманітні рослинні засоби, дія яких заснована на посиленні ГАМК-ергічного гальмування [217]. Однак, клітинні та молекулярні зміни ГАМК-ергічної синаптичної передачі, що пов'язані з епілептогенезом та механізми впливу цих змін на процес розвитку набутої епілепсії залишаються значною мірою нез'ясованими. Було висунуто припущення, що ГАМК-залежна сигналізація знижується в рамках епілептогенного механізму, що дозволяє глутаматергічній сигналізації «вийти з-під контролю». Проте, недавні дослідження показали, що епілептичне дерегулювання ГАМК-ергічного гальмування є насправді більш складним процесом, що включає якісні та кількісні зміни субодиниць рецептора ГАМК [218], модуляцію ГАМК-ергічної системи іншими нейромедіаторами і вторинними месенджерами. Спостерігаються також фенотипічні зміни ГАМК-рецепторів, які створюють замість гіперполяризуючих деполяризуючі реакції у відповідь на ГАМК [219]. Так наукових досліджах останніх років висвітлено подвійну функцію ГАМК-рецепторів. Як зазначалось вище, активація цих рецепторів в незрілому мозку може призводити до деполяризації клітинної мембрани, що як показали дослідження відіграє важливу роль у розвитку незрілого мозку. Активація ГАМК-рецепторів в зрілому мозку, навпаки, як правило, призводить до гіперполяризації мембрани клітин. Позитивне зрушення гальмівних постсинаптичних потенціалів (потенціалу реверсії для іонів хлору) спостерігається і в зрілому мозку після травми, гіпертермії, ЕС, ішемічних пошкоджень та інш. Було встановлено, що позитивне зрушення гальмівних постсинаптичних потенціалів після ушкоджень мозку опосередкується підвищенням внутрішньоклітинного рівня хлору внаслідок підвищеної експресії ко-транспортеру NKCC1 в нейронах, що полегшує накопичення внутрішньоклітинного Cl^- , а також зниженням експресії KCC2 ко-

транспортеру, що бере участь у виведенні Cl^- з клітини [220]. Зміни експресії NKCC1 та KCC2 в гіпокампі були описані у хворих на скроневу епілепсію і на експериментальних моделях цієї форми епілепсії [221–225]. Ці спостереження призвели до припущення, що зміни в експресії ко-транспортів, залучених в регуляцію внутрішньоклітинних концентрацій Cl^- , можуть значною мірою впливати на розвиток набутої епілепсії. Запропонована гіпотеза не найшла підтвердження в дослідженнях з використанням пілокарпінової моделі скроневої епілепсії і з застосуванням антагоніста NKCC1 ко-транспортера (буметаніду), але й досі залишається привабливою гіпотезою для багатьох дослідників [226].

Дофамінергічні проекції лімбічної системи також відіграють важливу роль у розвитку ЕФА і епілепсії. Дофамінергічна система надає комплексну нейромодуляторну регуляцію збудливості нейронів насамперед завдяки активації D1- і D2-підтипів **дофамінових рецепторів**. Було показано, що порушення цієї регуляції може сприяти поширенню ЕФА в лімбічній системі. Останні свідчення про активацію дофаміновими рецепторами внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, залучених в процес епілептогенезу, ведуть до перспективних досліджень, спрямованих на виявлення нових мішеней при лікуванні епілепсії [227].

Роль **K^+ -каналів** в процесі розвитку епілепсії варіює залежно від експериментальної моделі. Доктор Олівейра та його колеги (2010) виявили, що Ca^{2+} -чутливі K^+ -канали залучені в регуляцію збудливості нейронів шляхом регулювання частоти потенціалів дії. Роль цих каналів є захисною, і дефекти калієвої сигналізації можуть призвести до розвитку епілептичних синдромів [228]. Калієві канали сімейства Kv7, особливо Kv7.2 і Kv7.3, є найважливішими калієвими каналами в регулюванні нервової активності. Вони забезпечують повільну активацію та деактивацію K^+ струму, таким чином регулюючи збудливість мембрани прямо або опосередковано через

модуляцію синаптичних відповідей [229]. Як зазначалось вище, Kir4.1 калієві канали можуть також відігравати роль у епілептогенезі через порушення акумуляції іонів K^+ астроцитами, внаслідок зниження експресії цих каналів [169].

Потенціалзалежні **Na^+ канали** відіграють центральну роль у розвитку потенціалу дії. [230]. Зміни у функції Na^+ каналів були виявлені в нервовій тканині пацієнтів з епілепсією [231, 232], а також на експериментальних моделях ЕФА і епілепсії [233, 234]. Серед різноманітних ізоформ Na^+ каналів, що експресуються в головному мозку [235], ізоформи Nav1.6 є найбільш вивченими, оскільки вони щільно експресуються на початковій ділянці аксонів [236]. Збільшення експресії Nav1.6, спровоковане ЕФА, було виявлено з використанням кіндлінгової моделі епілептичних нападів [237], а також на моделях скроневої епілепсії [238]. Також було продемонстровано, що зниження рівня експресії Nav1.6 зменшує вірогідність розвитку нападів [237], а також знижує частоту розрядів в багатьох типах нейронів [239–241]. Крім того, встановлено, що мутації SCN8A гену, який кодує Nav1.6, пов'язані з дитячою епілептичною енцефалопатією [242]. Нещодавні дослідження з використанням пілокарпінової моделі епілепсії виявили підвищення амплітуди та зміни кінетичних характеристик потенціалзалежних Na^+ струмів, особливо перзистентного струму, в нейронах різних ділянок ЦНС впродовж епілептогенезу, що може свідчити про залучення Na^+ каналів у патофізіологію розвитку набутої епілепсії [243].

Потенціалзалежні **Ca^{2+} канали** забезпечують регуляцію збудливості нейронів та контроль кальційзалежних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Відомо, що активація низькопорогових (Т-тип) Ca^{2+} каналів робить вагомий внесок у генерацію комплексів пік-хвиля, які спостерігаються при абсансній формі епілепсії [244]. Експериментальні моделі цієї форми епілепсії показали, що принаймні CaV3.1 і CaV3.2 ізоформи Т-типу кальцієвих каналів

відіграють важливу роль в етіології цієї хвороби [245–247]. Суттєві зміни експресії низькопорогових та високопорогових Ca^{2+} каналів, спричинені високочастотною електричною стимуляцією або ЕС, індукованим ін'єкцією пілокарпіну, також вказують на залучення Ca^{2+} каналів в епілептогенез [248–251].

1.3.3.6. Запальні процеси

Активація мікроглії, астроцитів, ендотеліальних клітин і периферичних імунних клітин, а також експресія запальних медіаторів, були вперше виявлені у пацієнтів з енцефалітом Расмуссена [252]. Симптоми активації імунної системи у деяких пацієнтів з епілепсією, висока вірогідність епілептичних нападів при аутоімунних захворюваннях, а також відкриття лімбічного енцефаліту в якості причини епілепсії призвели до припущення, що імунні та запальні механізми відіграють значну роль у патофізіології епілепсії [253–256]. Нещодавні дослідження вказують на те, що запалення може бути як наслідком, так і причиною розвитку епілепсії. Різноманітні прозапальні медіатори були виявлені після хірургічної резекції у нервовій тканині пацієнтів з резистентними формами епілепсії, в тому числі скроневою епілепсією і корковою дисплазією [256, 257].

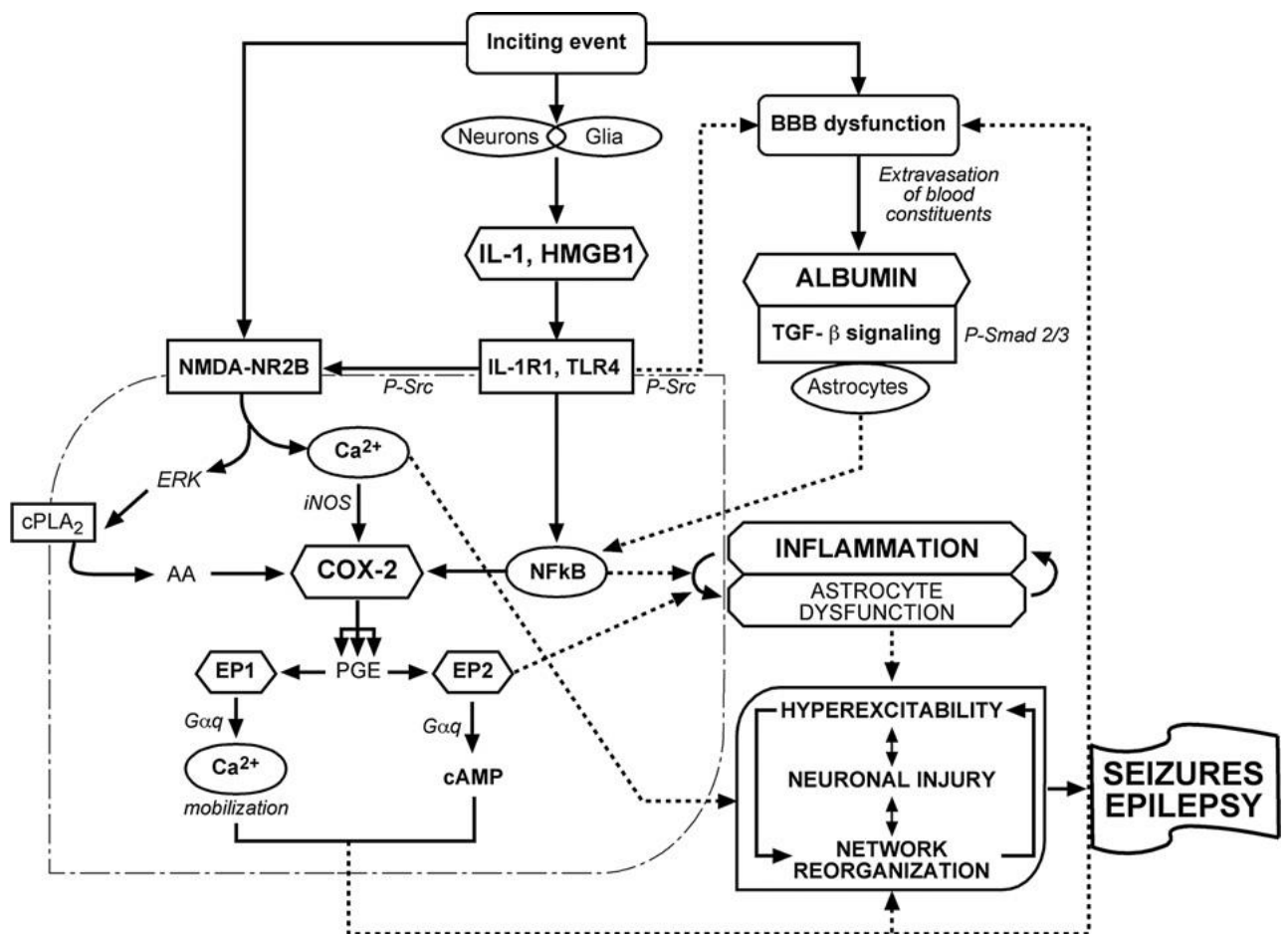


Рис. 1.9. Схематичне зображення патологічного каскаду, спровокованого пошкодженням мозку, що забезпечується трьома ключовими запальними шляхами: IL-1 / TLR, COX-2 і TGF- β . Пошкодження мозку різного генезу може привести до активації мікроглії, астроцитів і нейронів, та /або дисфункції ГЕБ. Приміровані клітини виділяють запальні цитокіни, такі як IL-1 β , і сигнали небезпеки, такі як HMGB1, що можуть пригнічувати запальні процеси в клітинах-мішенях (тобто, нейронах і глії). Активація нейронів призводить до НМДА-рецепторзалежного збільшення провідності іонів Ca^{2+} внаслідок змін експресії і Src-опосередкованого фосфорилування NR2B субодиниці цих рецепторів, що призводить до збільшення внутрішньоклітинних концентрацій іонів кальцію, що в свою чергу призводить до патологічних наслідків, наприклад, підвищення збудливості

нейронів, зниження порогу судомної активності, нейродегенеративних процесів та реорганізації нервових мереж. Активація Src в ендотеліальних клітинах може сприяти подальшому пошкодженню ГЕБ. IL-1 / TLR-опосередкована активація NFkB- залежної транскрипції генів (у тому числі COX-2) сприяє молекулярним і клітинним змінам, пов'язаним з епілептогенезом, а також хронічному запаленню мозку. Запальні процеси можуть також призвести до активації НМДА рецепторів в нейронах, що, в свою чергу сприяє активації COX-2, що каталізує утворення простагландинів. Простагландин E (PGE) і цАМФ, також сприяють запаленню, дисфункції ГЕБ і іншим патологічним процесам. Дисфункція ГЕБ в результаті первинного пошкодження мозку або внаслідок запальних процесів (підвищення експресії IL-1 / TLR, COX-2), призводить до потрапляння компонентів крові (альбуміну, плазміну, тромбіну) в паренхіму головного мозку і активації TGFβ сигналізації в астроцитах. Ця сигналізація сприяє астроцитарній дисфункції (зниженню експресії Kir4.1 і глутаматного транспортеру). Ці патологічні прямі і непрямі процеси можуть призвести до підвищення збудливості нейронів, пошкодження клітин і реорганізації нейронних мереж, що врешті-решт може призвести до розвитку епілепсії [258].

Той факт, що запальні процеси спостерігались в мозковій тканині при формах епілепсії, що не є класично пов'язаними з дисфункціями імунної системи, підкреслює можливість того, що хронічне запалення може бути притаманним деяким формам епілепсії, незалежно від етіології початкового ураження, тобто не бути суто безпосереднім наслідком конкретного базового запального або аутоімунного процесу. Експериментальні дослідження показали, що епілептичні напади, самі по собі можуть викликати запалення головного мозку і повторювані напади можуть призвести до хронічних запальних процесів в мозковій тканині [256, 259] (**Рис. 1.9**). Загибель нейронів, спровокована

епілептичними судомами, може сприяти запаленню, але не є її обов'язковою умовою. Крім того, моделі системних запальних реакцій та інфекцій ЦНС показали, що запалення мозку само по собі збільшує схильність до судом [260]. Врешті-решт, роль запалення в розвитку епілепсії була продемонстрована з використанням фармакологічних підходів. Було показано, що інгібування деяких медіаторів запалення призводить до зниження ймовірності розвитку деяких форм набутої епілепсії [261, 262]. Також у генетично модифікованих мишей із дефектами запальних шляхів були продемонстровані зміни в сприйнятливості до епілептичної активності [263, 264]. Отже, описані вище факти вказують на те, що запальні процеси можуть відігравати важливу роль в патофізіології розвитку набутої епілепсії

1.3.3.7. Порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру

Порушення цілісності ГЕБ зазвичай спостерігається при черепно-мозкових травмах, інсульті, пухлинах, інфекціях та інших станах, які можуть призвести до судом і розвитку епілепсії [258, 265–268]. Коротко- та довготривале збільшення проникності ГЕБ під час та після епілептичних нападів виявлено на експериментальних моделях набутої епілепсії [269], і у пацієнтів з епілепсією [270, 271]. Крім того, пошкодження ГЕБ або внутрішньомозкові ін'єкції компонентів крові можуть безпосередньо викликати судомні напади і ЕФА [272]. Ці дані призвели до гіпотези про пряму роль дисфункції ГЕБ в епілептогенезі. Гіпотеза підтверджується недавніми спостереженнями на експериментальних моделях набутої епілепсії. Так, була продемонстрована значна позитивна кореляція між порушенням цілісності ГЕБ, концентрацією альбуміну сироватки крові у паренхимі головного мозку у щурів після ЕС і утворенням епілептичного вогнища [273]. В інших роботах

також було показано, що хронічне порушення ГЕБ в неокортексі щурів може призвести до розвитку спонтанної ЕФА [274, 275].

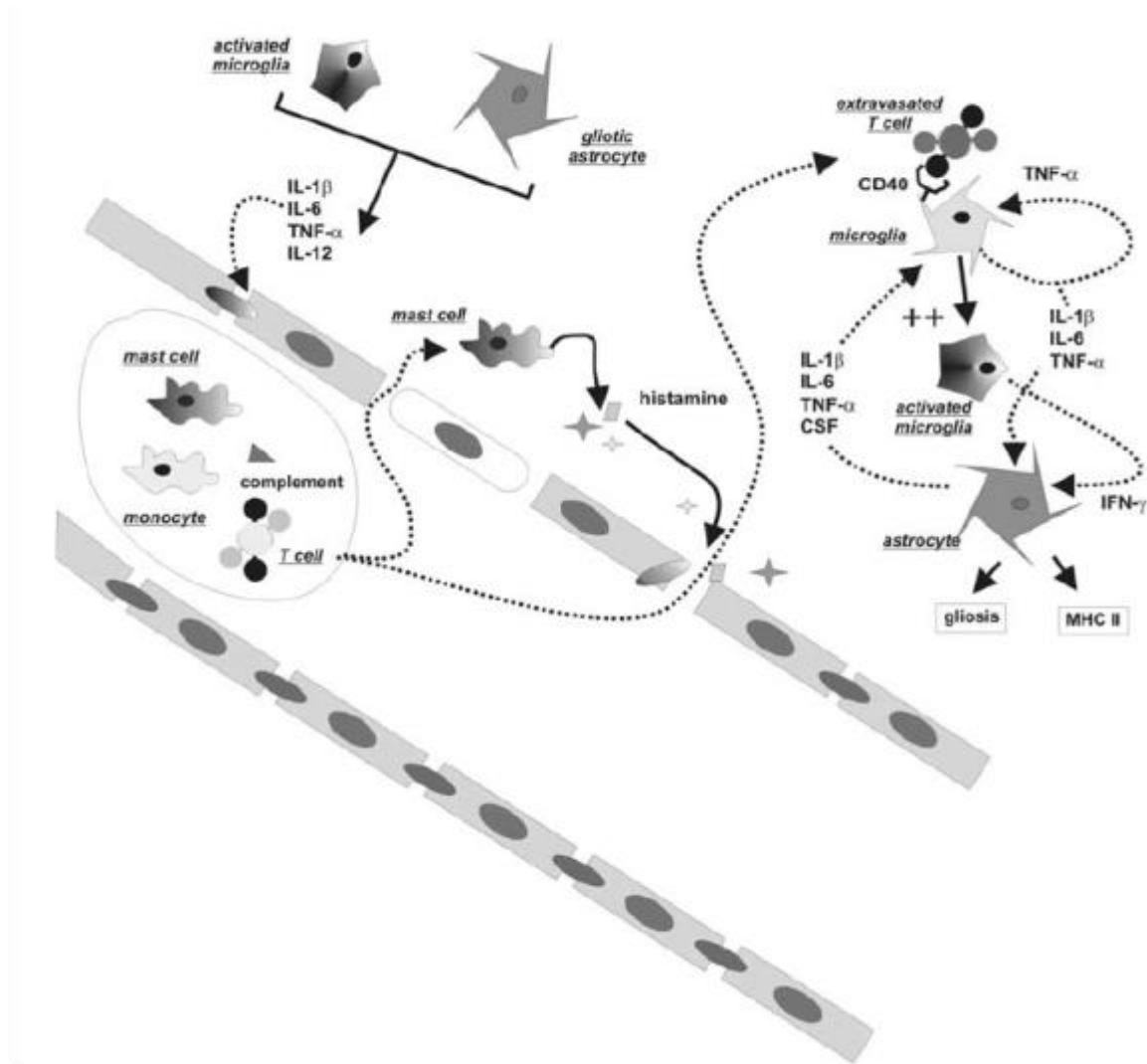


Рис 1.10. Схематичне зображення патологічних процесів, що активуються внаслідок дисфункції ГЕБ і можуть бути залученими у процес епілептогенезу. У нормальних умовах, ГЕБ відокремлює імунну систему від паренхіми ЦНС. При порушенні цілісності ГЕБ компоненти крові потрапляють у внутрішньоцеребральне середовище. Активовані клітини крові виділяють металлопротеінази та інші молекули, що може сприяти подальшому пошкодженню ГЕБ. Також підвищенню проникності ГЕБ можуть сприяти медіатори запалення клітин крові і активованої мікроглії.

Інтерлейкіни (IL, interleukin); фактор некрозу пухлини (TNF, tumor necrosis factor); інтерферон (IFN, interferon); колонієстимулюючий фактор (CSF, colony-stimulating factor); головний комплекс гістосумісності (МНС, major histocompatibility complex)[276].

Порушення цілісності ГЕБ призводить до потрапляння компонентів крові в тканину мозку, які можуть викликати деструктивні зміни, такі як астрогліоз та активація мікроглії, епілептичні напади [175, 277] (**Рис. 1.10**), але незважаючи на інтенсивні кроки фундаментальної науки по дослідженню специфічних шляхів, що активуються в результаті порушення ГЕБ і можуть бути залучені у розвиток набутої епілепсії, на сьогодні зв'язок між цими двома процесами залишається значною мірою невивченим.

1.3.4. Роль тромбіну та протеазаактивованих рецепторів в функціонуванні ЦНС у нормі та при патологічних станах

Існують докази того, що, окрім ключової ролі в коагуляції крові, білок сироватки тромбін задіяний у численні механізми, важливі для функціонування мозку, як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах, таких як аномальна синхронізація нейронів, нейродегенерація і запалення [278]. МікроРНК протромбіну була ідентифікована в різних відділах ЦНС, зокрема в нюхових цибулинах, мозочку, корі, гіпокампі і таламусі [279]. Іншим джерелом надходження тромбіну в мозкову тканину є потрапляння його із крові в результаті порушення цілісності ГЕБ. В ЦНС тромбін активує специфічні протеазаактивовані рецептори (ПАР), що належать до сімейства рецепторів сполучених з G-білками але, на відміну від класичних рецепторів цієї групи, механізм активації ПАР значно складніший

і включає розщеплення фрагменту N-кінця рецептора, розташованого у позаклітинному просторі, внаслідок зв'язування та протеолітичної дії агоніста - протеази (тромбіну, плазміну та інш). Таке розщеплення здемаскує новий N-кінець, який і є лігандом, що активує ПАР рецептор (**Рис. 1.11**).

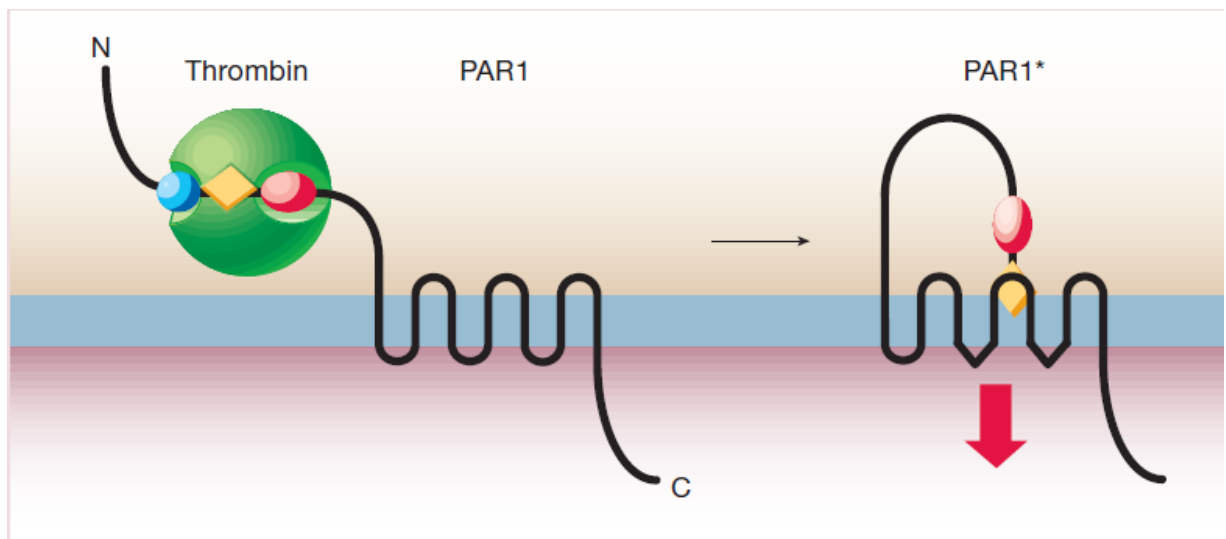


Рис. 1.11. Механізм PAR1 активації. Тромбін (велика зелена куля) розпізнає екзодобен N-терміналі PAR1. Взаємодія PAR1 з тромбіном включає два сайти N-терміналі (маленька синя куля і маленький рожевий овал) і сайт розщеплення для тромбіну. Остання послідовність нагадує C-кінцевий хвіст інгібітору тромбіну гірудину і зв'язується з тромбіном аналогічним чином. Тромбін розщеплює пептидний зв'язок між рецепторними залишками Arg 41 і Ser 42, утворюючи новий N-кінець, починаючи з послідовності SFLLRN (діамант), яка функціонує як прив'язаний до рецептора ліганд, що зв'язується з тілом рецептора і активує його. Синтетичний пептид SFLLRN імітує послідовність цього ліганду, але функціонує як агоніст рецептора незалежно від розщеплення N-терміналі. Отже, PAR1 є пептидним рецептором, який

несе свій власний ліганд, причому останній стає доступним тільки після розщеплення рецептора протеазою [280].

Серед чотирьох відомих типів ПАР рецепторів ПАР1, ПАР3 і ПАР4 активуються тромбіном, а ПАР2 активується трипсином, триптазами, а також факторами згортання VІІа і Ха [280]. ПАР1 є найпоширенішим тромбіновим рецептором в ЦНС. Імуногістохімічний аналіз показав наявність високого рівня ПАР1 в гіпокампі (пірамідному шарі клітин) в порівнянні з помірним рівнем його експресії у корі головного мозку, таламусі, гіпоталамусі, стріатумі і мигдалині [281]. мРНК і білок ПАР1 були зареєстровані в ембріональному та зрілому мозку [282, 283]. ПАР3 білок був виявленим в гіпокампі, корі, мигдалині, таламусі, гіпоталамусі та смугастому тілі [281]. ПАР4 білок міститься в аксонах, сомі і дендритах нейронів гіпокампа, всіх шарів кори, таламусі, гіпоталамусі, мигдалині [281]. Крім того, функціональна експресія ПАР1 -ПАР4 була виявлена в глії [284].

Залежно від концентрації, роль тромбіну в ЦНС може бути захисною або шкідливою (**Рис. 1.12**). У низьких концентраціях тромбін справляє нейропротекторну дію і сприяє зниженню загибелі нейронів та астроцитів після пошкодження мозку різної етіології [285]. Було показано, що тромбін відіграє значну роль в процесах проліферації, росту та морфологічних змін нервових клітин [286, 287]. На відміну від цього, порушення цілісності ГЕБ при патологічних умовах може призвести до різкого збільшення рівня тромбіну в ЦНС. Тромбін через активацію ПАР, відіграє важливу роль у цілому ряді патологічних станів (таких, як хвороби Альцгеймера [288] і Паркінсона [289], ішемія головного мозку [290] і травми мозку [266]). Також було показано, що тромбін у наномолярних і мікромольних концентраціях може викликати загибель клітин в органотиповій культурі зрізів мозку [291], а також спричиняти ЕФА[272]. Було показано, що дефіцит ПАР1 призводить

до зниження загибелі нейронів і неврологічних дефіцитів в різних моделях експериментального пошкодження головного мозку. Описані дані вказують на значну роль PAR1-залежної сигналізації у розвитку нейродегенеративних розладів [290, 292–294].

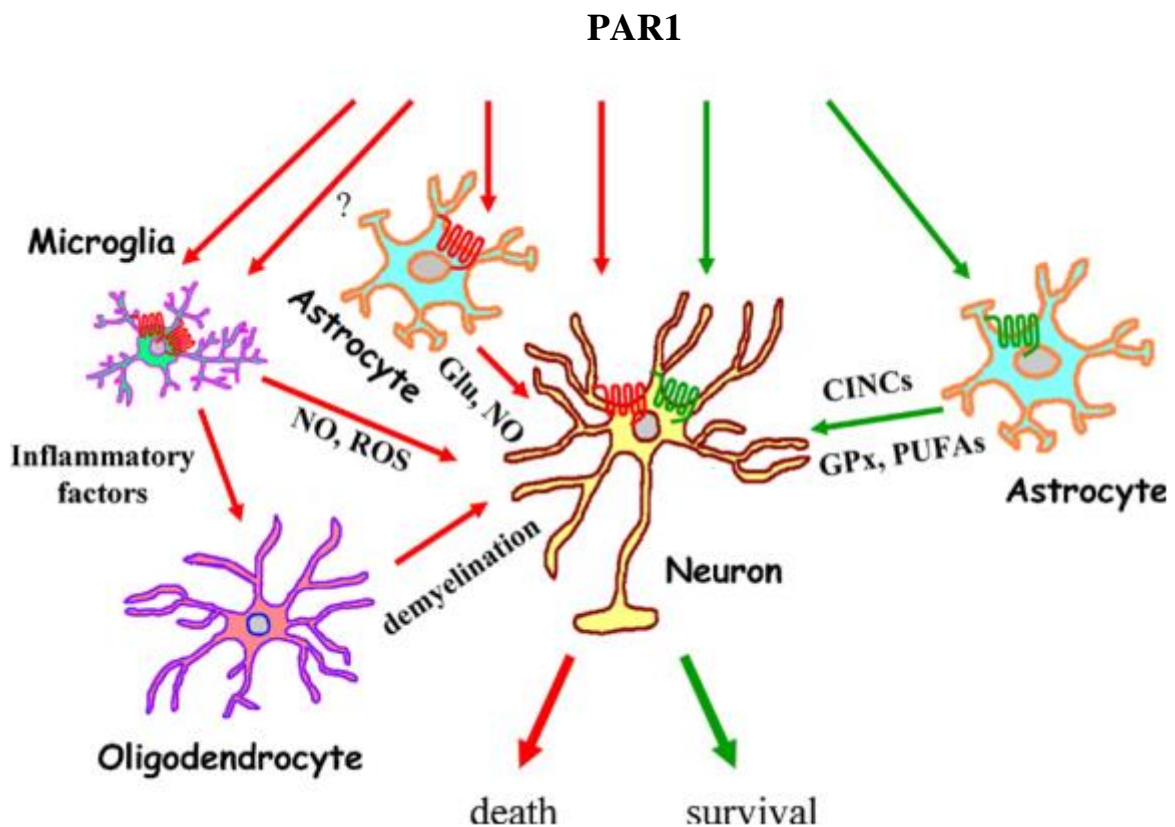


Рис 1.12. Схематичне зображення різноманітних функцій PAR1 рецептора в головному мозку. Залежно від концентрації та тривалості дії тромбіну, активація PAR1 може призвести до загибелі клітин або, навпаки, до підвищення виживаності нейронів в головному мозку. Активація PAR1 призводить до індукції прозапальних факторів і токсичних процесів, в гліальних клітинах, в тому числі астроцитах і мікроглії, що може сприяти нейродегенерації. Спірним залишається питання чи беруть участь PAR у загибелі нейронів, спровокованої активованою тромбіном мікроглією (позначено "?"). Вивільнення хемокинів (CINCx) і глутатіон пероксидази (GPX), спровоковане активацією PAR1 в астроцитах, сприяє виживанню

нейронів у головному мозку. Вивільнення поліненасичених жирних кислот (PUFAs) в астроцитах, спровоковане тромбіном, може являти собою додатковий механізм, що лежить в основі ПАР-залежної нейропротекції в мозку. Глутамат (Glu); активні форми кисню (ROS) [279].

Резюме

Численні клінічні спостереження та фундаментальні дослідження вказують на те, що період раннього розвитку людини пов'язаний з особливо високим ризиком розвитку епілептичних нападів та епілепсії. Незважаючи на те, що переважна більшість нападів у дітей є доброякісними і вірогідність неврологічних ускладнень, пов'язаних з ЕФА у дитинстві, значно менша ніж при епілептичних розладах діагностованих у дорослому віці, численні клінічні дані і експериментальні дані на моделях неонатальних епілептичних нападів переконливо свідчать про те, що часті і тривалі ЕФА в період раннього розвитку справляють негативний вплив на функціонування головного мозку. Аналіз представлених літературних відомостей свідчить, що клітинні і особливо пластичні зміни, спровоковані ЕФА в неонатальний період, досі охарактеризовані лише фрагментарно. Зокрема, надзвичайно актуальним є отримання детальних характеристик впливів ЕФА в неонатальний період на функції гіпокампа і неокортекса. Значну цікавість також викликають клітинні механізми розвитку набутої епілепсії, а саме з'ясування участі тромбіну і ПАР1 в епілептогенезі. Необхідність вирішення окреслених наукових проблем стала передумовою вибору напрямку досліджень, описаних в дисертаційній роботі.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Усі експерименти в роботі були виконані із дотриманням положень Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях та відповідно етичним вимогам до роботи з дослідними тваринами, прийнятими в установах Національної Академії наук України [295].

В експериментах використовували щурів ліній Спрейг-Доулі або Вістар. Дослідження впливів ЕФА, викликані в період раннього розвитку, проводили в гіпокампі, соматосенсорній корі (ССК) та префронтальній корі (ПФК) молодих і дорослих щурів. Електрофізіологічні і гістологічні дослідження впливів антагоніста ПАР1 на епілептогенез, спровокований епілептичним статусом, проводили в зоні СА1 гіпокампа дорослих щурів.

Гіпокамп. Гіпокамп (від грец. *Hippocampus* – морський коник) є основною структурою лімбічної системи головного мозку. Гіпокамп бере участь в механізмах формування емоцій та консолідації пам'яті, тобто переходу короточасної пам'яті в довготривалу. Встановлено, що пошкодження гіпокампа призводить до порушення пам'яті на події, близькі до моменту ушкодження (ретроантероградна амнезія). Також відомо, що пошкодження гіпокампа веде до погіршення процесів запам'ятовування, обробки нової інформації і просторових сигналів, зниження емоційності, ініціативності, уповільнення швидкості основних нервових процесів, підвищення порогу виклику емоційних реакцій.

На поперечному зрізі гіпокамп поділяється на зубчасту звивину (*dentate gyrus*) і Аммонів ріг (*Cornu Ammonis* - СА), в якому виділяють зони СА1-4. Основні клітинні елементи гіпокампа - типові пірамідні клітини.

Клітини CA1 зони мають невеликі тіла з апікальними дендритами з тонкими бічними відростками, що простягаються на значну відстань від тіла клітини і дихотомічно діляться лише в лакунозно-молекулярному шарі. Дендрити CA1 пірамідних клітин не мають великих шипикових виростів. Тіла пірамідних клітин в цьому відділі дуже щільно розташовані. В зоні CA2 пірамідні клітини значно крупніші, ніж в CA1 зоні. Стовбур їх апікальних дендритів також не покритий шипиками. Нейронні поля CA3 дуже великі, але розташовані не так щільно як в CA1 зоні. Їх апікальні дендрити утворюють біфуркацію недалеко від клітинного тіла (у радіальному шарі). Проксимальна частина дендритів покрита шипиковими виростами, що контактують із синапсами моховитих волокон. Від аксонів пірамідних клітин зони CA3 відгалужуються товсті мієлінізовані колатералі (колатералі Шаффера), які проектується до зони CA1. Розташування пірамідних нейронів у CA4 зоні гіпокампа менш організоване, ніж в інших полях. Отже, типовими полями гіпокампа є поля CA1 і CA3. Морфологічно розподіл гіпокампа на два основних відділи ґрунтується також на тому принциповому факті, що поля CA3 і CA4 зв'язані із системою моховитих волокон, а поля CA1 і CA2 не одержують аксонів гранулярних клітин.

За різним рівнем розгалуження дендритної системи пірамідних клітин у мікроструктурі гіпокампа виділяють наступні шари: *ependyma* (епендима), що вистилає стінки бічного шлуночка і вкриває гіпокамп; *alveus* (альвеолярний шар), який утворюють мієлінізовані аксони пірамідних нейронів; *stratum oriens* (висхідний шар), в якому розташовані базальні дендрити; *stratum pyramidale* (пірамідний шар), утворений тілами пірамідних клітин; *stratum radiatum* (радіальний шар), в якому знаходяться нерозгалужені стовбури апікальних дендритів; *stratum moleculare-lacunosum* (лакунозно-молекулярний шар) – шар претермінальних і термінальних розгалужень апікальних дендритів.

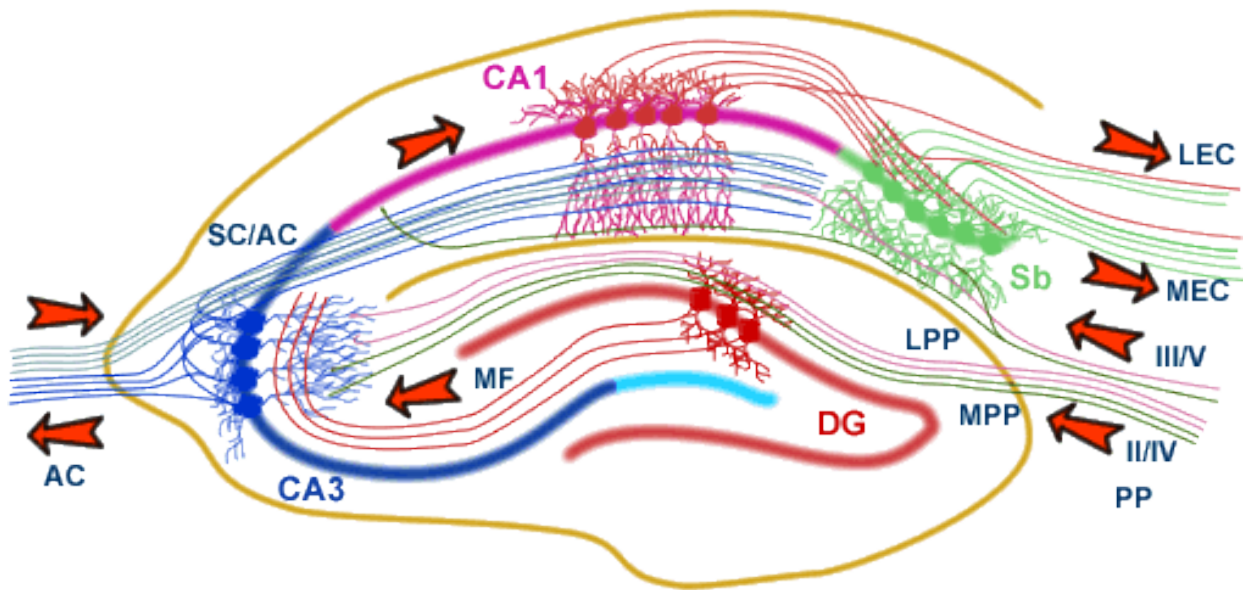


Рис. 2.1. Схематичне зображення структури гіпокампа та його зв'язків.

Гіпокамп є чітко відмежованою структурою, що віддалена від специфічних сенсорних і рухових шляхів. Ця структура отримує потужний потік аферентації від інших структур мозку. Його внутрішні нейронні мережі використовуються не тільки для обробки сенсорної інформації, а й для забезпечення вищих мозкових функцій. Всі вхідні канали гіпокампа, а також два канали внутрішньої передачі інформації (моховиті волокна та колатералі Шаффера) являють собою збуджуючі шляхи. Регуляцію вихідних сигналів гіпокампа забезпечують локальні гальмівні інтернейрони. Основним вхідним шляхом гіпокампа є перфорантний шлях (*perforant pathway, PP*), з'єднання енторінальної області кори (*entorhinal cortex, EC*) та клітин зубчастої звивини (*dentate gyrus, DG*) і нейронів зони CA3. CA3 нейрони також отримують нервові імпульси від клітин зубчастої звивини по їх аксонам, моховитим волокнам (*mossy fibers, MS*). Від нейронів зони CA3 сигнал передається в зону

CA1 по колатераліям Шаффера, аксонам пірамідних клітин зони CA3 (*Schaffer Collateral Pathway, SC*), а також через асоціативний комісуральний шлях (*Associational Commissural pathway, AC*). Нейрони зони CA1 також отримують прямі входи від енторінальної кори і проєктують свої аксони у субікулюм (*subiculum, SB*). Аксони нейронів субікулюму утворюють головний вихідний шлях гіпокампа в енторінальну кору (**Рис. 2.1**).

Соматосенсорна кора. Сенсорна система складається зі структур центрального та периферичного відділів ЦНС і забезпечує сприйняття та аналіз інформації про процеси, що відбуваються в зовнішньому середовищі та у внутрішній сфері організму. На підставі цієї інформації організм формує відповідні реакції, адекватні впливам навколишнього оточення та змінам у внутрішньому середовищі. Соматосенсорна система є сенсорним аналізатором вищого рівня, що забезпечує формування пропріоцептивної чутливості, що забезпечує регуляцію положення та рухів опорно-рухової системи організму, та всіх видів шкірної чутливості (тактильної, температурної, больової або ноцицептивної).

Соматосенсорна кора (ССК) організована в елементарні функціональні одиниці – колонки, орієнтовані перпендикулярно до поверхні кори. Діаметр кожної колонки складає приблизно 500 мкм і визначається горизонтальним поширенням терміналей аферентних таламокортикальних аксонів і вертикальною орієнтацією дендритів пірамідних клітин. Вважається, що колонка є елементарним блоком кори, де здійснюється локальна обробка інформації від рецепторів однієї модальності.

Відповідно до сучасних уявлень, кожна функціональна колонка ССК складається з кількох морфологічних мікромодулів, що поєднують невелику сукупність нейронів. У склад мікромодуля входить кілька пірамідних клітин, апікальні дендрити яких максимально зближені й утворюють дендритний

пучок. У межах цього пучка можливі електротонічні зв'язки, які, ймовірно, синхронізують роботу всього об'єднання. Аксони пірамідних клітин утворюють зворотні колатералі, що може забезпечувати і полегшувати впливи в межах мікромодуля і гальмівні взаємодії між мікромодулями (завдяки контактам з гальмівними інтернейронами). Кілька структурних мікромодулів, об'єднаних горизонтальним розгалуженням терміналей специфічних таламо-кортикальних аферентів, а також аксони терміналей і відростків зірчастих клітин формують колонку.

Основним типом збуджувальних нейронів в ССК є пірамідні клітини. Також до збуджувальних нейронів ССК належать зірчасті клітини. Основними типами гальмівних інтернейронів неокортекса є корзинчасті клітини, клітини канделябри та бі-розшаровані клітини.

ССК розподіляється на первинну (S1) і вторинну (S2) зони. Зона S1 має вигляд смужки сірої речовини і розташована в звивині кори безпосередньо позаду центральної борозни. Ця зона має проєкції шкірної чутливості протилежного боку тіла від тактильних, больових, температурних рецепторів, та інтероцептивної і пропріоцептивної чутливості від м'язових, суглобових, сухожильних рецепторів. Нейрони цієї зони організовані таким чином, що сенсорна інформація від визначеної ділянки тіла обробляється у визначеній чітко окресленій ділянці. Від інших ділянок кори S1 зона розрізняється високою щільністю гранулярних (зірчастих) клітин у шарі 4, що є основним місцем призначення таламічних проєкцій. Важлива організаційна особливість S1 полягає в тому, що сусідні ділянки на поверхні кори представляють сусідні ділянки поверхні тіла. Ноги і тулуб проєктуються більш медіально, потім представлені руки, а слідом за ними – голова і язик. Зона S2 є частиною тім'яної долі. Локалізація проєкцій тіла в цій зоні менш чітка, і сигнали сюди надходить як від протилежної, так і від «своїї» сторони. Вважається, що вторинна ССК бере участь в сенсорній і моторній координації обох сторін тіла.

Ураження вторинної соматосенсорної зони у людини призводить до розладу аналізу та синтезу різних шкірно-кінестетичних відчуттів, що надходять в кору тім'яної області мозку під час обмацування предмета, і ослабленню тактильних образів предметів (астереогноз).

Експерименти зі стимуляцією пре- і постцентральної звивин у пацієнтів, що піддавались хірургічній операції з видалення епілептичного вогнища, надали важливу інформацію про соматотопічну організацію соматосенсорної зони і основу для побудови соматотопічної карти ССК людини. Більш докладні карти ССК були побудовані на основі досліджень викликаних потенціалів (реєстрація локального потенціалу у відповідь на стимуляцію шкіри), які були здійснені на щурах, кроликах, котах і мавпах. Важливим спостереженням в цих дослідках є невідповідність пропорцій кортикальної карти тіла між досліджуваними групами. Було встановлено, що у мавп і людей в ділянці S1, руки, пальці і губи мають більші представництва, ніж тулуб або ноги. Невідповідність пропорції соматотопічної карти зумовлено більш високою щільністю іннервації тактильними рецепторами периферичних зон в області кінчиків пальців, губ і язика, порівняно з іншими зонами тіла. У інших тварин переважають інші регіони тіла: вуса у щурів і мишей, лапи у єнота, ніс у качкодзьоба. Було показано, що коркові представництва не залишаються незмінними, а можуть змінюватися через пошкодження, які модифікують сенсорний вхід в кору, або навіть за рахунок диференціальної стимуляції периферії.

Префронтальна кора. ПФК є філогенетично наймолодшою і розвиненішою ділянкою кори головного мозку, що забезпечує найбільш складні форми свідомої діяльності. Вона включає в себе поля 8-11 та 44-47 по Бродману. Експериментальні дослідження з використанням моделей локального пошкодження ПФК на гризунах дозволили встановити специфічні функції різних ділянок ПФК. Було показано, що медіальна зона ПФК бере

участь у формуванні оперативної пам'яті [296, 297], уваги, формуванні стратегії [298], звичок [296], поведінкової гнучкості [299]. Латеральна зона залучена у контроль таких поведінкових реакцій як, гіперактивність і соціальна поведінка [300]. Вентральна зона ПФК контролює рівень імпульсивності [301].

Подібно до інших ділянок кори головного мозку, ПФК поділяється на горизонтальні шари. Пірамідні нейрони п'ятого і шостого шару є основними вихідними нейронами мПФК, що проектуються, головним чином, в підкіркові відділи (**Рис. 2.2**). Приблизно 25 % пірамідних нейронів мПФК несуть свої волокна до бічних гіпоталамічних ядер, 20 % - до вентрального стріатуму, і ще 25 % мають свої проекції в прилеглому ядрі [302]. Також нейрони п'ятого шару несуть свої волокна в дорсальний шов (4 %), спинний мозок (9 %), перегородку (3 %), мигдалину (8 %), вентральну область покришки (6 %) та інші підкоркові області, а деякі нейрони мають свої проекції в кількох відділах мозку [302]. Гіпокамп, вентральна зона покришки та дорсальний шов мають прямі входи до нейронів п'ятого шару [303]. Апікальні дендрити нейронів п'ятого шару отримують також проекції від медіадорсального ядра таламуса через зв'язки з нейронами третього шару мПФК [304, 305], а також інервуються сусідніми нейронами, формуючи мережу взаємопов'язаних пірамідних нейронів п'ятого шару мПФ [306–308] (**Рис. 2.3**).

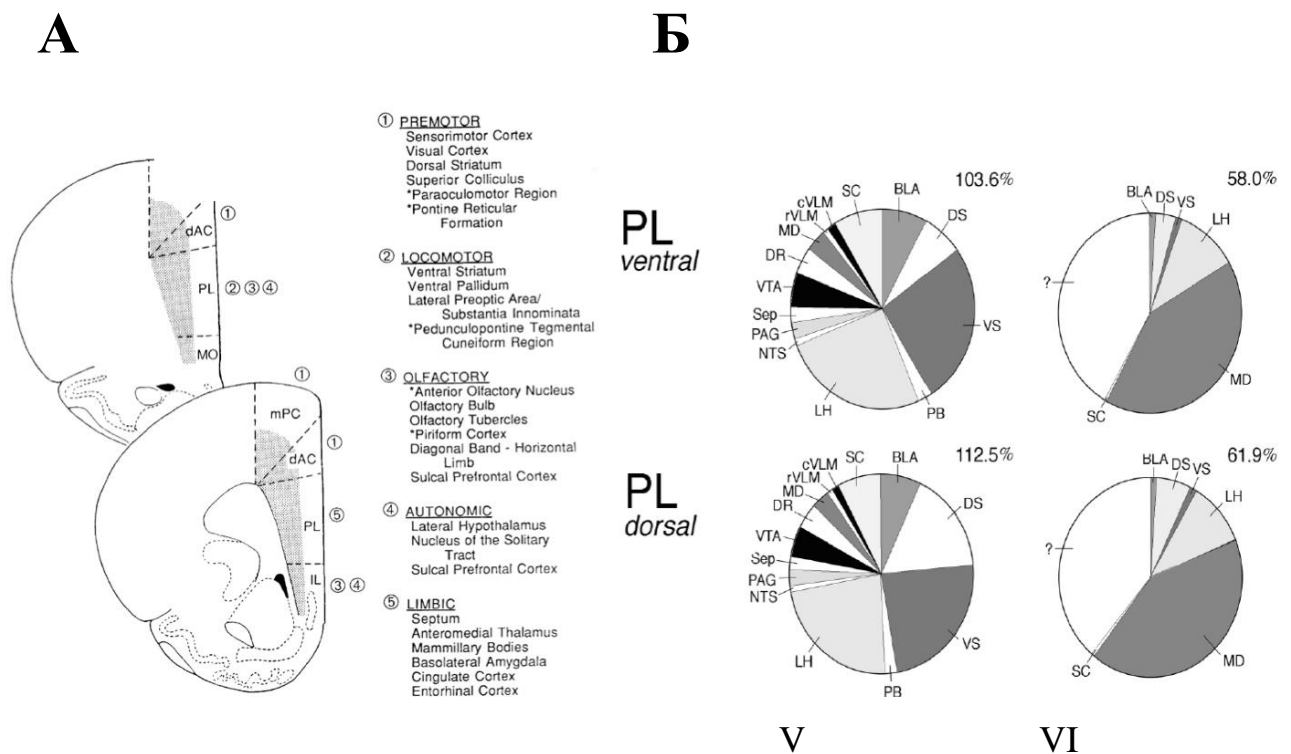


Рис. 2.2. Проекції медіальної зони префронтальної кори. Основні проекції нейронів мПФК у співвідношенні до анатомічних підрозділів мПФК окреслені номерами (А)[309]. Головні проекції нейронів п'ятого і шостого шару дорсального і вентрального прелімбічних регіонів мПФК представлені на (Б). BLA, basolateral amygdala, базолатеральна амігдала; DS, dorsal striatum, дорсальний стріатум; VS, ventral striatum, вентральний стріатум; PB, parabrachial nucleus, парабрахіальне ядро; LH, lateral hypothalamus, латеральний гіпоталамус; NTS, nucleus tractus solidarius, ядро одинокого шляху; PAG, periaqueductal gray, центральна сіра навколоводопровідна речовина; Sep, septum, септум; VTA, ventral tegmental area, вентральна зона покрову; DR, dorsal raphe, дорсальний шов; MD, mediodorsal nucleus of the thalamus, медіодорсальне ядро таламусу; VLM, ventrolateral medulla, вентролатеральна цибулина; SC, spinal cord, спинний мозок [302].

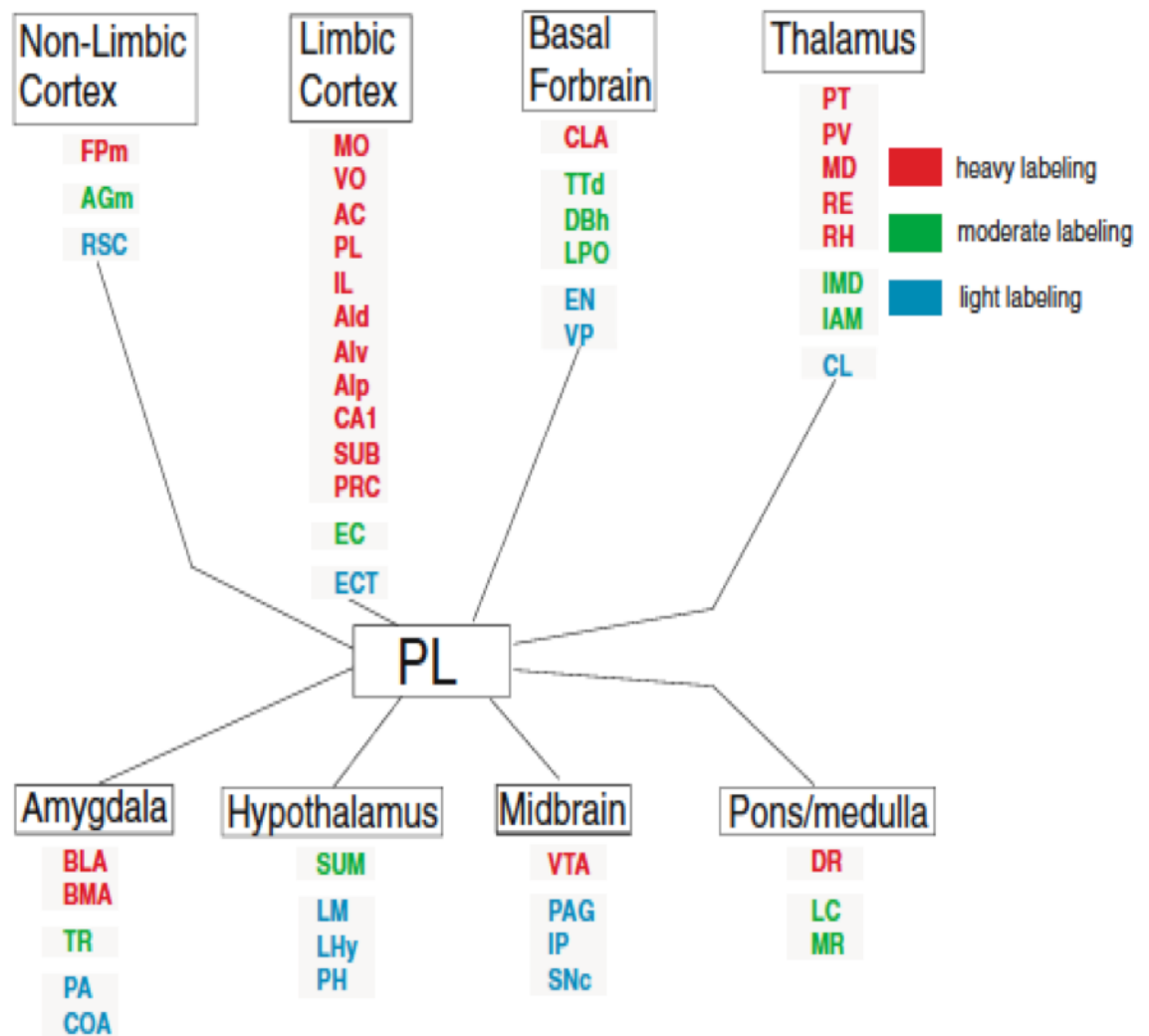


Рис. 2.3. Аференти медіальної зони префронтальної кори. Червоним позначені найбільш потужні проєкції: FPM, frontal polar cortex (medial) поле Бродмана 10; MO, medial orbital cortex, медіальна орбітальна кора; VO, ventral orbital cortex, вентральна орбітальна кора; AC, anterior cingulate cortex, передня поясна кора; PL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; AL, agranular insular cortex; CA1, field CA1 of the hippocampus, зона CA1 гіпокампа; SUB, subiculum, субікулюм, PRC; perirhinal cortex; CL, claustrum, огорожа; PT, paratenial nucleus of the thalamus, пристричкове ядро таламуса; PV, paraventricular nucleus of the thalamus, паравентрикулярне ядро таламуса; MD, mediodorsal nucleus, медіодорсальне ядро, RE, nucleus reunions, з'єднувальне ядро; RH, rhomboid nuclei, ромбовидне ядро; BLA,

basolateral amygdala, базолатеральна амігдала; *BMA*, *basomedial amygdala*, базомедіальна амігдала; *DR*, *dorsal raphe*, дорсальний шов; *VTA*, *ventral tegmental area*, вентральна зона покрову [303]

В сучасних дослідженнях префронтальній корі привертається багато уваги, однак на клітинному рівні цей відділ мозку є набагато менш вивченим, ніж гіпокамп або сенсорні зони кори. На даний час виявлено, що пірамідні клітини 6-го шару префронтальної кори підрозділяються на 3 основних групи: два класи кортикоталамічних пірамідних клітин і кортикокортикальні пірамідні клітини. Перший клас кортикоталамічних пірамідних клітин посиляє аксони до специфічних ядер таламуса (вентропостеріо-медіального ядра), другий клас кортикоталамічних клітин - до ретикулярного ядра таламуса. Обидва класи кортико-таламічних пірамідних клітин, як правило, мають добре виражений апікальний відросток з численними розгалуженнями. Аксони цих клітин не утворюють великих горизонтальних колатералей. Апікальні дендрити кортико-кортикальних пірамідних нейронів зазвичай закінчуються в глибоких шарах, а їх аксони поширюються по горизонталі на великі відстані [310]. Електрофізіологічні дослідження показали, що кортикокортикальні пірамідні клітини характеризуються дуже швидкою частотною адаптацією і у відповідь на деполяризуючий ток відповідають тільки 2-3 спайками. Кортикоталамічні пірамідні клітини продовжують відповідати протягом всієї дії деполяризуючого струму, хоча частота потенціалів дії зменшується. Кортикокортикальні клітини в основному з'єднані синаптично з іншими пірамідними клітинами 5-6 шарів, їх синаптичні відповіді характеризуються вираженою депресією [311].

Для кортикоталамічних пірамідних клітин ймовірність знаходження синаптичних зв'язків з іншими нейронами кори в 4 рази нижче, ніж для кортико-кортикальних клітин, а амплітуда ЗПСП менше. Кортикоталамічні

пірамідні клітини контактують як з іншими пірамідними клітинами, так і з інтернейронами. Для постсинаптичних відповідей цих клітин характерна фасилітація [312]. Пірамідні клітини шару 5 ПФК проектується як до інших клітин кори, так і ряду підкіркових структур, які залежно від коркового відділу включають неспецифічні ядра таламуса, ядра чотиригорбикового тіла, моста і спинного мозку. За електрофізіологічними характеристиками пірамідні клітини 5 шару поділяють на два основних типи: залпові нейрони (*intrinsically burst firing*) і нейрони, що регулярно розряджаються (*regular spiking, RS*) [29]. Залпові пірамідні нейрони розряджаються короткими високочастотними пачками потенціалів дії. Зазвичай це великі клітини з довгими апікальними дендритами, аксони цих клітин йдуть до чотиригорбикового тіла або мосту [313]. Пірамідні нейрони, що регулярно розряджаються у відповідь на деполяризацію відповідають одиночними потенціалами дії, частота яких з часом зменшується [314]. Як правило, це невеликі клітини з короткими апікальними дендритами, їх аксони йдуть до кіркових зон іншої півкулі, і до сусідніх пірамідних клітин. Залпові пірамідні клітини 5-го шару отримують безліч збуджувальних входів від пірамідних клітин 3-го шару. Невеликі нейрони, що регулярно розряджаються, практично не мають синаптичних входів від пірамідних нейронів 3-го шару [315]. Пірамідні нейрони 2-3 шарів кори часто синаптично пов'язані з пірамідними нейронами 3-го шару протилежної півкулі [316]. Аксони пірамідних клітин 3-го шару розгалужуються в 2-3 шарах, а також спускаються до 5 шару, де також можуть інтенсивно гілкуватися. В 4 шарі аксони цих клітин практично не утворюють розгалужень [306]. Електрофізіологічно пірамідні клітини 3 шару у гризунів досить однорідні і відносяться до нейронів, що регулярно розряджаються [317].

2.2. Експериментальні моделі епілептиформної активності

В роботі були використані експериментальні моделі набутої епілепсії та ЕФА, а саме модель повторюваних неонатальних судомних епілептичних нападів, спровокованих інгаляцією флуротилу (ФТ) [318–321], модель повторюваної парціальної ЕФА, індукованої локальною інтрацеребральною ін'єкцією бікукуліну [322], літій-пілокарпінова модель скроневої епілепсії [323, 324].

2.2.1. Флуротилова модель повторюваних неонатальних судомних нападів

Клінічні спостереження свідчать про те, що більшість новонароджених дітей з неонатальною епілепсією страждають від кількох нападів протягом перших днів життя [325, 326]. Подібні рекурентні судоми можливо відтворити на тваринах з використанням ФТ-моделі неонатальної епілепсії.

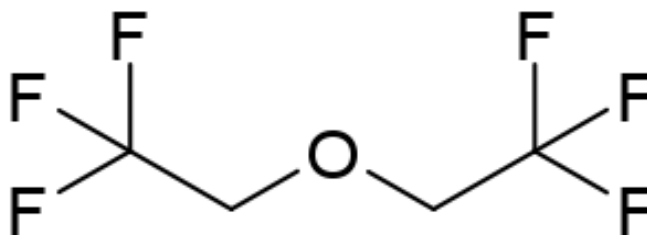


Рис. 2.4. Хімічна структура флуротилу.

Флуротил (Біс- 2, 2, 2 -трифлуротил ефір) є прозорою, безбарвною, легкою рідиною, що належить до класу етерів і є сильнодіючим конвульсантом (**Рис. 2.4**). Механізм збуджуючої дії ФТ вивчений недостатньо,

але вважається, що інгаляція ФТ призводить до пригнічення функції ГАМК-ергічного рецепторного комплексу.

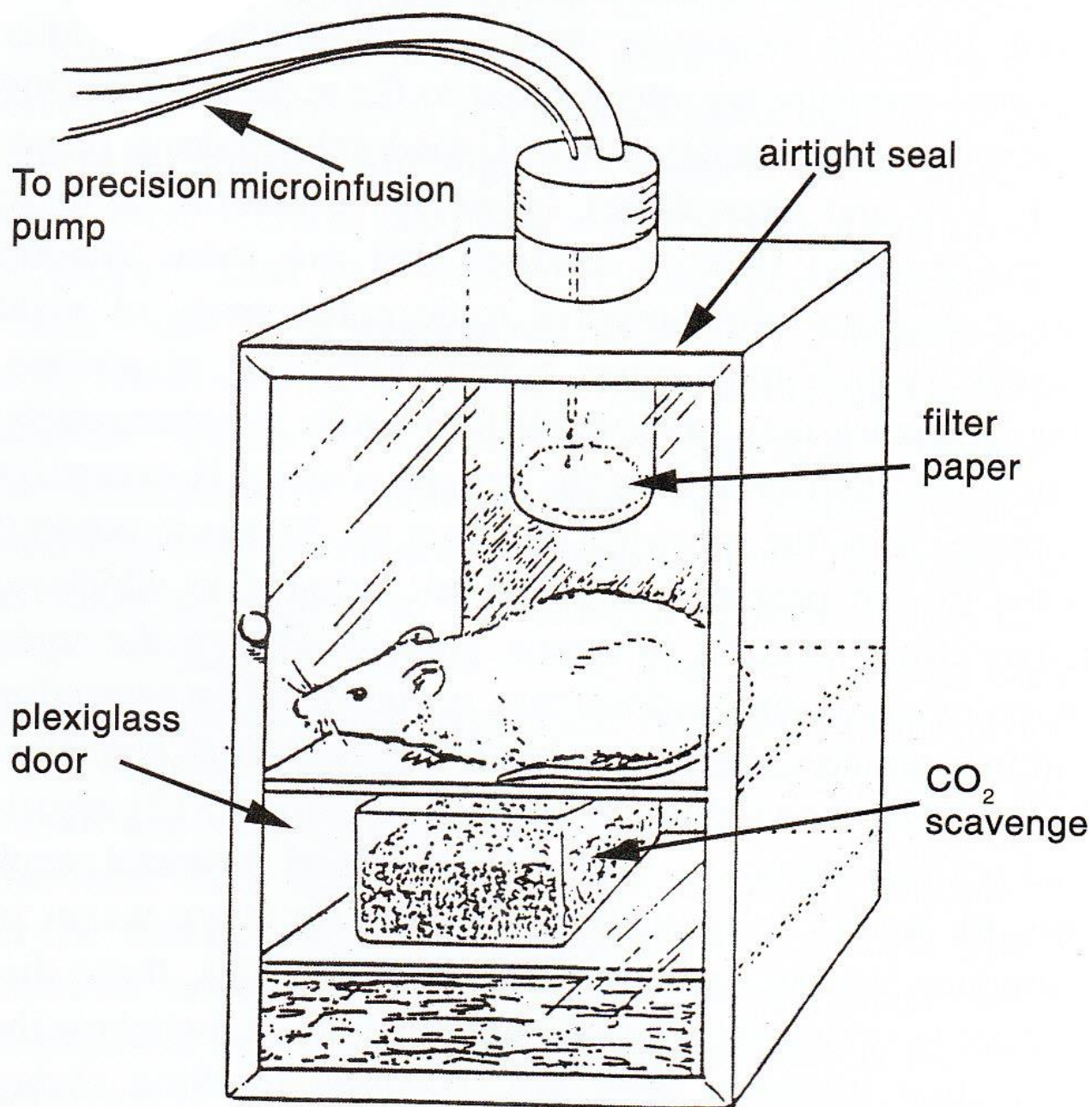


Рис 2.5. Схематичне зображення камери для індукції ФТ нападів. Тварину переміщують у пластикову камеру. З використанням мікроінфузійного насоса, ФТ повільно додається на фільтрувальний папір,

розміщений у верхній частині камери. CO_2 поглинач для підтримання безпечної концентрації CO_2 розміщується у нижній частині камери.

Протокол індукції судомних нападів з використанням ФТ включає переміщення піддослідних тварин в пластикову камеру (**Рис. 2.5**) та повільне (30-40 мкл на хв) додавання ФТ на фільтрувальний папір, розміщений у верхній частині камери. ФТ є вкрай нестабільним і швидко випаровується, наповнюючи камеру. Вдихання тваринами ФТ швидко призводить до епілептичних судомних нападів, що можуть бути припинені протягом десятків секунд після видалення ФТ з камери та її провітрювання. Тварини повністю відновлюють нормальну поведінку протягом 30 хв після провітрювання камери.

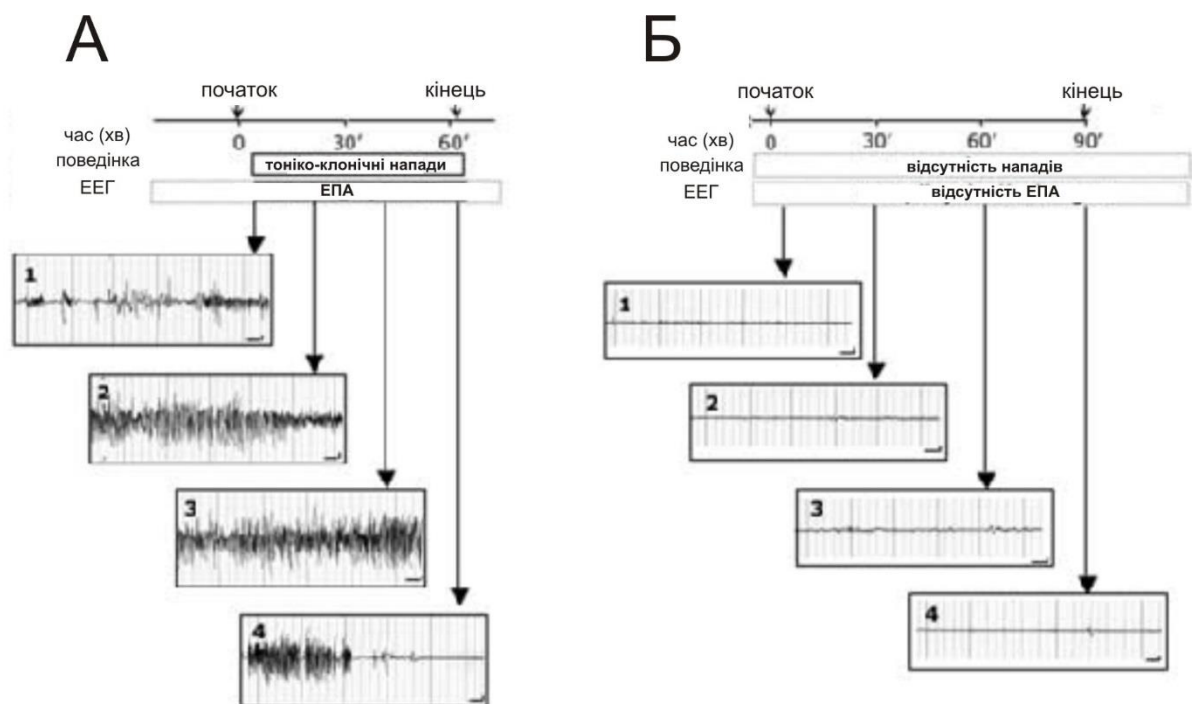


Рис. 2.6. Поведінкові прояви та ЕЕГ під час інгаляції флуоротилу щурами віком 15 діб після народження. Вплив флуоротилу на активність в зоні

CA1 дорсального гіпокампа щурів. 1: Протягом кількох хвилин після потрапляння ФТ в камеру зі швидкістю 30 мкл/хв, на ЕЕГ реєструвались високоамплітудні розряди, комплекси спайк-хвиля, пов'язані з короткими, неритмічними, сильними поштовхами всіх м'язів. Потім спостерігалась високочастотна ЕФА, пов'язана з безперервними тоніко-клонічними судомними нападами. Навіть після зниження швидкості додавання ФТ у камеру до 15 мкл / хв, поведінкові та електрографічні напади спостерігались безперервно, як показано на 20 хв (А-2) і 40 хв (А-3) після введення ФТ. А-4: після видалення флуротилу з камери і провітрювання камери поведінкові напади і електрографічна ЕФА зникали протягом десятків секунд. Б: Приклади позаклітинних потенціалів, відведених від зони CA1 дорсального гіпокампа щурів під час експеримента, де ФТ потрапляв у камеру зі швидкістю 12 мкл / хв. ЕЕГ зареєстровані на 30 хв (Б-2), 60 хв (Б-3), 90 хв (Б-4) не розрізнялись від контрольних записів ЕЕГ (Б-1). Горизонтальний бар 1 с; вертикальний бар 15 мкВ. Рисунок модифіковано з роботи Гіоргі та колег [327].

Як показано на **Рис. 2.6** вдихання тваринами ФТ призводило до епілептичного статусу. В наших дослідях для відтворення повторюваних неонатальних нападів тварин піддавали впливу ФТ на короткий час, кілька разів на добу. У новонароджених щурів, яких використовували у дослідженнях, після додавання ФТ спостерігалися короткотривалі конвульсії, що знаходили прояв у поведінці та віддзеркалювались у характерній ЕФА у складі ЕЕГ. Дана модель дозволяє індукувати до шести короткотривалих нападів на добу. Віковий діапазон тварин, яких використовували в дослідженнях, був обраний з урахуванням прискореного розвитку щурів у порівнянні з людиною і приблизно відповідав другому-третьому триместру вагітності та першому року життя у людини [328]. Кількість судом

індукованих ФТ в наших дослідженнях узгоджувалася з помірною дитячою епілепсією.

В наших експериментах щури знаходились у камері з ФТ до появи тонічних епілептичних нападів, що характеризувались різким напруженням м'язів передніх і задніх кінцівок. Різні фактори можуть впливати на час початку нападу (такі як частота дихання тварини, атмосферний тиск і температура в лабораторії). Тому тривалість часу знаходження щурів в камері залежала тільки від появи тонічних судом, після чого тварину було переміщено в камеру без ФТ. Щури були відокремлені від своєї матері протягом приблизно 10 хв (5 хв в камері з ФТ і 5 хв в камері без ФТ). Індукцію ЕФА проводили кожні 2 години п'ять-шість разів на добу. Щурів дослідної групи повертали до матері, коли вони повністю відновлювалися після нападу. Контрольні тварини підлягали всім відповідним процедурам за виключенням використання ФТ.

Експерименти по дослідженню впливу епілептичних судом, викликаних інгаляцією ФТ, на синаптичну активність в гіпокампі щурів проводили з використанням трьох протоколів обробки щурів ФТ. Перший протокол – для вивчення впливу неонатальних нападів на спонтанні постсинаптичні струми з використанням методики петч-клемп, другий – для дослідження впливу субконвульсивних концентрацій ФТ на спонтанні постсинаптичні струми, а третій – для дослідження впливу неонатальних нападів на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

ПРОТОКОЛ 1.

Щурів піддавали впливу ФТ п'ять разів на добу протягом 5-ти діб, починаючи з другої доби після народження. З 3-ї по 11-у добу після останнього нападу (вік 8-17 діб) щурів використовували для електрофізіологічних

дослідів. Для дослідження впливу неонатальних нападів на частоту, амплітуду та кінетичні характеристики спонтанних гальмівних постсинаптичних струмів (сГПСС) та спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (сЗПСС), використовували сім-вісім тварин на кожну групу (чотири групи: вік 8-10 діб контрольна та ФТ-група, вік 15-17 діб контрольна та ФТ-група). З кожного щура в експериментальних дослідженнях використовували 2 - 4 зрізи мозку.

ПРОТОКОЛ 2

Для дослідження впливів ФТ в концентрації, що не призводила до розвитку ЕФА і судом, сім тварин піддавали впливу ФТ за протоколом № 2. Вибір швидкості додавання ФТ в камеру в цих дослідженнях був заснований на неопублікованих дослідженнях, в яких проводився моніторинг ЕЕГ у щурів під час додавання ФТ в камеру. Встановлено, що додавання ФТ зі швидкістю 3 мкл/хв не призводило до появи електрографічної ЕФА. Щурів дослідної групи піддавали всім процедурам описаним в протоколі № 1, але ФТ додавався в камеру зі швидкістю 3 мкл/хв. З використанням метода петч-клемп встановлено, що амплітуда і частота сГПСС в нейронах контрольної групи та групи щурів, підданих субконвульсивній дозі ФТ не розрізнялась (вік 15-17 діб, $70,6 \pm 6,7$ пА контрольна група та $74,8 \pm 8,1$ пА експериментальна група, $P > 0,05$).

ПРОТОКОЛ 3

У щурів викликали судомні напади п'ять разів на добу протягом десяти діб починаючи з другої доби після народження. Щурів використовували для електрофізіологічних дослідів з 3-ї по 21-у добу після народження (мінімум через 24 год після останнього нападу, спровокованого

ФТ). Для дослідів використовували 24 щура ФТ-групи та 19 контрольних щурів. З кожного щура в експериментальних дослідженнях використовували 1 - 2 зрізи мозку.

Для дослідження впливу неонатальних епілептичних судом на активність ССК мозку використовувався ПРОТОКОЛ 1 з модифікаціями. Для дослідження впливу ФТ судом на синаптичну передачу та збудливість ССК щурів піддавали дії ФТ п'ять-шість разів на добу протягом десяти діб починаючи з другої доби після народження. Для електрофізіологічних дослідів використовували щурів ФТ-групи ($n = 66$) та контрольних щурів ($n = 54$) у віці 20–30 діб, 60–80 діб або 80-90 діб після народження.

Для дослідження впливу неонатальних епілептичних судом на синаптичну пластичність в ССК головного мозку, щурів піддавали дії ФТ п'ять разів на добу протягом п'ятнадцяти діб починаючи з другої доби після народження. Для електрофізіологічних дослідів використовували щурів ФТ-групи ($n = 8$) та контрольних щурів ($n = 9$) у віці 46 - 60 діб після народження.

Для дослідження впливу неонатальних епілептичних судом на активність ПФК головного мозку щурів використовували ПРОТОКОЛ 3 з модифікаціями. У щурів ($n = 9$) викликали загалом 62 - 65 ФТ - індукованих судом починаючи з 6-ї доби після народження (5 - 6 разів на добу).

2.2.2. Бікукулінова модель повторюваної локальної епілептиформної активності в період раннього розвитку.

Для вивчення впливів локальної ЕФА в період раннього розвитку на функціонування ПФК і поведінкові феномени тварин була розроблена бікукулінова (БК) модель повторюваної безсудомної ЕФА.

Ювенільним щурам самцям лінії Спрейг-Доулі (віком 17-19 діб після народження, $n = 25$) імплантували систему ЕЕГ-електрод/канюля в ПФК. В

окремій серії експериментів одночасно імплантували згадану систему в праву ПФК та ЕЕГ-електрод в ліву ПФК або ССК. Докладно процедура імплантації описана в Розділі 2.4.1. Починаючи з 2-4-го дня після операції щурам БК-групи вводили інтрацеребрально БК (0,5 мкл, розчин 200 мкМ) 3-4 рази на добу (загалом 19 ін'єкцій) з використанням мікронасоса, який поставляв розчин зі швидкістю 0,2 мкл на хв. У першу добу щури отримували три ін'єкції БК, в наступні чотири доби щури отримували чотири ін'єкції на добу (загалом 19 ін'єкцій). Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі.

2.2.3. Літій-пілокарпінова модель епілептичного статусу

Як зазначалось вище, для вивчення процесу розвитку набуті епілепсії найчастіше використовуються експериментальні моделі скроневої епілепсії. Основними особливостями скроневої епілепсії зі склерозом гіпокампа є: а) її симптоматичний характер; б) знаходження епілептичного вогнища в лімбічній системі; в) наявність "латентного періоду" після ушкодження до появи перших спонтанних епілептичних нападів; г) наявність склерозу гіпокампа, що призводить до реорганізації нейронних мереж. Багато з цих характеристик можуть бути відтворені на гризунах з використанням системної ін'єкції агоніста холінергічних рецепторів, пілокарпіну гідрохлориду. Було показано, що системне введення високих концентрацій пілокарпіну може призводити до порушення ГЕБ та розвитку генералізованих епілептичних нападів внаслідок потрапляння цієї речовини до мозку [85]. Найчастіше в експериментальних дослідженнях використовують два протоколи введення пілокарпіну: у високих дозах (300-400 мг/кг) або у низьких дозах (30-50 мг/кг) в комбінації з хлорідом літію, який помітно посилює проепілептичний ефект пілокарпіну. Обидва експериментальних

протоколи, однак, пов'язані з високим рівнем смертності тварин. З метою зниження смертності ініціацію ЕС проводили шляхом багаторазового введення низьких доз пілокарпіну в комбінації з введенням хлориду літію, як описано раніше [324]. Щурам внутрішньочеревинно (ВЧ) вводили хлорид літію (127 мг/кг, 1 мл/кг). Через 19-20 год після введення літію тваринам починали вводити пілокарпін в 0,9 % розчині хлориду натрію (10 мг/кг, ВЧ) з інтервалом 30 хв. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин в еквівалентному об'ємі. Введення пілокарпіну припиняли, коли у щурів розвивалася V стадія епілептичних нападів за шкалою Расіна [329]. Загальна доза введеного пілокарпіну коливалася в діапазоні від 10 до 50 мг/кг. В наших дослідах напади введення пілокарпіну спричиняло напади V стадії 74-х з 76-ти щурів. Тварини, резистентні до ін'єкцій, були виключені з подальшого аналізу. Час початку ЕС варіював у діапазоні від 26-ти до 150-ти хв (середній час початку ЕС становив $78,8 \pm 4,5$ хв). Для проведення подальших гістологічних та поведінкових досліджень напади припиняли з використанням севофлюрану через 90-120 хв після початку ЕС (напади припиняли раніше, ніж через дві години у разі, якщо у щурів спостерігалися загострення перебігу судом). Для електрофізіологічних досліджень у тварин, що підлягали операції з імплантації електродів у мозок, судоми були припинені через одну годину після початку ЕС [330]. Після припинення судом щурам вводили декстрозу (5 %) в лактатному розчині Рінгера три рази на добу протягом трьох діб, годували молоком (із шоколадним смаком) тричі на добу, доки вони не були здатні самостійно харчуватися. Кількість споживаної твариною їжі та води визначали відносно маси залишку корму і води в кожній клітці щоденно протягом двох тижнів після ЕС. Щурі перебували під візуальним моніторингом та зважувались лаборантом щодня протягом 11 діб після ЕС.

Специфічний блокатор ПАР1, SCH79797, (ЕС+SCH група) або відповідний об'єм розчинника (група ЕС + розчинник) вводили ВЧ через 20-

30 хв після припинення ЕС. Після цього ін'єкції речовин повторювали один раз на добу протягом 10-ти діб. SCH79797 вводили в концентрації 25 мкг/кг. Встановлено, що ця концентрація блокатора ПАР1 є оптимальною для зменшення некрозу серцевих м'язів, спричиненого експериментальною ішемією, та для оптимального зниження набряку мозку і поліпшення стану тварин після травми головного мозку [331, 332].

2.3. Електрофізіологічні дослідження *in vitro*

Електрофізіологічні дослідження *in vitro* проводили на свіжо-ізолюваних зрізах мозку щурів. Загалом в роботі були використані наступні електрофізіологічні методи:

1) Для дослідження впливу ЕФА на синаптичну пластичність в ССК і мПФК та чутливість ССК щурів до аплікації проепілептичних агентів проводили зовнішньоклітинну реєстрацію потенціалів поля у зрізах мозку щурів;

2) Для дослідження впливу ЕФА на активність нейронів різних ділянок мозку проводили реєстрацію мембранних потенціалів та струмів з використанням методу петч-клемп в конфігураціях, відповідно, «cell-attached» та ціла клітина. Дослідження постсинаптичних струмів в нейронах мПФК і ССК щурів віком 60-80 діб після народження проводили при кімнатній температурі (22-24°C). Інші *in vitro* електрофізіологічні дослідження проводили при температурі 32°C.

2.3.1. Виготовлення свіжоізольованих зрізів мозку щурів.

Зрізи мозку виготовляли в день проведення електрофізіологічних дослідів. Перед декапітацією тварину анестезували з використанням ізофлюрану або севофлюрану. За допомогою шпателя мозок діставали із черепної коробки та розміщували у чашці Петрі, заповненій льодяним оксигенованим (95% – O₂/ 5% – CO₂) базовим розчином ACSF (штучна цереброспінальна рідина) наступного складу (у мілімолях на 1л): NaCl, 126; KCl, 3,5; CaCl₂, 2,0; MgCl₂, 1,3; NaHCO₃, 25; NaH₂PO₄, 1,2; глюкоза, 11 (pH 7,3). Мозок розміщували у охолодженій камері вібратома (SYS-NVLS, World Precision Instr., USA), яка була заповнена льодяним оксигенованим розчином ACSF.

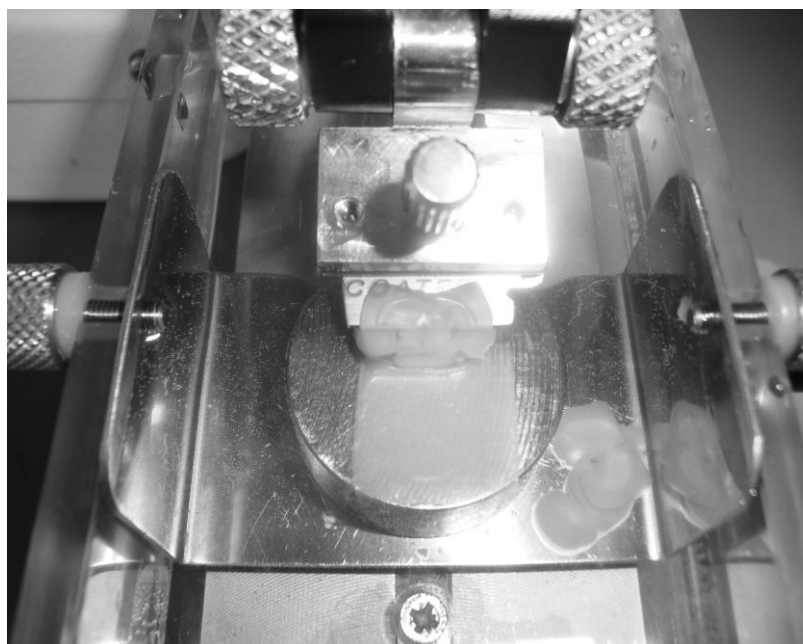


Рис. 2.7. Виготовлення свіжоізольованих зрізів мозку.

В експериментах по дослідженню впливу неонатальних нападів, викликаних ФТ, на синаптичну активність нейронів гіпокампа та ССК всі маніпуляції при приготуванні зрізів виконували в охолодженому

модифікованому розчині наступного складу (у мілімолях на 1л): сахароза, 250; KCl, 2; CaCl₂, 0,5; MgCl₂, 7; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1,2; глюкоза, 11 (pH 7,4).

Нарізки зрізів здійснювали із інтервалом у 400-500 мкм і високим рівнем вібрації леза. Готові зрізи розташовували в інкубаційній камері, яка представляла собою склянку, всередині якої розміщувалася капронова поверхня, на яку й переносили зрізи (**Рис. 2.8**). Камеру заповнювали базовим оксигенованим розчином ACSF кімнатної температури. Зрізи інкубували у камері щонайменше одну годину перед початком експерименту.



Рис. 2.8. Інкубаційна камера для свіжоізолюваних зрізів

2.3.2. Позаклітинне відведення фокальних потенціалів у зрізах мозку щурів.

Позаклітинне відведення потенціалів поля у зрізах мозку щурів здійснювали із використанням двоканального диференціального підсилювача

змінного струму (А-М Systems, США, смугопропускання 0,1 Гц-1 кГц; коефіцієнт підсилення X100) та скляних мікроелектродів (1-3 МОм), заповнених ACSF. Для реєстрації зрізи мозку розміщували у термостатичну камеру повністю зануреного проточного типу (Warner Instrument Corp., США). Швидкість перфузії оксигенованого розчину ACSF у камері становила 2 мл/хв (30-32°C). Записи оцифровували із використанням аналогово-цифрового перетворювача NI PCI-6221 (National Instruments, США) або Digidata 1320 (Axon Instruments, США) та накопичували на комп'ютері за допомогою програм WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобританія) або Clampex 9 (Axon Instruments, США).

2.3.2.1. Реєстрація епілептиформної активності

Фокальні потенціали відводили позаклітинно від шарів 2 / 3 та 5 / 6 ССК у зрізах контрольних тварин та щурів ФТ-групи у віці 20-30, 60-80 або 80-90 діб після народження. Для індукції ЕФА в зрізах мозку використовували кілька *in vitro* моделей нападів. В двох із них ЕФА викликали додаванням до позаклітинного розчину специфічних блокаторів гальмівної синаптичної передачі габазіну (1 і 10 мкМ) або бікукуліну (1, 5 і 10 мкМ). Для індукції ЕФА в низькомагнієвій моделі із позаклітинного розчину вилучали $MgCl_2$. Для індукції ЕФА в 4-амінопіридиновій моделі в цей розчин додавали блокатор калієвих каналів 4-амінопіридин (4-АП) у концентрації 50-100 мкМ.

Термін ЕФА використовували для опису іктально- або інтеріктальноподібної активності. Інтеріктальноподібна активність була визначена як короткі низькочастотні фокальні потенціали високої амплітуди, що спостерігали в ізоляції на тлі нормальної активності. Термін іктальноподібна активність використовували для опису високо синхронних

розрядів із частотою більше ніж 1 c^{-1} та тривалістю більш ніж 10 с. Під час іктальноподібної активності спостерігали тонічні та клонічні ритми. Тонічними ритмами була визначена повторювана низькоамплітудна високочастотна активність. Клонічними ритмами визначали високоамплітудні поодинокі або множинні спайки та поліспайк-хвильові розряди, що чергувалися з низькоамплітудними уповільненнями активності. Тонічні і клонічні ритми також спостерігаються на реєстраціях ЕЕГ у людей і корелюють з тонічною і клонічною поведінкою під час нападів, тому ці терміни були використані в наших дослідженнях *in vitro* для опису різних форм ЕФА.

2.3.2.2. Метод дослідження розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

Для оцінки розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі використовували метод описаний в деталях раніше [93]. Позаклітинні потенціали дії (ПД) відводили від зони СА3 пірамідного шару гіпокампа з використанням металевих електродів діаметром 50 мкМ (California Fine Wire, США) та саморобного підсилювача з підвищеною здатністю до пригнічення електромагнітного шуму (смугопрпускання 0,1 Гц - 4 кГц; посилення X1000). Після 10-15 хв реєстрації ПД в базовий розчин ACSF додавали агоніст ГАМК_A-рецепторів ізогувацин (10 мкМ) протягом 1 хв, для активації цих рецепторів [333]. В попередніх дослідах на пірамідних нейронах шару СА3 гіпокампа, з використанням методики петч-клемп в конфігурації ціла клітина, показано, що додавання ізогувацину в позаклітинний розчин призводило до активації іонних струмів чутливих до антагоніста ГАМК_A-рецепторів, бікукуліну. Оцінку розвитку гальмівної

функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі проводили, визначаючи ефекти додавання агоніста ГАМК_A-рецепторів ізогувацину на частоту потенціалів дії (ПД).

2.3.2.3. Реєстрація викликаних постсинаптичних потенціалів та індукція синаптичної пластичності.

Вивчення впливів ЕФА в період раннього розвитку на викликані постсинаптичні потенціали (ВПСП) та синаптичну пластичність здійснювали в зрізах ССК та мПФК. Експерименти проводили на щурах контрольної і ФТ-груп віком 45-60 діб після народження. Зрізи мозку переносили до термостатичної камери повністю зануреного типу (Warner Instrument Corp., США), в яку постійно додавався оксигенований ACSF зі швидкістю 2 мл/хв. ВПСП відводили за допомогою скляних мікроелектродів (1-4 МОм), заповнених ACSF, з додаванням блокатора гальмівної синаптичної передачі габазіну (SR 95531) в концентрації 50 мкМ, та з використанням двоканального диференціального підсилювача змінного струму (А-М Systems, США). Електричну стимуляцію проводили за допомогою стимулятора з ізольованим виходом ISO-Flex ("AMPI", Ізраїль) та біполярного стимуляційного електрода (FHC Inc., США). ВПСП викликали прямокутними імпульсами тривалістю 0,1 с. Записи оцифровували із використанням аналоговоцифрового перетворювача (NI PCI-6221, National Instruments, США) та накопичували на комп'ютері за допомогою програми WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобританія).

Для реєстрації ВПСП в ССК здійснювали подразнення четвертого шару ССК та фіксували постсинаптичні потенціали у другому шарі відповідної колонки. У мПФК подразнювали шари 5 або 2/3, а ВПСП

відводили від шару 5. Для реєстрації базової синаптичної активності, наносили прямокутні (0,1 с) стимули амплітудою 30-80 мкА здатні викликати 50 % від максимальної амплітуди ВПСР. Подразнення наносили кожні 30 с. Запис стабільної базової активності тривав 10-30 хв. Короткотривалу депресію вимірювали під час прикладання серії із 10-15 стимулів з частотою повторення 50-100 с⁻¹ [334].

Для індукції фасилітації/депресії синаптичних відповідей використовували протокол парної стимуляції [335]. Інтервал між стимуляціями варіював від 10 до 400 мс. Фасилітацію/депресію ВПСР в цих дослідках визначали як співвідношення амплітуди або нахилу другого ВПСР (A2) до амплітуди або нахилу першого ВПСР (A1), тобто $A2/A1 * 100 \%$. Для індукції короткотривалої посттетаничної потенціації використовували протокол короткої тетаничної стимуляції (15 прямокутних імпульсів, тривалістю 0.1 с і частотою 50 с⁻¹) [319, 336]. Для індукції довготривалої потенціації використовували протокол стимуляції описаний раніше [337]. Стимуляцію здійснювали в два етапи: спочатку прикладали «кондиціонуючий» стимул, а через 170 мс після нього здійснювали коротку тетаничну стимуляцію (10 стимулів частотою 100 с⁻¹). Протокол повторювали п'ять разів з інтервалом у 10 с. Після стимуляції потенціацію синаптичних відповідей вимірювали протягом 50-60 хв.

2.3.3. Реєстрація постсинаптичних струмів та потенціалів дії від поодиноких нейронів.

Для реєстрацій постсинаптичних струмів або ПД зрізи мозку переносилися у термостатичну камеру повністю зануреного типу (Warner Instrument Corp., США), де вони постійно перфузувалися оксигенованим ACSF (в експериментах на нейронах ССК та ПФК головного мозку) або

модифікованим оксигенованим ACSF (в експериментах на нейронах гіпокампа) зі швидкістю 2 мл/хв наступного складу (у мілімолях на 1л): NaCl, 126; KCl, 3,5; CaCl₂, 4,0; MgCl₂, 4,0; NaHCO₃, 25; NaH₂PO₄, 1,2; глюкоза, 11 (рН 7,3). В досліджах використовували високі концентрації двовалентних іонів (4/4 мМ Ca²⁺/Mg²⁺) для зниження нейронної активності [338].

Спонтанні гальмівні та збуджувальні постсинаптичні струми вимірювали з використанням методу «петч-клемп» в конфігурації ціла клітина. Для виготовлення тонких мікроелектродів використовували стандартні трубки з тугоплавкого боросилікатного скла (GC150F-15) з капіляром усередині. Готовий мікроелектрод заповнювали розчином наступного складу (у мілімолях на 1л): Cs-глюконату, 117,5; CsCl, 17,5; NaCl, 8; HEPES, 10; EGTA, 10; Na₃GTP, 0,2; MgATP, 2 (рН 7.3). У більшості експериментів використовували мікроелектроди, заточені до опору 5-7 МΩ. Реєстрації постсинаптичних струмів здійснювали з використанням підсилювача Axopatch 200B (Axon Instruments, США).

Спонтанні гальмівні постсинаптичні струми (сГПСС) реєстрували при підтримуваному потенціалі 0 мВ (потенціал реверсії для збуджувальних постсинаптичних струмів). Додавання 15 мкМ бікукуліну або 10 мкМ габазіну в позаклітинний розчин призводило до повного і зворотнього пригнічення сГПСС вказуючи на те, що ці струми опосередковані активацією ГАМК_A-рецепторів. Реєстрацію спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів (сЗПСС) опосередкованих активацією АМПА- або НМДА-рецепторів здійснювали при відведенні від одного й того ж самого нейрона за присутності 15 мкМ бікукуліну або 10 мкМ габазіну в позаклітинному розчині та при підтримуваних потенціалах, відповідно, -80 мВ і + 40 мВ [338]. В попередніх роботах встановлено, що ЗПСС, які реєстрували при підтриманому потенціалі -80 мВ та за присутності в позаклітинному розчині концентрації іонів Mg²⁺ більше, ніж 2 мМ, повністю блокуються антагоністами АМПА-рецепторів, що

свідчить про те, що ці струми, опосередковані активацією АМПА-рецепторів [339], тому ми не використовували блокатори НМДА-рецепторів при вимірюванні АМПА-компонента сЗПСС. У записах збуджувальних постсинаптичних струмів при підтримуваному потенціалі +40 мВ, сЗПСС складаються з двох компонентів, відповідно, опосередкованих активацією АМПА- та НМДА-рецепторів. Тому для відокремлення НМДА-компонента сЗПСС в позаклітинний розчин додавали антагоніст АМРА- та каїнатних рецепторів 6-ціано-7-нітрохіноксалін-2,3-діон (CNQX) (10 мкМ). В цих дослідах додавання в позаклітинний розчин антагоніста D-аміно-5-фосфовалеріанової кислоти (D-APV, 50 мкМ) призводило до повного блокування сЗПСС, що вказує на те, що ці струми опосередковані активацією НМДА-рецепторів.

Мініатюрні ГПСС та ЗПСС вимірювали за методикою реєстрації сПСС і за присутності позаклітинному розчині блокатора потенціал-залежних натрієвих каналів тетродотоксину (TTX) в концентрації 1 мкМ для пригнічення синаптичної відповіді залежної від ПД.

Для реєстрації локальних ПД від поодиноких нейронів ССК використовували метод «петч-клемп» в конфігурації «cell-attached». Пірамідні нейрони та інтернейрони були візуально ідентифіковані за морфологічними ознаками з використанням мікроскопа Olympus BX51WI з оптикою Номарського. Для запису ПД використовували петч-піпетки заповнені ACSF, опір піпеток становив 1-3 МΩ.

2.4. Електрофізіологічні дослідження *in vivo*

2.4.1. Процедура імплантації ЕЕГ-електродів.

Для електрофізіологічних досліджень описаних в Розділі 6.1 проводили операцію з імплантації системи ЕЕГ-електрод/канюля (Plastics One, США) в мПФК правої півкулі[322]. В окремій серії експериментів проводили одночасну імплантацію системи ЕЕГ-електрод/канюля в мПФК правої півкулі та ЕЕГ-електрод в мПФК лівої півкулі або в ССК (**Рис. 2.9**).

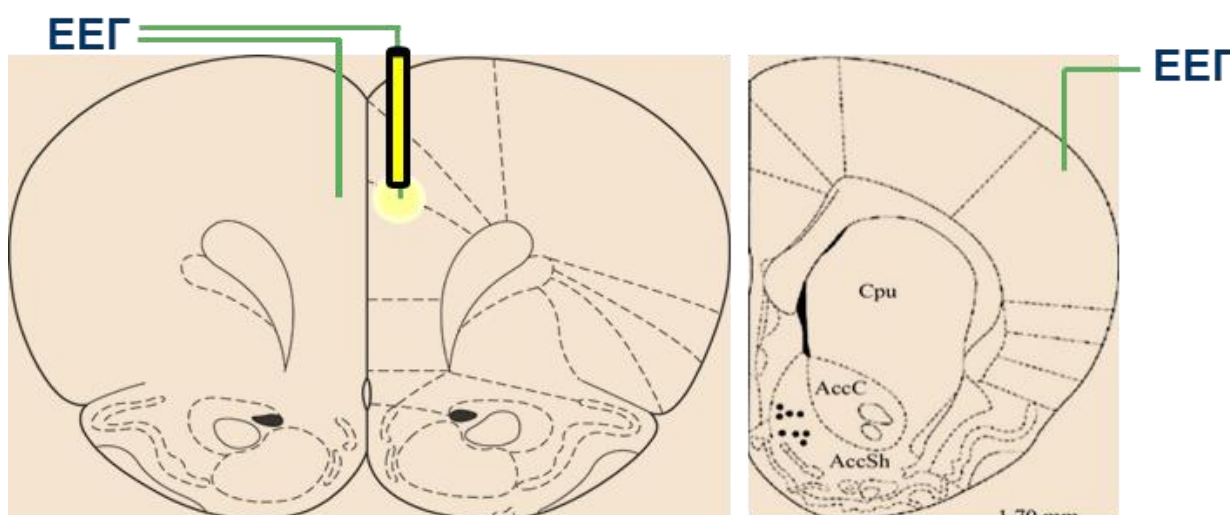


Рис. 2.9. Схематичне зображення розташування системи ЕЕГ-електрод/канюля і відводних електродів в мозку щурів.

Під час операції використовували загальну анестезію із застосуванням ізофлурану. Введення у наркоз за допомогою ізофлурану розпочинали (перші 3-5 хв) із застосування концентрації 4 %. Хірургічний рівень анестезії підтримували за допомогою 1,0 - 2,5% ізофлурану в суміші з киснем 2-3 % [340, 341]. Систему ЕЕГ-електрод/канюля або ЕЕГ-електрод

імплантували в мПФК використовуючи наступні координати: 3,0 мм каудальніше брегми (AP); 0,8 мм латеральніше середньої лінії (ML); 2,5 мм нижче твердої мозкової оболонки (DV). ЕЕГ-електрод в ССК імплантували використовуючи наступні координати: AP = 3,0 мм; ML = 4,9 мм; DV = 2,5 мм. Два мікрогвинти вкручували в лобову кістку для забезпечення кращої фіксації імпланту. Референсний електрод імплантували в мозочок. Кріплення електродів або системи ЕЕГ-електрод/канюля на черепі здійснювали за допомогою протакрилу. Після операції тваринам ВЧ вводили 5 мг/кг кетопрофену кожні 4 години для забезпечення анагезуючої та протизапальної дії.

Для електрофізіологічних досліджень описаних в Розділі 7.4, проводили операцію з імплантації відвідного електроду в зону CA1 дорсальної частини гіпокампа[342, 343]. Тварин анестезували з використанням севофлурану (4% - індукція наркозу, 1,5-2,0 % - підтримка наркозу) в носії O₂. Лідокаїн в концентрації 5 мг/кг вводили підшкірно до операції і в кінці операції для забезпечення додаткової локальної анагезії. Біполярний металевий електрод (діаметр 50 мкм; California Fine Wire, США) імплантували в правий дорсальний гіпокамп, використовуючи наступні координати: AP = 3,7; ML = 2,5; DV = 2,0. Референсний електрод імплантували в мозочок. Два додаткових мікрогвинти вкручували в лобову кістку для забезпечення кращої фіксації електродів. Кріплення електродів на черепі здійснювали за допомогою протакрилу. Після операції з імплантації відвідних електродів тваринам давали відновитися протягом 7-10 діб до проведення подальших дослідів. Після операції тварин утримували окремо у клітках при режимі 12 год світло / темрява з вільним доступом до їжі та води.

2.4.2. Реєстрація зовнішньоклітинних потенціалів *in vivo*

Записи фокальних потенціалів *in vivo* проводили з використанням диференціального підсилювача (A-M Systems, США) (смугопропускання 1 Гц-10 кГц, підсилення X1000). Сигнали оцифровували за допомогою аналого-цифрового перетворювача (National Instruments Corp., США) і записували, використовуючи програмне забезпечення WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобританія).

Ефекти інтрацеребральних ін'єкцій бікукуліну щодо вірогідності виникнення ЕФА та судом, реєстрували, відводячи ЕЕГ локально (на відстані 100-200 мкм від місця ін'єкції) після ін'єкцій бікукуліну в мПФК, протягом 30 хв або 72 год після останньої ін'єкції. Одночасну реєстрацію масових потенціалів в ПФК обох півкуль головного мозку, а також реєстрацію таких потенціалів у ССК здійснювали протягом перших 24 год після ін'єкції бікукуліну. Відео моніторинг тварин проводився у режимі реального часу з метою відстеження судомних нападів.

Відведення потенціалів від зони CA1 гіпокампа (60 хв/добу) проводили протягом двох діб перед індукцією епілептичного статусу (ЕС), а потім кожну добу протягом 14-ти діб. Інтеріктальна активність була визначена як короткі низькочастотні польові потенціали високої амплітуди, які відбувалися в ізоляції на тлі нормальної активності. Електрографічними нападами були визначені ритмічні спайки частотою 1 Гц або більше, які тривали щонайменше 10 с. Ми не спостерігали будь-якої ЕФА в записах від щурів контрольної групи. З метою відстеження судомних епілептичних нападів відеомоніторинг тварин проводили у режимі реального часу під час ЕЕГ-реєстрацій, а також протягом одного тижня (12 год./добу) через 3,0 - 3,5 місяця після індукції ЕС. Поведінкові напади тривали 20 - 40 с, а їх тяжкість порівнювалась до IV-V стадії за шкалою Расіна [329].

2.5. Гістологічні методи дослідження

2.5.1. Приготування зрізів мозку для гістологічних досліджень

У гістологічних дослідженнях використовували вісім щурів з історією ЕС, спровокованого ін'єкціями пілокарпіну (група ЕС + розчинник: $n = 4$, і група ЕС + SCH: $n = 4$). Контрольна група щурів (контроль + розчинник, $n = 4$) відповідного віку отримувала всі ін'єкції, за винятком пілокарпіну, який був заміщений фізіологічним розчином. Тварини з ЕС отримували дві ін'єкції (на 20-30 хв після припинення ЕС і 24 год пізніше) SCH79797 або розчинника. Через 48 год після припинення ЕС щурам ЕС-груп та щурам контрольної групи вводили ВЧ кетамін (70 мг/кг, Pfizer, Фінляндія) і ксилазін (2,5 мг/кг, Bayer, Німеччина) для загальної анестезії. Анестезованих щурів транскардіально перфузували 20 мл фосфатно-буферного розчину (ФБ; 0,1 М, рН 7,4) з гепарином (15 од./мл), після чого додавали 50 мл 4% розчину параформальдегіду (PFA, Sigma, США) в ФБ. Гіпокампи виділяли, фіксували протягом 24 год при температурі 4°C в 4 % PFA і ретельно промивали в 0,1 М ФБ. Поперечні зрізи дорсальної частини гіпокампа товщиною 30-50 мкм отримували з використанням вібратору (Leica Biosystems, США). Зрізи витримували в 0,1 М ФБ з 0,02% азиду натрію протягом 4-8 тижнів при температурі 4°C до проведення гістологічних досліджень.

2.5.2. Імуногістохімічні методи дослідження

Зрізи промивали в 0,1 М ФБ, кріопротектували сумішшю 20 % ДМСО і 2 % гліцеролу в ФБ впродовж 60-ти хв і пермеабілізували шляхом триразового заморожування / відтавання (-20 °C). Потім зрізи блокували 0,5 % нормальною козячою сироваткою і 1 % альбуміном бичачої сироватки в 0,1 М

ФБ (блокуючий розчин) протягом 1-ї год при кімнатній температурі, та інкубували протягом ночі при 4°C з первинними антитілами: анти-тромбін НС поліклональні антитіла кози (1:100); анти-тромбін рецептор (ПАР) поліклональні антитіла кролика (1:100); анти-NeuN моноклональні антитіла, клон А60 (1:1000); анти-гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) моноклональні антитіла, клон GA5 (1:1000) у блокуючому розчині. Для забарвлення ядер клітин препарати додатково обробляли розчином DAPI (4,6-діамідіно-2-феніліндол).

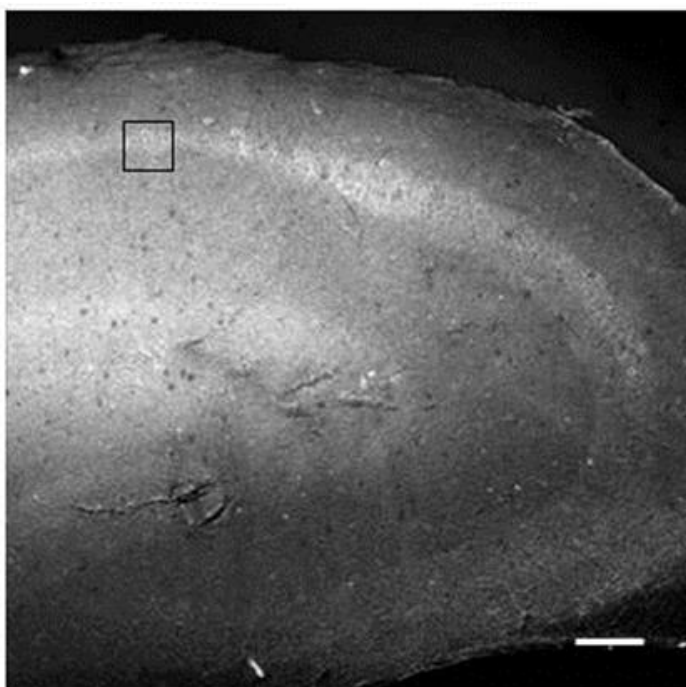


Рис. 2.10. Ділянка гістологічного аналізу позначена білим квадратом на зрізі гіпокампа (масштаб 500 мкм).

Зрізи ретельно промивали в 0,1 М ФБ та інкубували впродовж 90 хв при кімнатній температурі в 0,1 М ФБ, що містив 1 % альбуміну бичачої сироватки та відповідні вторинні антитіла: Alexa 568-кон'юговані осячі анти-козячі антитіла (1:800; -11057); Alexa 647-кон'юговані осячі анти-кроликові антитіла (1:800; -31573); Alexa 488-кон'юговані осячі анти-мишачі антитіла

(1:800; -21202). Контрольні зрізи інкубували без додавання первинних або вторинних антитіл. Потім зрізи тричі промивали в 0,1 М ФБ, і переносили на предметні скельця для конфокальної мікроскопії. На **Рис. 2.10.** представлено зріз гіпокампа з виділеною ділянкою зони СА1 гіпокампа, де був проведений гістологічний аналіз. Імунофлуоресцентні зображення отримували з використанням конфокального мікроскопу FluoView™ FV1000 (Olympus America Inc., США) Гістологічний аналіз здійснювали з використанням програмного забезпечення ImageJ (Національний інститут охорони здоров'я, США). Дані представлені в умовних одиницях (у.о.) та кількісно виражені як іммунопозитивна зона флуоресценції (тромбін+, ПАР+) на мм².

2.5.3. Візуалізація нервових клітин за допомогою тіонінового забарвлення.

Візуалізацію нервових клітин здійснювали за допомогою світлової мікроскопії та тіонінового забарвлення. Зрізи промивали в 0,1 М ФБ, переносили на покриті желатином скельця, знежирювали та дегідратували за зростаючими концентраціями спиртів (50 %, 70 %, 96 % на 2 хв), сушили на повітрі при 37°C і забарвлювали 0,02 % тіоніном в 70 % етанолі протягом 30 с. Потім зрізи промивали впродовж однієї хвилини з використанням 70 % і 96 % етанолу, сушили на повітрі при 37°C і покривали скельцем, покритим гістологічним середовищем Pertex (Leica Biosystems, США). Зображення отримували при роздільній здатності 1744 × 1308 за допомогою конфокального мікроскопа FluoView™ FV1000 (Olympus Inc., США) і фазово-контрастного об'єктиву (40×). Кількісний аналіз базувався на загальних значеннях від двадцяти зрізів у кожній експериментальній групі. Для аналізу

враховували лише інтактні клітини, конденсовані і пошкоджені клітини були виключені з аналізу. Дані представлені як кількість клітин на 1 мм².

2.6. Поведінкові тести

Всі поведінкові тести проводили на щурах контрольної та «бікукулінової» (БК)-групи у віці 45-50 діб після народження.

2.6.1. Апарат для проведення тесту на рівень поведінкової гнучкості та «затриманого-невідповідного-до-проби»-тесту

Апарат для проведення тесту на поведінкову гнучкість та «затриманого-невідповідного-до-проби (ЗНВП)»-тесту (Med Associates Inc., США) являв собою звукоізолюючу камеру, на одній стіні якої розташовували два висувні важелі (між ними поміщався дозатор для їстівних кульок), а на протилежній - отвір з інфрачервоною лампою (**Рис. 2.11**). Над кожним з важелів та отвором для носу тварини на протилежній стороні камери були розміщені сигнальні лампочки. В якості винагороди тваринам впродовж тесту використовували харчові кульки (45 мг Noyes; Research Diets Inc, США). Управління апаратом та оцінку поведінки тварин під час тестів здійснювали з використанням програмного забезпечення (Med Associates Inc., США). Для дослідження поведінки щурів оцінювали кількість натискань тварини на кожен з важелів та кількість здобутих винагород за сесію.



Рис. 2.11. Апарат для проведення тесту на рівень поведінкової гнучкості та «затриманого-невідповідного-до-проби»-тесту

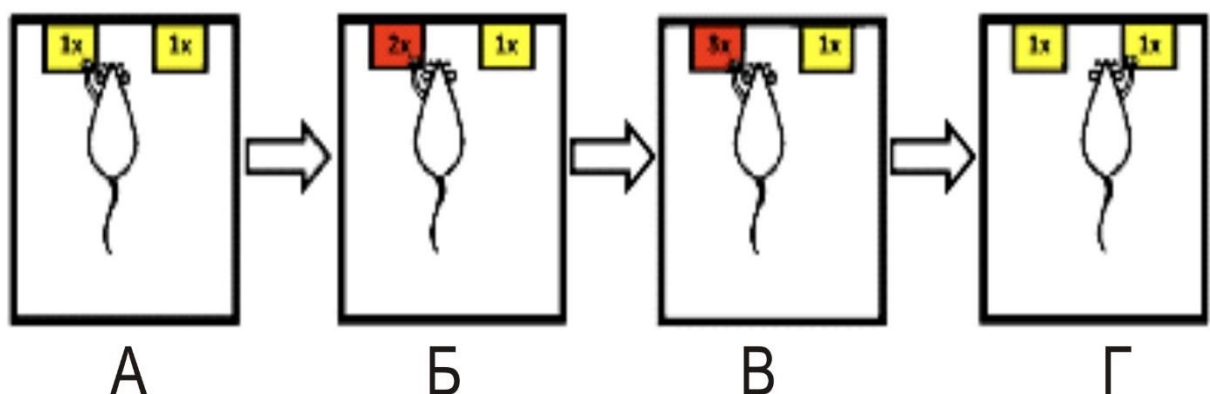
Також протягом виконання ЗНВП-тесту оцінювали кількість перегороджень отвору носом тварини, кількість успішно виконаних завдань і кількість помилок (бездіяльності) зроблених під час навчання і тесту. Помилкою вважали будь-який випадок, коли очікувалося реагування піддослідної тварини, але вона не реагувала. Такі помилки інтерпретуються як дефіцит уваги.

Перед поведінковими експериментами, тварини були акліматизовані в експериментальній камері протягом не менше двох годин. Не менше ніж за 24 год до навчання і тестування щурів контрольної та БК-групи позбавляли їжі. Впродовж поведінкових тестів тварин годували 14,5 г їжі на добу. Масу тіла тварин реєстрували щодня. В цілому маса тіла не зменшувалася більш ніж до 85-90 % від початкового рівня. Вага піддослідних тварин статистично не

розрізнялася між групами і становила $242,9 \pm 3,6$ г в контрольній групі та $232,6 \pm 4,0$ г в БК-групі ($p = 0,4$).

2.6.2. Тест на рівень поведінкової гнучкості

Щурів розміщували в експериментальну камеру описану в Розділі 2.6.1. і навчали пов'язувати натискання важеля з отриманням винагород (їжі). Правий і лівий важелі були постійно доступні і кожне натискання призводило до однієї харчової винагороди. Вважалось, що щури пройшли початковий етап навчання, коли обидва важеля були натиснуті принаймні один раз, і 15 або більше винагород здобуті впродовж 30-хв сесії. Після успішного складання початкового етапу навчальної парадигми, проводили тест на поведінкову гнучкість.



2.12. Протокол тестування рівня поведінкової гнучкості (А) Тварина отримує винагороду, натиснувши будь-який з двох важелів. (Б, В) Якщо тварина віддає перевагу одному з двох важелів, їй, щоб отримати винагороду (їжу), потрібно виконати додаткові натискання. (Г) Для того, щоб уникнути ускладнення завдання, тварина повинна одноразово натиснути протилежній важіль.

Впродовж тесту на поведінкову гнучкість, спочатку щури отримували п'ять винагород, натиснувши на лівий або правий важіль один раз (**Рис.**

2.12А). Після перших п'яти винагород при натисканні одного з важелів, щуру, щоб здобути винагороду, потрібно було здійснити додаткове натискання на цей важіль (**Рис. 2.12Б**). Якщо щур продовжував віддавати перевагу одному важелю, кількість потрібних натискань для одержання винагороди збільшувалося до трьох і більше (**Рис. 2.12В**). Для того, щоб уникнути ускладнення завдання тварині потрібно було одноразово натиснути протилежний важіль (**Рис. 2.12Г**). Отже, найбільш вигірною стратегією максимізації кількості винагород було постійне перемикання з одного важеля на другий.

2.6.3 «Затриманий-не-відповідний-до- проби»-тест

Перед ЗНВП-тестом піддослідні тварини проходили кілька блоків підготовчого тренування:

I та II) тренування піддослідної тварини тиснути будь-який з двох запропонованих важелів та отримувати їжу. Доступ до важелів закривався після натискання або через 5 с після початку експерименту. Щури одержували їжу після того, як закривався доступ до важелів (I), або тільки після натискання на один з важелів (II);

III та IV) тренування піддослідної тварини тиснути «референтний» важель і перегороджувати носом отвір, розташований на протилежній стінці камери, в камері без (III) або з (IV) освітленням. Тварина отримувала їжу тільки після успішного виконання цього завдання;

V) тренування тварин послідовно тиснути «референсний» важіль (доступний), потім перегороджувати отвір та потім тискати будь-який з двох важелів;

VI) тренування тварин послідовно тиснути «референсний» важіль, потім перегороджувати отвір та потім тиснути важіль не відповідний до «референсного» без затримки (в третій фазі цього блоку тварині надається доступ тільки до невідповідного до референсного важеля) .

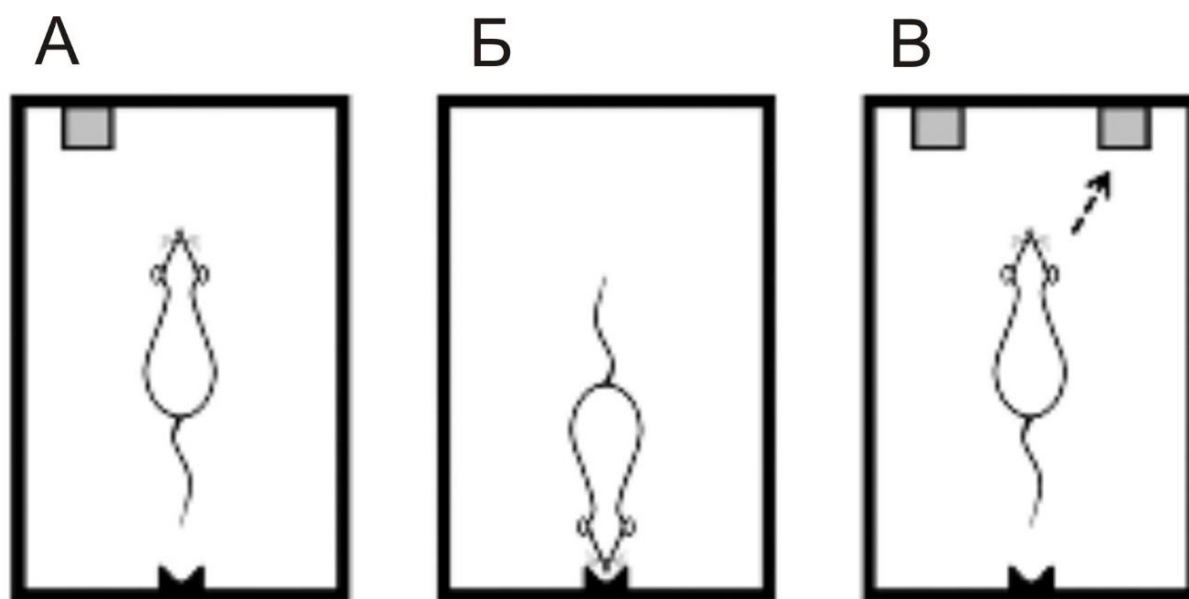


Рис. 2.13. Протокол ЗНВП-тесту. А) Фаза кодування: тварина повинна навчитися натискати «референсний» важіль. Б) Фаза збереження, під час якої тварина повинна перегородити носом отвір на протилежній стінці камери з різною тривалістю затримки. Під час цієї фази експериментальна тварина повинна утримувати в пам'яті «референсний» об'єкт. Відомо, що утримування в пам'яті дії або об'єкту тривалий час (> 10 с) забезпечується гіпокампом, тому в наших дослідках, щоб диференціювати ПФК-залежну поведінку, ми використовували затримку не більше 10 с. В) Фаза вибору, під час якої тварина, щоб отримати винагороду, повинна з двох запропонованих важелів («референсний» та «новий») вибрати саме «новий».

Критеріями переходу до наступного блоку підготовчого навчання були: I та II) здобуття більш ніж 25-ти винагород протягом 45 хв і натискання кожного з важелів як мінімум один раз; III) отримання більш ніж 25-ти винагород після перегороджування носом отвору в темній камері за 45 хвилин; та IV) більш ніж 10-ти винагород після перегороджування носом отвору в освітленій камері за 30 хв. Якщо менш ніж 10 винагород було отримано впродовж однієї сесії, щурів піддавали попередньому блоку навчання; V-VI) точність виконання завдання повинна скласти 40 або більше успішно виконаних завдань за 45 хв .

Сесії ЗНВП-тесту були проведені один раз на добу, 7 діб на тиждень приблизно у той же час кожен день і складались з 50-ти випробувань. Тривалість сесії складала 45 хвилин.

ЗНВП-тест складався з кількох блоків (**Рис. 2.13**): 0-2а) тренування тварин послідовно тиснути «референсний» важіль, потім перегороджувати отвір, а потім тиснути важіль невідповідний до «референсного» важеля з затримкою між другою та третьою діями 0 с (0); 0-5 с (1); 0-10 с (2); 5-10с (2а), тварині надавався доступ як до «референсного» важеля, так і до «нового» важеля, невідповідного до «референсного».

Критерієм переходу до наступного блоку ЗНВП-тесту була точність виконання завдання на 80 % або більше (40 або більше успішно складених завдань) протягом 45-тихвилинної сесії. Менше ніж 60 % успішно складених завдань (менше 30-ти правильних випробувань) була умовою повернення у попередній блок тесту.

2.6.4. Тест «відкрита арена»

Для дослідження рівня локомоторної активності та емоційного стану щурів використовували тест «відкрита арена». Тварину переміщали у кругову

камеру діаметром 1 м (**Рис. 2.14.**) з підлогою, поділеною лініями на квадранти, та давали можливість вільно пересуватися протягом 10 хв. Для дослідження рівня локомоторної активності оцінювали загальну пройдену дистанцію. Для дослідження емоційного стану тварини оцінювали співвідношення між часом, проведеним у центрі арени та часом, знаходження на периметрі кругової арени [344, 345].



Рис. 2.14. Камера для проведення тесту «відкрита арена».

2.6.5. Тест «перегородка»

Для дослідження соціальної поведінки щурів використовували тест «перегородка» (**Рис. 2.15**). Експериментальну тварину переміщали у

центральну камеру трьохкамерного боксу з плексигласу довжиною 122 см і висотою 40,5 см. Ширина центральної камери становила 25 см, а прилеглих бічних камер 47 см. Бічні камери були відокремлені від центральної камери перегородками з плексигласу. В правій бічній камері знаходився щур такого ж віку, як і вік піддослідної тварини. Цей щур був ізольований в круговій прозорій клітці, що виключало його пересування під час експерименту, а також зіткнення з експериментальною особою. В лівій бічній камері вміщувався об'єкт, також ізольований в круговій прозорій клітці.

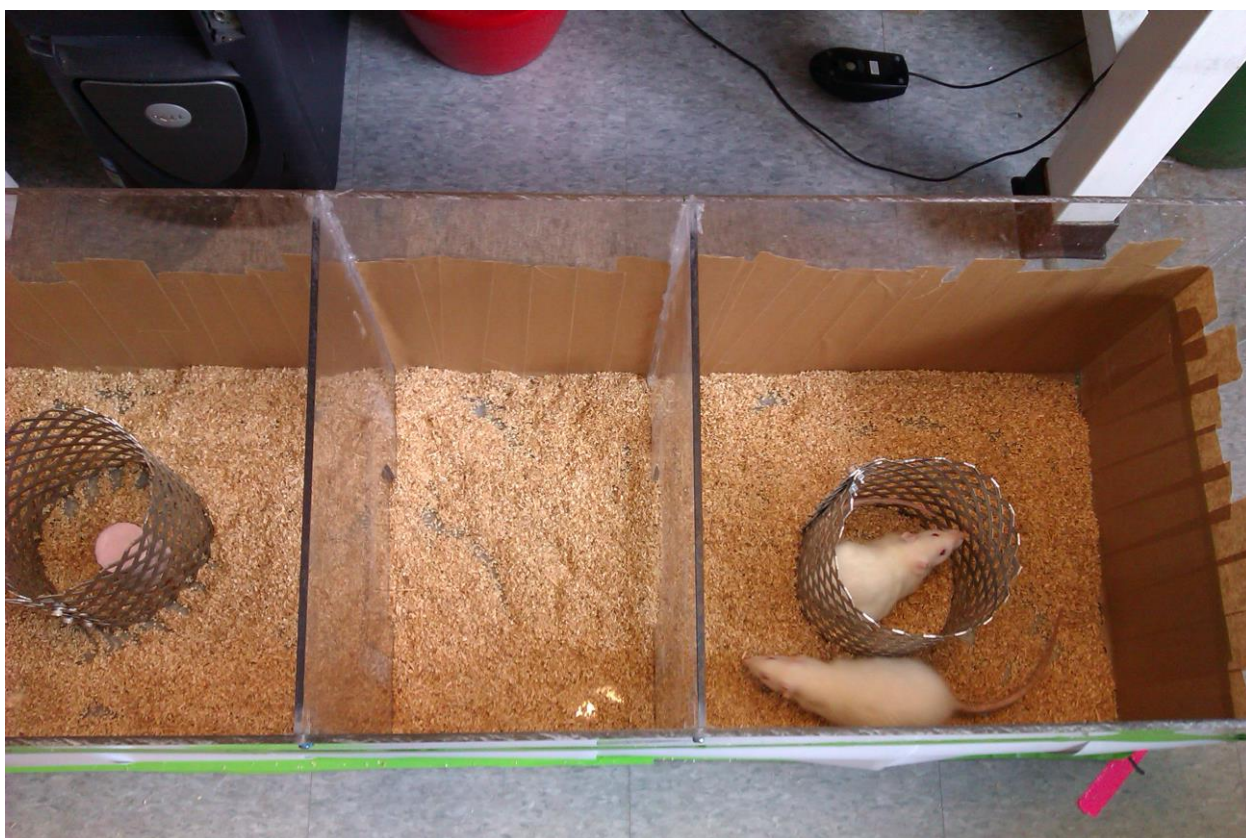


Рис. 2.15. Тест «перегородка».

Після п'ятихвилинного періоду адаптації тварини в центральній камері, перегородки між камерами видаляли і протягом 10 хв вимірювали час, проведений піддослідною твариною поряд з об'єктом або щуром. Для

дослідження соціальної поведінки оцінювали час, проведений з піддослідною твариною з щуром відносно часу проведеного поряд з об'єктом.

2.6. Хімічні реактиви і розчини

DAPV – D-2-аміно-5-фосфонопентанат; CNQX – 6-ціано-7-мітроквіноксалін-2,3-діон, SCH79797 була придбані у компанії Tocris (Великобританія). Кетамін був придбаний у компанії Pfizer (Фінляндія); ксилазін у Bayer (Німеччина). Реагенти для імуногістохімії: анти-тромбін НС поліклональні антитіла кози; анти-тромбін рецептор (ПАР) поліклональні антитіла кролика були придбані в Santa Cruz Biotechnology (США); анти-NeuN моноклональні антитіла, клон А60 і анти-гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP) моноклональні антитіла, клон GA5 у компанії Millipore (США); вторинні антитіла Alexa 568-кон'юговані осяччі анти-козячі антитіла (1:800; 11057); Alexa 647-кон'юговані осяччі анти-кроликові антитіла (1:800; 31573); Alexa 488-кон'юговані осяччі анти-мишачі антитіла (1:800; 21202) у Invitrogen (США). Тіонін був придбаний у Fisher Scientific (США). Всі інші хімічні реактиви були придбані у компанії Sigma-Aldrich (США).

Розчини

Для приготування усіх розчинів використовували бідистильовану воду.

Таблиця 2.1.

Модифікований розчин для ізоляції зрізів мозку щурів (в мМ)

сахароза	250
KCl	2,0
CaCl ₂	0,5
MgCl ₂	7
NaHCO ₃	26
NaH ₂ PO ₄	1,2
Глюкоза	11
pH	7,4

Таблиця 2.2.

ACSF (мМ)

NaCl	126
KCl	3,5

CaCl_2	2,0
MgCl_2	1,3
NaHCO_3	25
NaH_2PO_4	1,2
Глюкоза	11
pH	7,3

Таблиця 2.3.

Модифікований розчин ACSF з високою концентрацією двовалентних іонів (mM)

NaCl	126
KCl	3,5
CaCl_2	4
MgCl_2	4
NaHCO_3	25

NaH ₂ PO ₄	1,2
Глюкоза	11
pH	7,3

Таблиця 2.4

*Модифікований розчин ACSF для дослідження
синаптичної пластичності (мМ)*

NaCl	119
KCl	2,5
CaCl ₂	2,0
MgSO ₄	1,3
NaHCO ₃	26
NaH ₂ PO ₄	1,0
Глюкоза	11
pH	7,3

Таблиця 2.5*Фосфатно-буферний розчин (ФБ) (мМ)*

KH_2PO_4	1,5
NaCl	0,15
Na_2HPO_4	2,7

Таблиця 2.6*Внутрішньоклітинний розчин*

CS-глюконат	117,5
NaCl	8
HEPES	10
EGTA	10
Na_3GTP	0,2
MgATP	2
pH	7,3

Таблиця 2.7*Низько-магнієвий розчин (мМ)*

NaCl	126
KCl	3,5
CaCl ₂	1,0
NaHCO ₃	25
NaH ₂ PO ₄	1,2
Глюкоза	11
pH	7,3

2.7. Методи статистичного аналізу

Для обробки та аналізу результатів використовували такі програми: Clampfit (Axon Instruments, США), MiniAnalysis (version 6.0.7, Synaptosoft, США), Origin (OriginLab, version 7.0, США), Statistica (version 6.0, Statsoft, США). Аналіз вибірок включав визначення середнього значення, стандартної похибки середнього, стандартного відхилення середнього. Для визначення статистичної вірогідності міжгрупових розбіжностей використовували двосторонній тест Фішера. Наявність довготривалої потенціації синаптичних

відповідей визначали як статистично достовірне збільшення амплітуди ВПСП, що спостерігалось протягом більше 30 хв після тетанічної стимуляції, у порівнянні з амплітудою ВПСП під час реєстрації базової лінії. Т-тест Ст'юдента використовували для визначення достовірності різниці у експериментальних групах, що відповідали нормальному розподілу. Для обробки та аналізу результатів досліджень різних форм синаптичної пластичності використовували дисперсійний аналіз (ANOVA) з повторними вимірами. Вірогідними вважались розбіжності при $P < 0,05$. Числові дані наводяться, як середнє \pm стандартна похибка середнього.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ НЕОНАТАЛЬНИХ СУДОМНИХ ЕПІЛЕПТИЧНИХ НАПАДІВ НА СИНАПТИЧНУ АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА.

3.1. Розвиток функціональних ГАМК-ергічних синапсів

В першій серії експериментів досліджували вплив повторюваних неонатальних судом, спровокованих інгаляцією ФТ, на розвиток гальмівної синаптичної передачі в пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа щурів. Спонтанні гальмівні постсинаптичні струми (сГПСС) відводили від нейронів гіпокампа щурів контрольної групи та групи тварин з неонатальними епілептичними нападами (ФТ-група, Протокол 1). СГПСС вимірювали від тварин двох вікових груп: 8-10 діб після народження (дпн) та 15-17 дпн. СГПСС реєстрували при підтримуваному потенціалі 0 мВ (**Рис. 3.1А**). Часовий хід сГПСС характеризувався швидкою кінетикою наростання та повільним спадом. Крива наростання та спаду задовільно апроксимувалися однією експонентою. Додавання до позаклітинного розчину блокатора ГАМК_A-рецептрів бікукуліну, в концентрації 15 мкМ призводило до повного та оборотного пригнічення сГПСС. Описані фармакологічні ефекти є характерними для хлорних струмів, опосередкованих активацією ГАМК_A-рецептрів, і дозволяють ідентифікувати сГПСС, як ГАМК-індуковані постсинаптичні струми [229]. На **Рис. 3.1Б** показано, що частота сГПСС у контрольній групі щурів значно збільшувалась з часом (8-10 дпн: $3,1 \pm 0,7 \text{ c}^{-1}$, $n = 17$; 15-17 дпн: $7,0 \pm 0,6 \text{ c}^{-1}$, $n = 21$; $P < 0,005$).

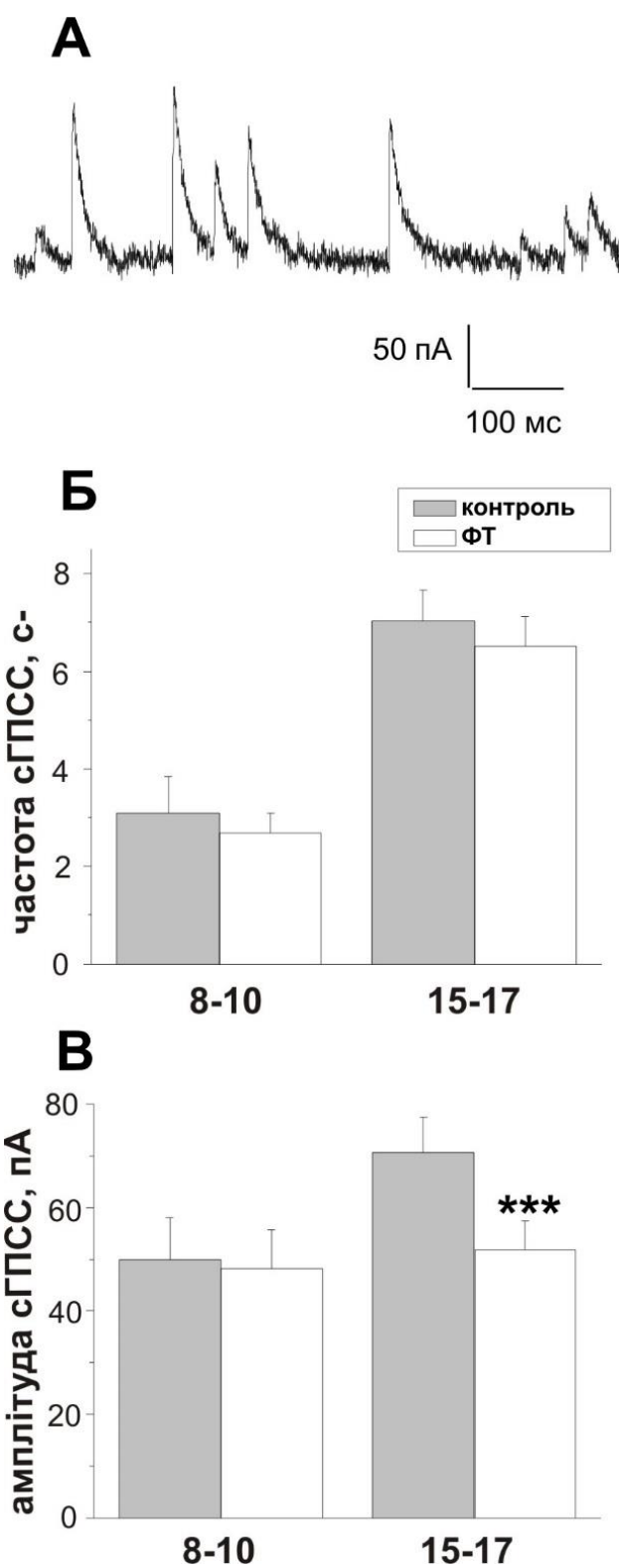


Рисунок. 3.1. Вплив неонатальних судомних нападів на частоту і амплітуду ГАМК-ергічних синаптичних струмів в СА3 пірамідних нейронах

гіпокампа. (А) Реєстрація сГПСС при підтримуваному потенціалі 0 мВ. Діаграми частот (Б) і амплітуд (В) сГПСС, що відводились від нейронів гіпокампа щурів контрольної та ФТ груп в період раннього постнатального розвитку.

Аналогічне збільшення частоти сГПСС протягом дослідженого періоду постнатального розвитку спостерігалось в нейронах гіпокампа щурів ФТ-групи (8-10 дпн: $2,7 \pm 0,4 \text{ с}^{-1}$, $n = 21$; 15-17 дпн: $6,5 \pm 0,6 \text{ с}^{-1}$, $n = 25$; $P < 0,005$, **Рис 3.1Б**). Середня амплітуда сГПСС в нейронах контрольних щурів також збільшувалася з часом (8-10 дпн: $49,8 \pm 8,1 \text{ пА}$, $n = 21$; 15-17 дпн: $70,6 \pm 6,7 \text{ пА}$, $n = 25$; $P < 0,05$, **Рис 3.1В**). У відведеннях від нейронів щурів віком 8-10 діб після народження амплітуда сГПСС не розрізнялася між досліджуваними групами ($P = 0,8$). Середнє значення амплітуди сГПСС в пірамідних нейронах ФТ-групи не збільшувалося протягом третього тижня життя порівняно з другим тижнем. Отже, у відведеннях від нейронів щурів віком 15-17 діб після народження амплітуда сГПСС була значно меншою в ФТ-групі порівняно з контролем (15-17 дпн: контроль $70,6 \pm 6,7 \text{ пА}$, $n = 25$; ФТ-група: $51,8 \pm 5,4 \text{ пА}$, $n = 21$; $P < 0,01$, **Рис 3.1В**).

На **Рис. 3.2** наведено результати аналізу вікових змін та впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики сГПСС в контрольній та ФТ групах. Встановлено, що усереднені показники часу наростання та напівширина сГПСС не змінювались протягом другого та третього тижня життя в обох досліджуваних групах. Ми також не виявили міжгрупових відмінностей у кінетичних характеристиках сГПСС.

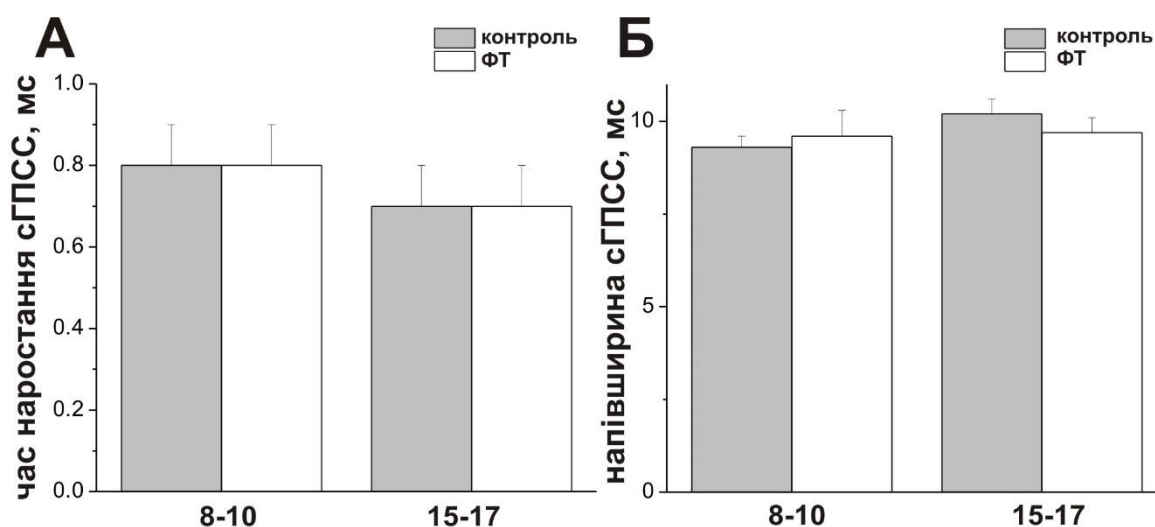


Рис. 3.2 Результати аналізу вікових змін та впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики сГПСС.

У дорослому мозку ГАМК є основним гальмівним нейромедіатором і відіграє ключову роль у генерації фізіологічних патернів активності і запобіганні виникненню та поширенню пароксизмальної активності [346]. Тим не менш, під час раннього розвитку активація ГАМК_A-рецепторів може зумовлювати подвійну (збуджувальну та гальмівну) дію в залежності від контексту активації таких рецепторів [30, 93, 347]. Ця властивість гальмівної синаптичної передачі пов'язана з тим, що в незрілому мозку внутрішньоклітинна концентрація іонів хлору є відносно вищою, ніж у зрілому мозку, у зв'язку з розвитком та змінами в експресії різноманітних транспортерів, залучених у регуляцію внутрішньоклітинного Cl⁻ [348].

Значення потенціалу реверсії ГПСС в нейронах незрілого мозку більш позитивне, ніж поріг потенціалу дії, тому активація ГАМК_A-рецепторів здатна деполяризувати клітинну мембрану, і, як наслідок, збуджувати нейрони. З використанням внутрішньоклітинного методу реєстрації постсинаптичних струмів було показано, що активація ГАМК_A-рецепторів призводить до гіперполяризації клітинної мембрани починаючи з 5-6-ї доби після народження [349]. Очевидна невідповідність між одержаними віковими межами розвитку гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі та змінами збудливості нервової мережі в незрілому мозку істотно послаблює гіпотезу про зв'язок між цими двома явищами. Існують, однак, кілька причин переглянути цю гіпотезу, оскільки застосування методу внутрішньоклітинної реєстрації, який було використано для вивчення розвитку ГАМК-ергічної синаптичної передачі, має кілька недоліків. До цих недоліків варто віднести: іонний обмін між піпеткою та цитоплазмою, витік провідності між відвідним електродом та мембраною нейрона. Все це може впливати на збудливість нейронів і внутрішньоклітинний іонний склад, особливо в невеликих нейронах. Отже, для дослідження впливу неонатальних нападів на розвиток гальмівної синаптичної передачі в наших дослідженнях використовували неінвазивний метод позаклітинного запису потенціалів дії (ПД) від десятків - сотен нейронів, розташованих у безпосередньої близькості від відвідного електроду. Для активації ГАМК-рецепторів використовували селективний агоніст ГАМК_A-рецепторів, ізогувацин.

Попередні дослідження [93] показали, що аплікація ізогувацину спричиняє короточасне підвищення активності нервових мереж в зрізах гіпокампа новонароджених щурів та зменшення такої активності в зрізах гіпокампа дорослих щурів. На **Рис. 3.3** представлено результати дослідів вікових змін впливу активації ГАМК_A-рецепторів на частоту ПД. Графік **3.3А** побудовано як залежність максимальної частоти ПД під час аплікації

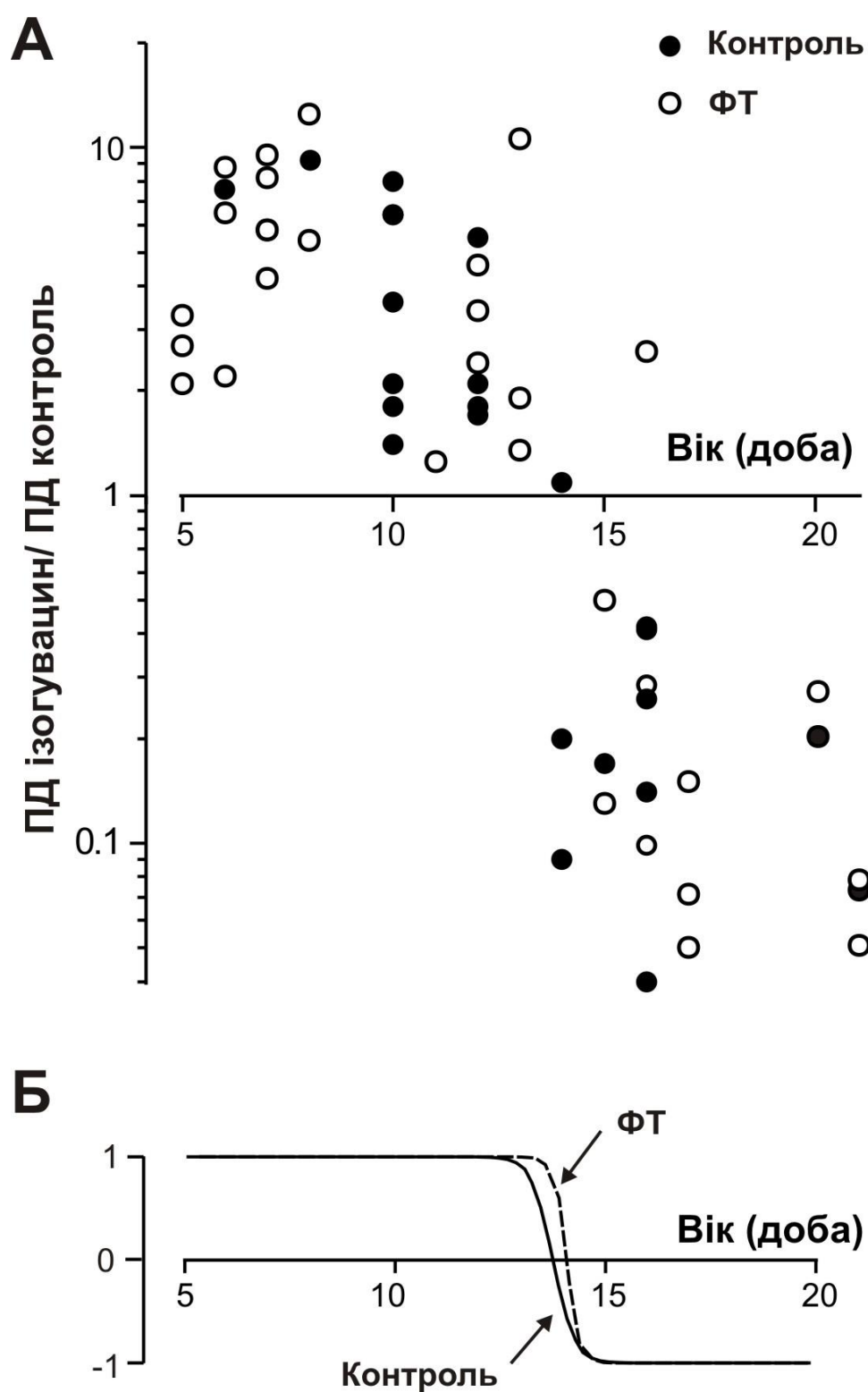


Рис 3.3. Неонатальні судоми не впливають на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі. (А) Вікові зміни ефекту ізогувацину на частоту потенціалів дії (ПД). Кожна точка являє собою

відношення частоти ПД до i після додавання ізогувацину. (Б) Залежність ефекту ізогувацину на частоту ПД від віку апроксимована кривою, отриманою за рівнянням Больцмана.

ізогувацину нормованої відносно частоти ПД перед нанесенням ізогувацину від віку тварини. Вікові зміни ефекту ізогувацину на частоту ПД були апроксимовані кривою, отриманою за рівнянням Больцмана (**Рис. 3.3Б**). Вік, при якому в половині зрізів ізогувацин викликав збільшення частоти ПД, а в іншій половині – зменшення цього показника на **Рис. 3.3Б** визначено як середнє значення кривої Больцмана. В контрольних зрізах це значення становило в середньому $13,5 \pm 0,4$ діб після народження тварин ($n = 19$). В ФТ-групі середнє значення кривої Больцмана становило $14,1 \pm 0,7$ діб ($n = 24$, $P = 0,8$ відносно контролю). Отже, неонатальні напади не впливали істотно на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

3.2. Розвиток збуджувальної синаптичної передачі

У наступній серії експериментів досліджували вплив ФТ-індукованих неонатальних нападів на розвиток збуджувальної синаптичної передачі в нейронах гіпокампа щурів. Спонтанні збуджувальні постсинаптичні струми (сЗПСС) відводили від пірамідних нейронів зони СА3 гіпокампа щурів контрольної групи та групи тварин, з неонатальними епілептичними нападами двох вікових груп: 8-10- та 15-17-тиденних щурів. Реєстрацію сЗПСС проводили за присутністю у позаклітинному розчині блокатора гальмівної синаптичної передачі бікукуліну (15 мкМ) та при підтримуваних потенціалах - 80 мВ та + 40 мВ для окремої реєстрації сЗПСС,

опосередкованих активацією, відповідно, АМПА- та НМДА-рецепторів (**Рис. 3.4**).

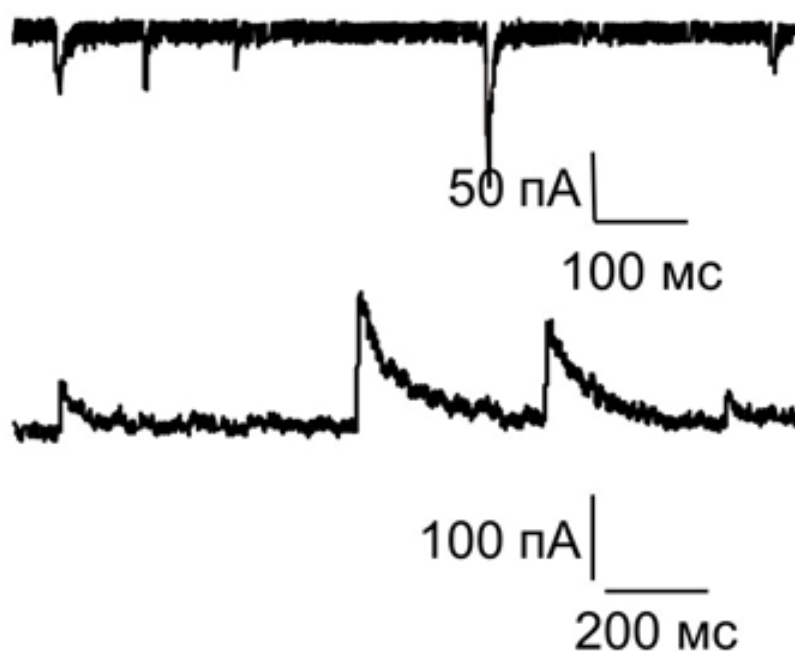


Рис. 3.4. АМПА (верхня панель) та НМДА (нижня панель) сЗПСС, відведені від пірамідного нейрона при підтримуваних потенціалах, відповідно, -80 і 40 мВ.

На **Рис. 3.5** наведені дані щодо вікових змін частоти та амплітуди АМПА та НМДА сЗПСС в нейронах зони СА3 гіпокампа щурів контрольної та ФТ груп. Видно, що частота та амплітуда АМПА та НМДА сЗПСС значно збільшувались впродовж другого і третього тижнів постнатального розвитку ($P < 0,05$) в обох досліджених групах без істотних відмінностей у цих показниках між групами ($P = 0,7$).

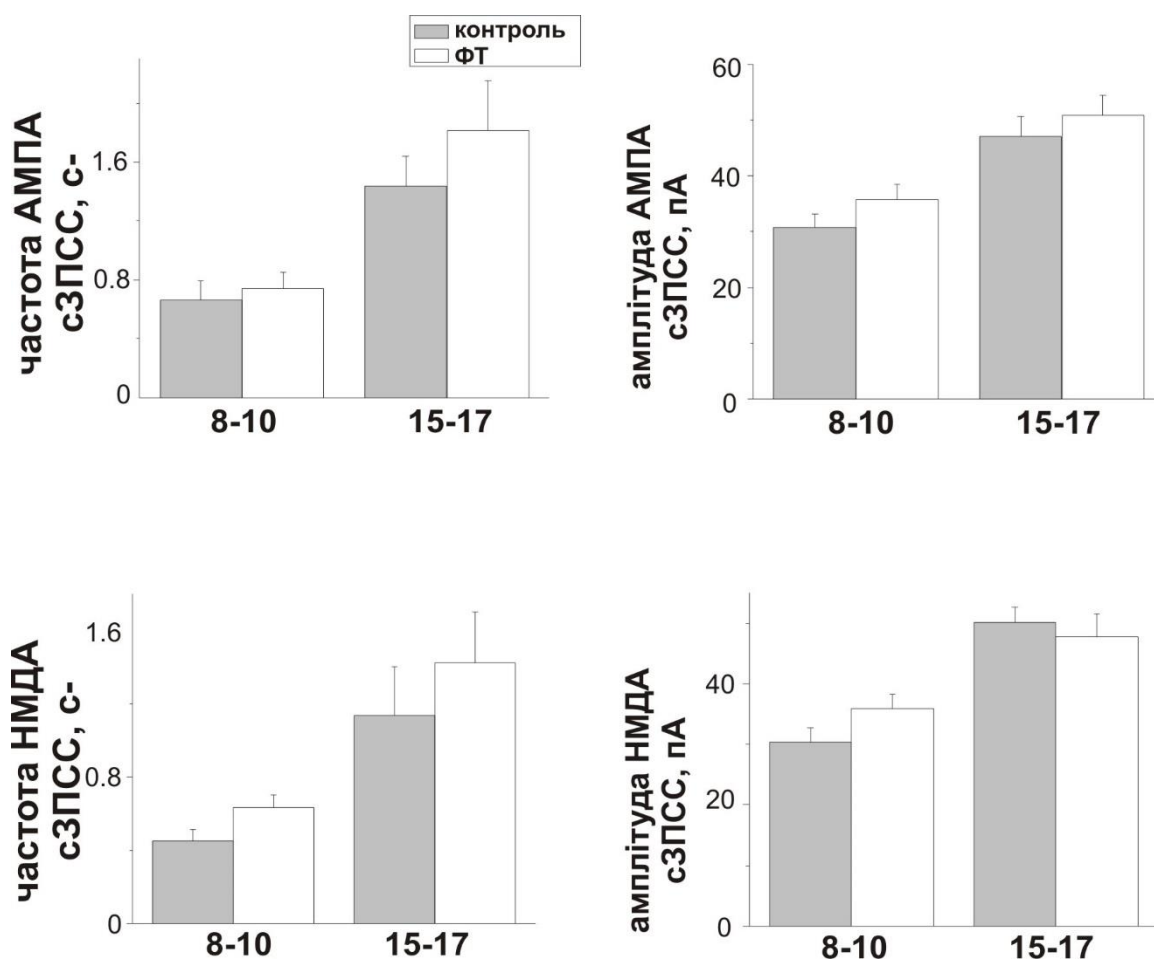


Рис. 3.5. Вплив неонатальних судом на розвиток збуджувальної синаптичної передачі в пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа. Діаграми амплітуд і частот АМПА та НМДА сЗПСС, відведених від нейронів гіпокампа щурів віком 8-10 або 15- 17 діб після народження (дпн).

Відомо, що в період раннього постнатального розвитку синаптична передача більшості глутаматергічних синапсів опосередкована активацією НМДА-рецепторів [350–352]. Формування функціональних АМПА-рецепторів відбувається пізніше та регулюється механізмами залежними та незалежними від активності нервової мережі [350, 351, 353]. В наступній серії експериментів

ми досліджували вплив неонатальних нападів на розвиток співвідношення АМПА- та НМДА-рецепторів. Для кожної окремої клітини оцінювали відношення частот та амплітуд сЗПСС, викликаних активацією АМПА-рецепторів до частот і амплітуд сЗПСС, викликаних активацією НМДА-рецепторів. На **Рис. 3.6** показано, що ці показники не змінювались протягом другого та третього тижнів постнатального розвитку в обох групах (контрольна група: 8 - 10 дпн, n = 24 та 15 - 17 дпн, n = 22; ФТ-група: 8 - 10 дпн, n = 22 та 15 - 17 дпн, n = 22). У досліджуваних групах ці показники не розрізнялися.

Недавні дослідження показали, що спад НМДА ЗПСС стає більш швидким протягом раннього розвитку [354, 355]. Такі зміни відбуваються у зв'язку зі зміною складу субодиниць НМДА-рецепторів [356]. Крім того, відомо, що неонатальні напади можуть призводити до порушень цього процесу [357, 358]. Для визначення впливу неонатальних нападів на кінетичні характеристики сЗПСС порівнювали показники часу наростання та напівширину АМПА та НМДА сЗПСС в контрольній та ФТ групах щурів. Встановлено, що напівширина НМДА сЗПСС у відведеннях від нейронів щурів віком 15-17 діб після народження була значно коротшою порівняно з такими показниками в нейронах щурів віком 8-10 діб (**Рис. 3.7А**). На **Рис. 3.7 Б,В** показано, що неонатальні судомні напади не впливали на постнатальні зміни спаду НМДА сЗПСС.

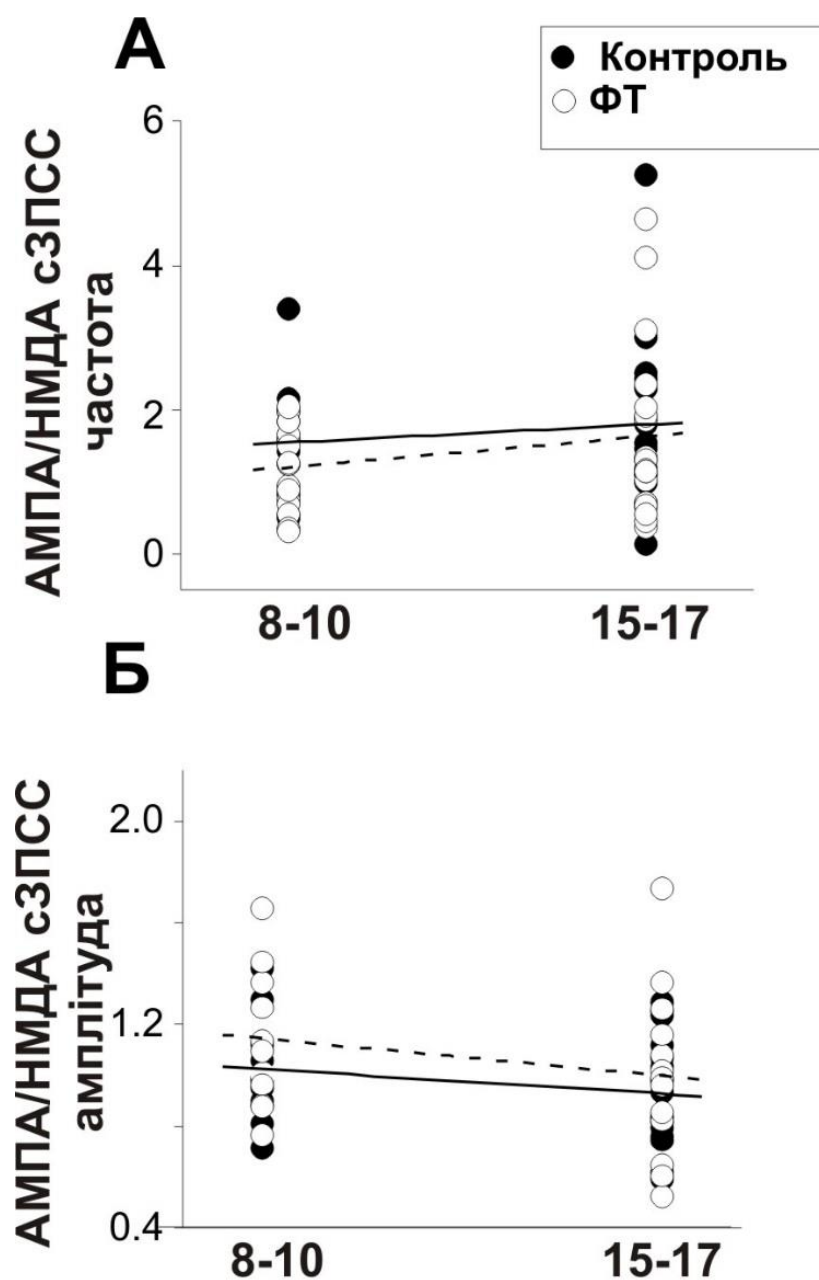


Рис 3.6. Вплив неонатальних судом на співвідношення показників АМПА- та НМДА-опосередкованих постсинаптичних струмів. (А, Б) Діаграми показують, що співвідношення частоти АМПА сЗПСС до частоти НМДА сЗПСС, а також співвідношення їх амплітуд не змінювались протягом другого і третього тижнів постнатального розвитку.

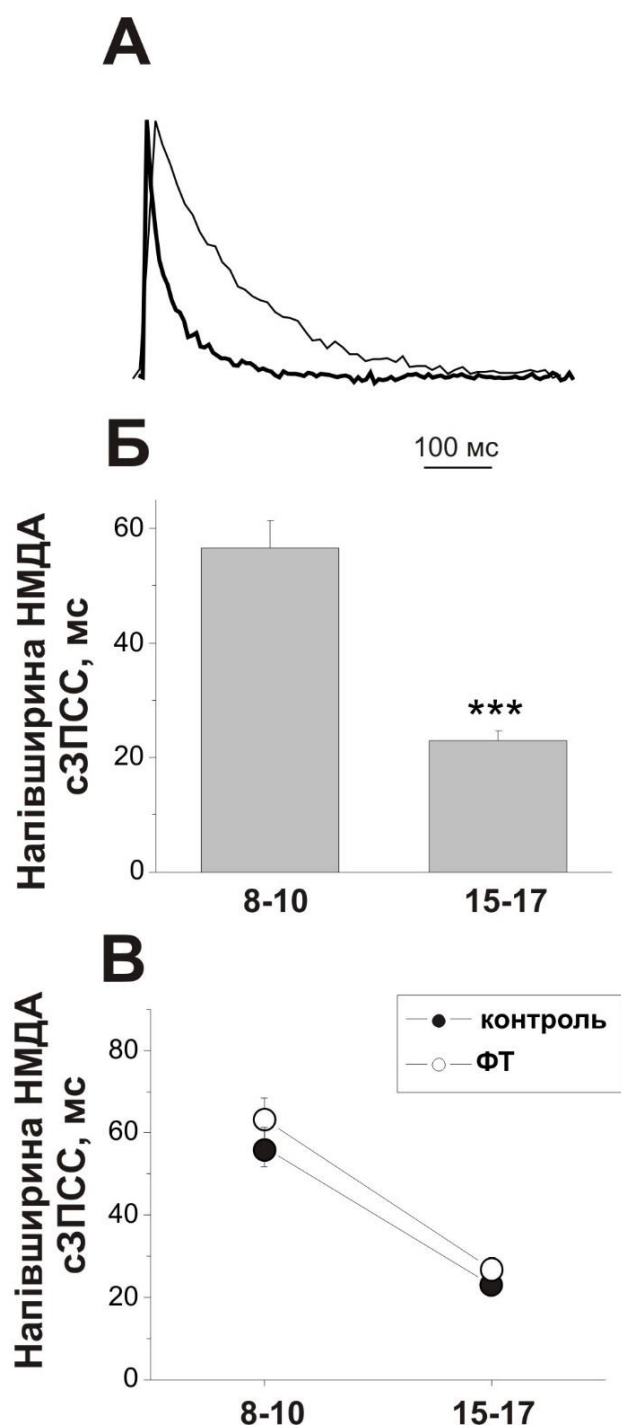


Рис. 3.7. Вплив неонатальних судомних нападів на розвиток спаду НМДА сЗПСС в СА3 пірамідних клітинах (А) Приклади записів НМДА сЗПСС відведених від пірамідних клітин гіпокампа щурів контрольної групи на другий (тонка лінія) і третій (жирна лінія) тиждень постнатального розвитку. (Б) Узагальнені дані характеристик постсинаптичних струмів в

*нейронах контрольної групи показують, що напівширина НМДА сЗПСС була значно меншою на третій тиждень постнатального розвитку порівняно з другим тижнем. (В) Неонатальні напади не впливали на постнатальні зміни спаду НМДА сЗПСС, відведених від СА3 пірамідних клітин в контрольній (чорні кружки) та ФТ групах (білі кружечки). Статистичні порівняння проводили з використанням критерія Стьюдента *** $P < 0,005$.*

На **Рис. 3.8.** наведено результати аналізу вікових змін та впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики сЗПСС, обумовлених активацією АМПА- та НМДА-рецепторів, в контрольній та ФТ групах. Встановлено, що усереднені показники часу наростання та напівширина АМПА сЗПСС не змінювались протягом другого та третього тижня життя в обох досліджених групах. Ми також не виявили відмінностей у кінетичних характеристиках АМПА сЗПСС між дослідженими групами. Показники часу наростання та напівширина сЗПСС, спровокованих активацією НМДА-рецепторів, значно прискорювались протягом другого та третього тижня життя в обох досліджуваних групах (час наростання: $P < 0,05$; напівширина $p < 0,005$) без істотних відмінностей між досліджуваними групами ($P > 0,05$; **Рис 3.7-3.8**).

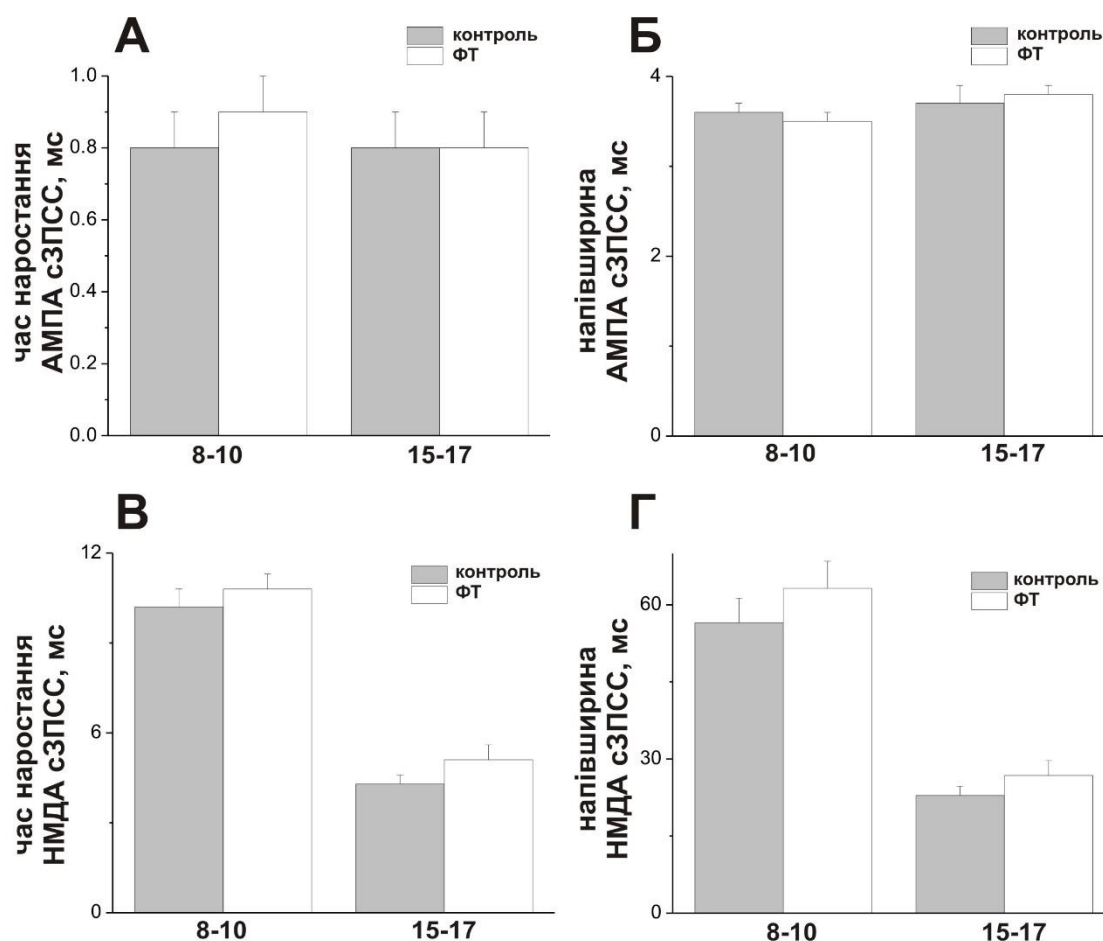


Рис. 3.8. Вікові зміни та вплив неонатальних судом на кінетичні характеристики сЗПСС, спричинених активацією АМПА- та НМДА-рецепторів. Сумарні діаграми часу наростання (А,В) та напівширини (Б,Г) АМПА та НМДА сЗПСС відведених від САЗ нейронів гіпокампа щурів віком 8-10 та 15-17 діб після народження (дпн) контрольної та ФТ груп.

Отже, порівняльний аналіз різноманітних характеристик синаптичних відповідей в нейронах зони САЗ гіпокампа контрольних щурів та щурів з історією повторюваних судом, спровокованих інгаляцією ФТ під час раннього розвитку, наведений в даному розділі показав, що:

1) у щурів з історією неонатальних судом спостерігалось суттєве зниження амплітуди гальмівних постсинаптичних струмів, частота та кінетичні характеристики сГПСС не розрізнялись між досліджуваними групами;

2) неонатальні судоми не впливали на розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі;

3) жоден з досліджених параметрів глутаматергічних постсинаптичних струмів не розрізнявся між досліджуваними групами, у тому числі амплітуда і частота спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів, співвідношення амплітуд і частот АМПА і НМДА-опосередкованих спонтанних постсинаптичних струмів та кінетичні характеристики цих струмів.

Результати наших дослідів показали, що неонатальні судоми призводять до вибіркового пригнічення амплітуди ГАМК-ергічних синаптичних відповідей в нейронах гіпокампа. Це свідчить про наявність змін балансу збудження і гальмування в гіпокампі у тварин з історією судом в період раннього розвитку і може бути підґрунтям підвищеної чутливості цієї ділянки мозку у таких щурів до дії проепілептичних агентів, що було описано в попередніх роботах [8].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ НЕОНАТАЛЬНИХ СУДОМ НА АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ СОМАТОСЕНСОРНОЇ КОРИ ЩУРІВ.

Як зазначалось вище, епілептичні напади в неонатальному віці зумовлюють високий ризик появи небезпечних неврологічних ускладнень у подальшому житті [44, 359, 360]. Генез ранніх нападів, як правило, є неокортексальним, проте наші уявлення про наслідки неонатальних епілептичних нападів на функції неокортекса залишаються в значній мірі обмеженими. В наступній серії експериментів були досліджені довготривалі наслідки епілептичних судом, викликаних інгаляцією ФТ у щурів в неонатальний період, на активність нейронів ССК.

4.1. Поріг виникнення епілептиформної активності.

Відведення потенціалів здійснювали позаклітинно від шарів 2/3 або 5/6 ССК дорослих щурів. Результати відведення від зрізів мозку щурів, які зазнали ФТ-індукованих неонатальних судом порівнювали з даними, отриманими від контрольних тварин аналогічного віку. На зрізах мозку тварин контрольної і ФТ-груп спонтанної ЕФА не було виявлено. Можливість ініціації ЕФА на зрізах неокортексу з використанням фармакологічних сполук була продемонстрована в попередніх роботах [361, 362]. Встановлено, що неокортекс має набагато меншу, ніж гіпокамп, чутливість до проепілептичних агентів.

Аплікації 4-амінопіридину (тести на 10 зрізах) або розчину з низькою концентрацією Mg^{2+} (10 зрізів) не призводили до виникнення ЕФА в ССК в зрізах мозку щурів віком 2-3 місяця після народження в обох досліджених групах. Аплікація 5 мкМ бікукуліну викликала ЕФА в шарі 2 ССК в чотирьох з 11 контрольних зрізів [363].

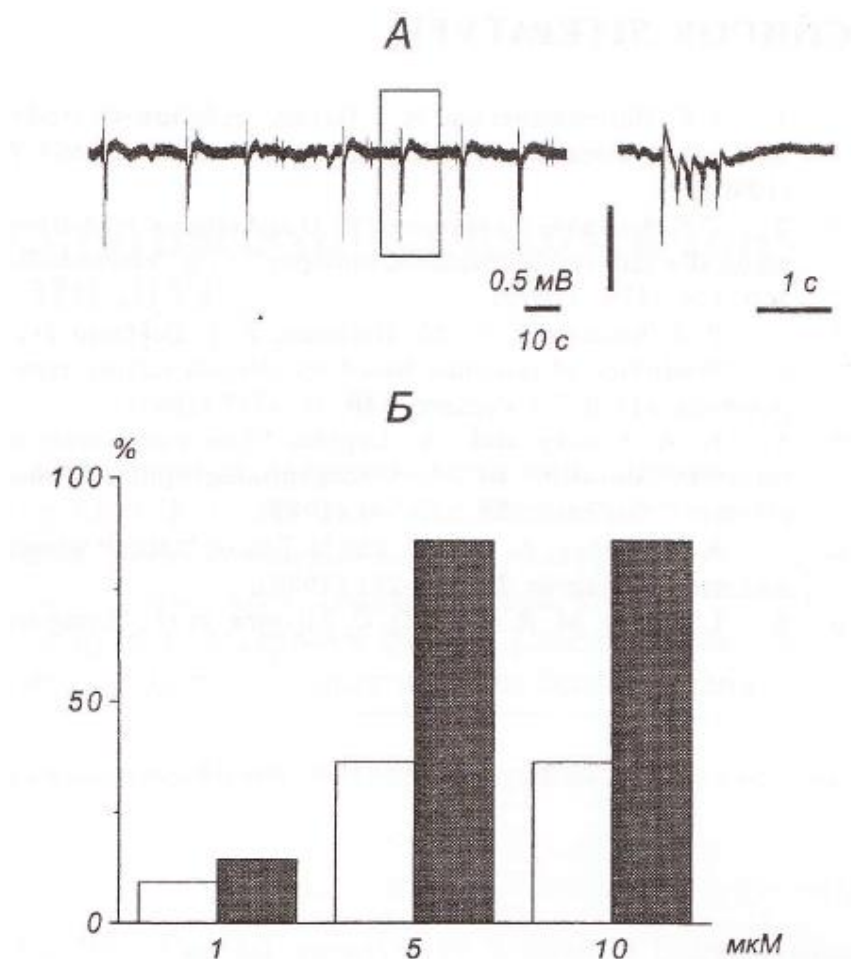


Рис. 4.1. Підвищення чутливості ССК щурів, у яких були індуковані епілептичні напади в неонатальний період, до аплікації бікукуліну. А. Приклад позаклітинного відведення інтеріктальноподібної активності, викликаній аплікацією 5 мкМ бікукуліну, в другому шарі ССК в зрізі мозку 83-тиденного щура з наявністю судом у неонатальному віці. Фрагмент справа - поодинокий інтеріктальноподібний розряд, виділений прямокутником на лівому фрагменті, при швидкій розгортці. Б. Порівняння ймовірності виникнення (%) ЕФА в ССК при різних концентраціях аплікованого бікукуліну (мкМ, вказані під стовпчиками). Світлі та темні стовпчики відповідають зрізам, отриманим від контрольних тварин та щурів, у котрих було індуковано неонатальні епілептичні судоми в умовах ФТ-моделі.

10 мкМ габазіну

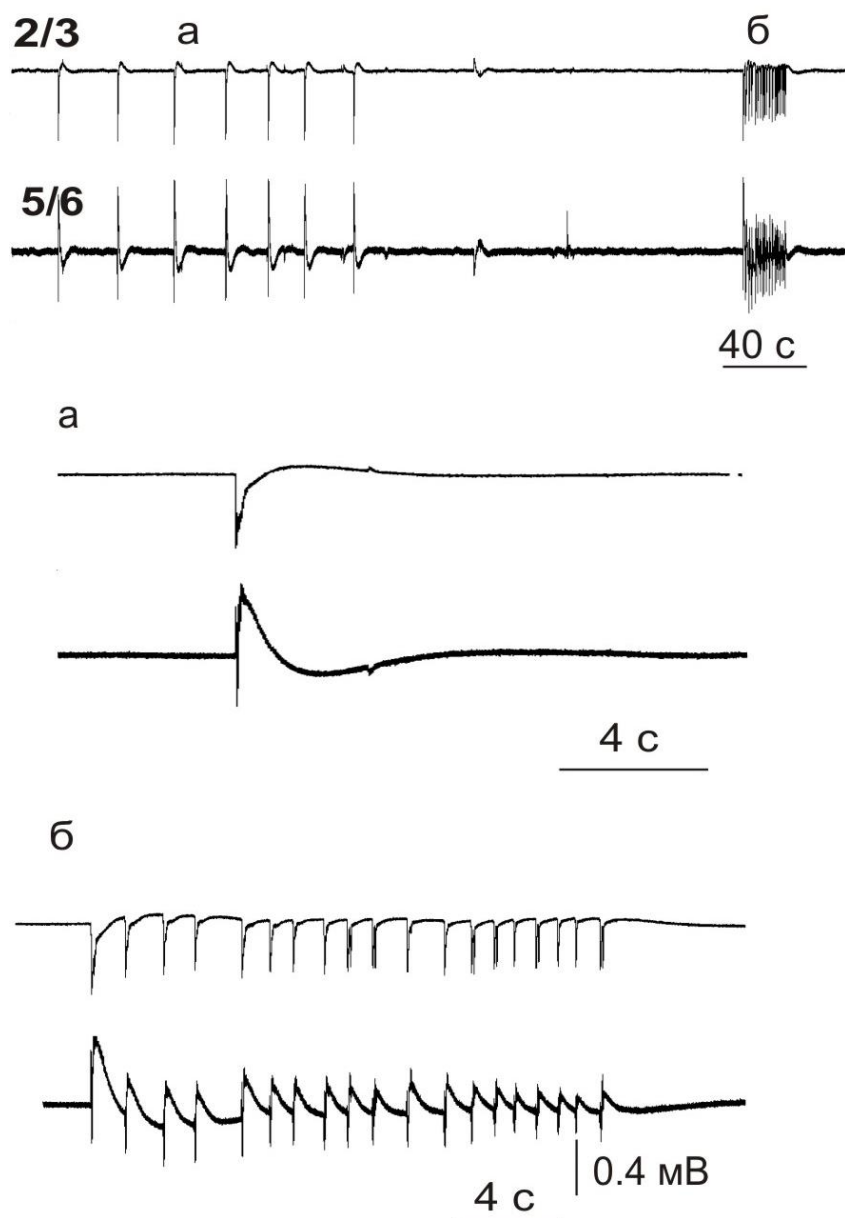


Рис. 4.2. Зовнішньоклітинні реєстрації потенціалів в шарах 2/3 та 5/6 ССК в зрізах мозку 71-тиденного щура ФТ-групи. Приклади інтеріктально- (а) та іктально-подібної (б) ЕФА викликані додаванням 10 мкМ габазіну

Підвищення концентрації бікукуліну до 10 мкМ не призводило до подальшого збільшення кількості зрізів із наявністю ЕФА у контрольній групі. Зниження концентрації бікукуліну до 1 мкМ зумовлювало значно нижчу вірогідність виникнення ЕФА в ССК контрольних тварин (**Рис. 4.1**). Аплікація позаклітинного розчину, який містив 1 мкМ бікукуліну, на зрізи мозку тварин дослідної групи призводила до дещо більшої вірогідності виникнення ЕФА, порівняно з такою в зрізах мозку тварин контрольної групи (**Рис 4.1**). Якщо концентрації бікукуліну підвищували до 10 мкМ, ЕФА спостерігали у семи з дев'яти зрізів мозку щурів ФТ-групи. Вірогідність виникнення ЕФА в цих умовах становила 78 %. Відмічалось також істотне зменшення часу до виникнення ЕФА. У зрізах контрольної групи середня затримка виникнення ЕФА на контрольних зрізах становила $357,5 \pm 48,0$ с, а в зрізах мозку щурів дослідної групи $250,0 \pm 39,1$ с. Також підвищувалася і частота інтеріктальноподібних коливань (від $0,1 \pm 0,0$ с⁻¹ у контрольних зрізах до $0,3 \pm 0,2$ с⁻¹ у зрізах мозку тварин ФТ-групи). У той же час, ми не виявили міжгрупової різниці між амплітудою та значенням тривалості ЕФА.

В наступній серії експериментів досліджували ефект іншого антагоніста ГАМК-ергічної синаптичної передачі, габазіну, на вірогідність виникнення ЕФА в ССК щурів контрольної та ФТ груп.

Аплікація габазіну призводила до виникнення інтеріктально-подібної активності (ІПА) в шарах 2/3 та 5/6 ССК у зрізах мозку контрольних та ФТ щурів у віці 20-30 та 60-80 діб після народження. Виникнення іктальноподібної активності у відповідь на аплікацію цього проепілептичного агенту спостерігалось лише в одному з сімнадцяти зрізів ФТ-групи (**Рис. 4.2**).

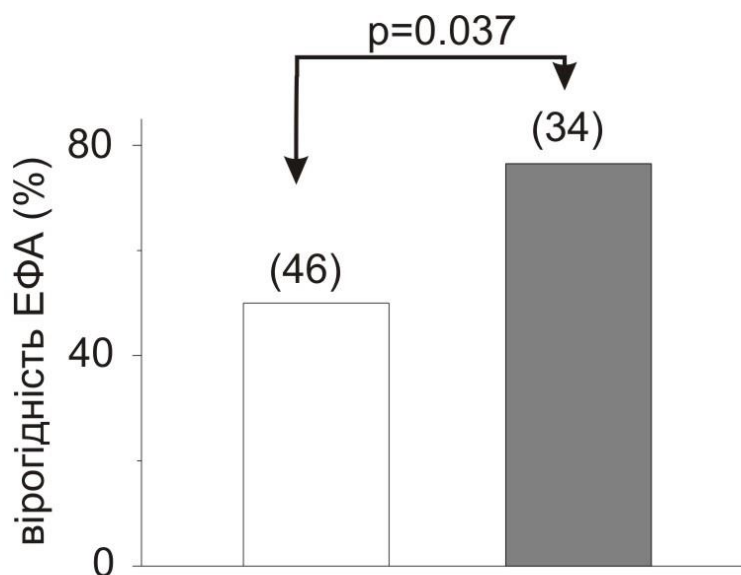


Рис 4.3. Вплив неонатальних судомних нападів на вірогідність виникнення ЕФА у відповідь на аплікацію 10 мкМ габазіну в шарі 2/3 ССК в зрізах мозку 20-30-тиденних щурів контрольної (білий) та ФТ (сірий) груп. Кількість зрізів, використаних для аналізу, вказана в дужках.

На **Рис. 4.3-4** показано, що вірогідність виникнення ЕФА в ССК щурів ФТ-групи у відповідь на аплікацію 10 мкМ габазіну була достовірно вище, ніж в ССК тварин контрольної групи. В обох досліджених групах вірогідність виникнення ЕФА зменшувалася з віком тварин. Тим не менш, різниця вірогідності виникнення ЕФА в зрізах контрольної та ФТ груп, збільшувалася з віком (контрольна група порівняно з ФТ-групою: $50,0 \pm 7,5\%$ проти $76,5 \pm 7,3\%$ для 20-30-тиденних щурів, $P = 0,04$, **Рис. 4.3**; та $14,7 \pm 6,2\%$ проти $38,1 \pm 7,5\%$ для 60-80-тиденних щурів, $P = 0,005$, **Рис. 4.4**).

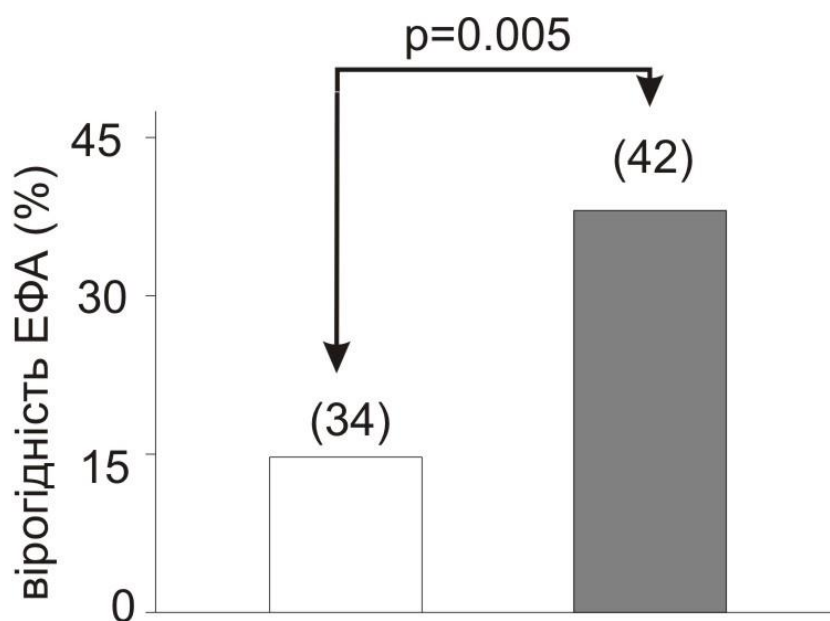


Рис. 4.4. Вплив неонатальних судомних нападів на вірогідність виникнення ЕФА в шарі 2/3 ССК в зрізах мозку 60-80-тиденних щурів контрольної (світло сірий) та ФТ (темно сірий) груп за присутності в позаклітинному розчині 10 мкМ габазіну. Кількість зрізів, використаних для аналізу, вказана в дужках.

На **Рис. 4.5.** наведені дані ефекту неонатальних флуротил-індукованих нападів на амплітуду та частоту ПА, спровокованої в ССК додаванням габазіну. Ми не виявили різниці в цих характеристиках між досліджуваними групами.

В **Табл. 4.1** представлено дані ефекту неонатальних епілептичних нападів на тривалість інтеріктально-подібних розрядів в ССК, викликаних додаванням 1 та 10 мкМ габазіну. Було виявлено достовірне збільшення тривалості ПА, спровокованої аплікацією 1 мкМ габазіну на зрізах 20-30-тиденних щурів ФТ-групи порівняно з такою в контрольній групі. Однак, при аплікації 10 мкМ габазіну, тривалість ПА не розрізнялась між

досліджуваними групами. Крім того, ми не виявили різниці між значенням тривалості інтеріктально-подібних розрядів, спровокованих аплікацією 1 та 10 мкМ габазіну в зрізах 60-80-тиденних щурів у досліджуваних групах.

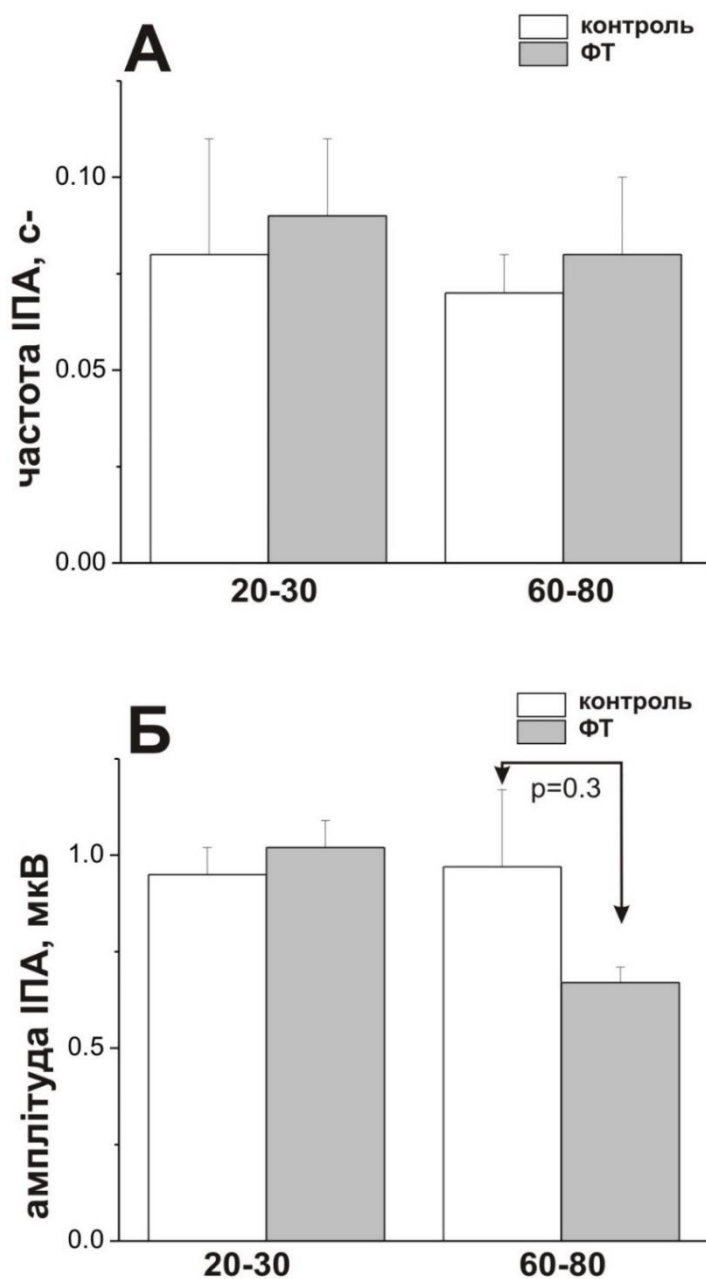


Рис 4.5. Вплив флуротил-індукованих судом на амплітуду (А) та частоту (Б) інтеріктальноподібної активності (ІПА) в шарах 2/3 ССК в зрізах мозку 20-30- та 60-80-тиденних щурів контрольної (білий) та ФТ

(сірий) груп за присутності в позаклітинному розчині габазіну. Дані ефекту флуротил-індукованих нападів на амплітуду та частоту ІПА подано узагальненими для активності, викликані додаванням 1 та 10 мкМ габазіну. Кількість зрізів, використаних для аналізу, вказана в дужках.

Таблиця 4.1.

Вплив неонатальних судомних нападів на тривалість інтеріктальноподібних розрядів, викликаних додаванням габазіну

Вік	Концентрація габазіну	Контроль		Флуротил	
		Тривалість ІПА	Кількість зрізів	Тривалість ІПА	Кількість зрізів
20-30 дпн	1мкМ	0.50 ± 0.05	10	1.15 ± 0.23*	13
	10мкМ	3.70 ± 0.75	13	3.03 ± 0.93	14
60-80 дпн	1мкМ	5.25 ± 1.55	4	4.67 ± 0.35	14
	10мкМ	6.69 ± 1.11	8	7.25 ± 1.36	18

* $P < 0.05$ порівняно з контрольними вимірюваннями.

Отримані результати вказують на те, що рекурентні судомні напади, індуковані інгаляцією ФТ у щурів на початку життя, помітно підвищують вірогідність виникнення ЕФА в ССК протягом наступних періодів постнатального розвитку.

4.2. Процес поширення габазін-індукованої епілептиформної активності

В наступній серії експериментів ми оцінювали вплив неонатальних повторюваних судомних нападів на процес поширення габазін-індукованої ЕФА в ССК. Позаклітинні потенціали відводили одночасно в шарах 2/3 і 5/6 ССК 60-80-тиденних щурів контрольної та ФТ груп. В дванадцяти з сімнадцяти зрізів аплікація габазіну призводила до синхронної ініціації ППА в шарах 2/3 та 5/6 ССК (6 зрізів контрольної та 6 зрізів ФТ груп). В двох зрізах контрольної та трьох зрізах ФТ-групи інтеріктально-подібні розряди виникали спочатку в шарах 5/6, а потім поширювалися на шари 2/3 ССК (**Рис. 4.6**). Затримка виникнення ППА між шарами 5/6 і 2/3 значно варіювала, навіть у відведеннях від одного зрізу, з діапазоном 21,9 – 58,7 мс (середнє значення для контрольної групи: $36,8 \pm 1,1$ мс; для ФТ-групи: $35,8 \pm 1,6$ мс). Ми не виявили різниці між значенням затримки інтеріктальноподібних розрядів, викликаних аплікацією 1 та 10 мкМ габазіну, в зрізах 60-80-тиденних щурів ФТ та контрольної груп.

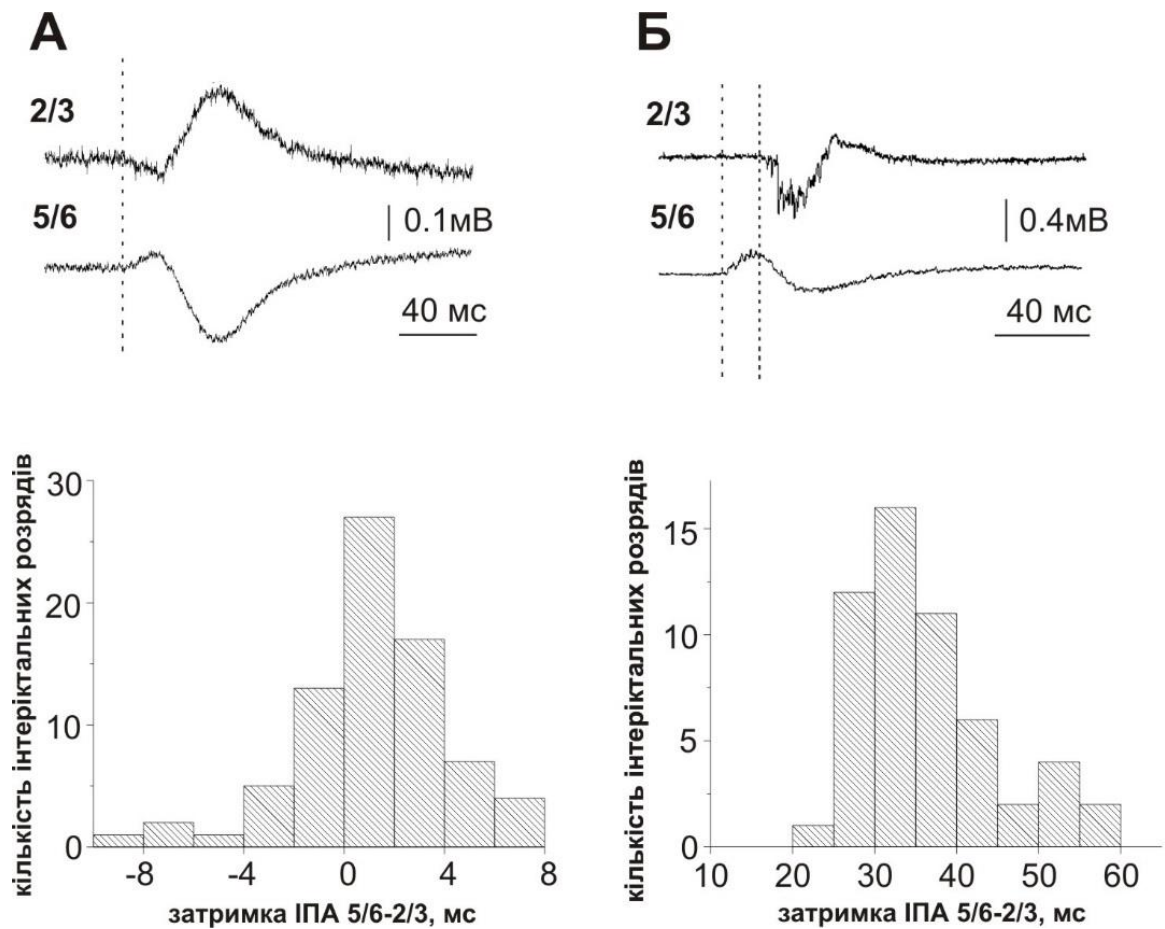


Рис. 4.6. Поширення габазін-індукованої інтеріктальноподібної активності в шарах 2/3 та 5/6 ССК в зрізах мозку щурів віком 60-80 діб після народження (контрольна група). Приклади поодиноких інтеріктальноподібних розрядів, які спостерігалися одночасно в шарах 2/3 та 5/6 (А) ССК та розрядів, які виникали в шарах 5/6 та поширювалися на шари 2/3 із затримкою (Б). Гістограми затримки інтеріктальноподібної активності в шарі 2/3 ССК відносно до вимірювань в шарі 5/6 відповідної колонки.

Ми також не знайшли різниці між середньою затримкою інтеріктальноподібних розрядів між шарами 5/6 і 2/3 ССК в зрізах мозку контрольних тварин та щурів ФТ-групи ($P = 0,7$).

Відомо, що інтернейрони та пірамідні нейрони кори можуть робити різний внесок в індукцію та підтримання ІПА, спровокованих аплікацією хімічних проепілептичних сполук [364], тому в наступній серії експериментів оцінювали вплив неонатальних повторюваних нападів на внесок різних типів нейронів в генерацію та підтримання ІПА, викликаній аплікацією габазіну.

В зрізах мозку 60-80-тиденних контрольних щурів та тварин ФТ-групи проводили одночасне вимірювання ПД від поодиноких інтернейронів або пірамідних клітин з використанням методу петч-клемп в конфігурації «cell-attached» та позаклітинних польових потенціалів в шарі 2/3 ССК. На **Рис. 4.7** показано, що пірамідні клітини залучені у генерацію та підтримання ІПА, викликаних аплікаціями габазіну. Інтернейрони не беруть участі у генерації ІПА. ПД від інтернейронів вимірювали синхронно з кожним поодиноким інтеріктально-подібним розрядом лише через 1-2 хв після появи ІПА (**Рис. 4.7**). Аналіз даних показав, що обидва підтипи нейронів беруть участь в підтриманні габазін-індукованої ІПА, і лише пірамідні нейрони залучені у генерацію ІПА. Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями з використанням 4-амінопіридинової моделі ІПА в корі головного мозку [279]. Ми не знайшли міжгрупових (контрольна та ФТ групи) відмінностей у внеску згаданих типів нейронів в індукцію та підтримання ЕФА.

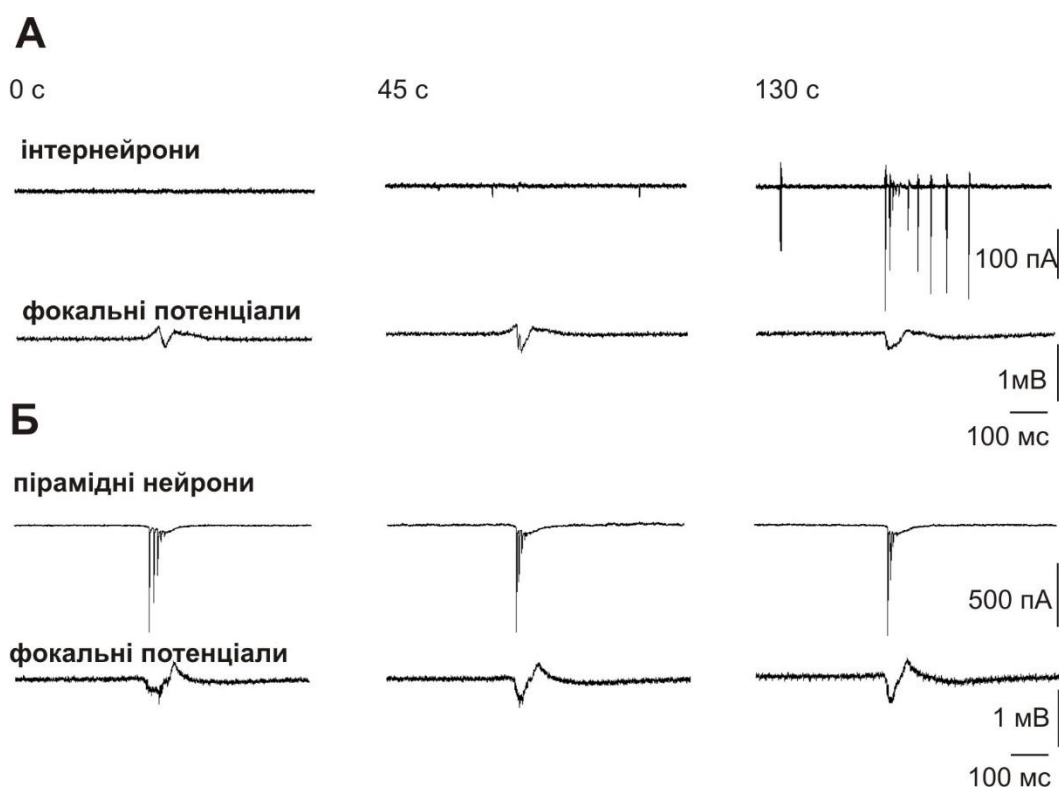


Рис. 4.7. Внесок інтернейронов і пірамідних нейронів в ініціацію та підтримання габазін-індукованої ІПА в шарах 2/3 ССК. Одночасна реєстрація позаклітинних польових потенціалів та потенціалів дії від поодиноких інтернейронів (А) або пірамідних нейронів (Б) в зрізі мозку щура (ФТ- група, вік 65 діб). Вимірювання потенціалів дії від поодиноких нейронів здійснювали з використанням методу петч-клемп в конфігурації «cell-attached».

4.3. Гальмівна синаптична передача в нейронах соматосенсорної кори.

В наступній серії експериментів досліджували вплив неонатальних судом на гальмівну синаптичну передачу в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК. сГПСС вимірювали від пірамідних нейронів на зрізах мозку 20-30- та 60-80-тиденних щурів контрольної та ФТ груп.

На **Рис 4.8.** наведено результати аналізу впливу неонатальних судом на амплітуду і частоту сГПСС в нейронах ССК. Значне зниження амплітуди сГПСС без змін у частоті цих струмів спостерігали в ФТ-групі порівняно з такими вимірами в контролі.

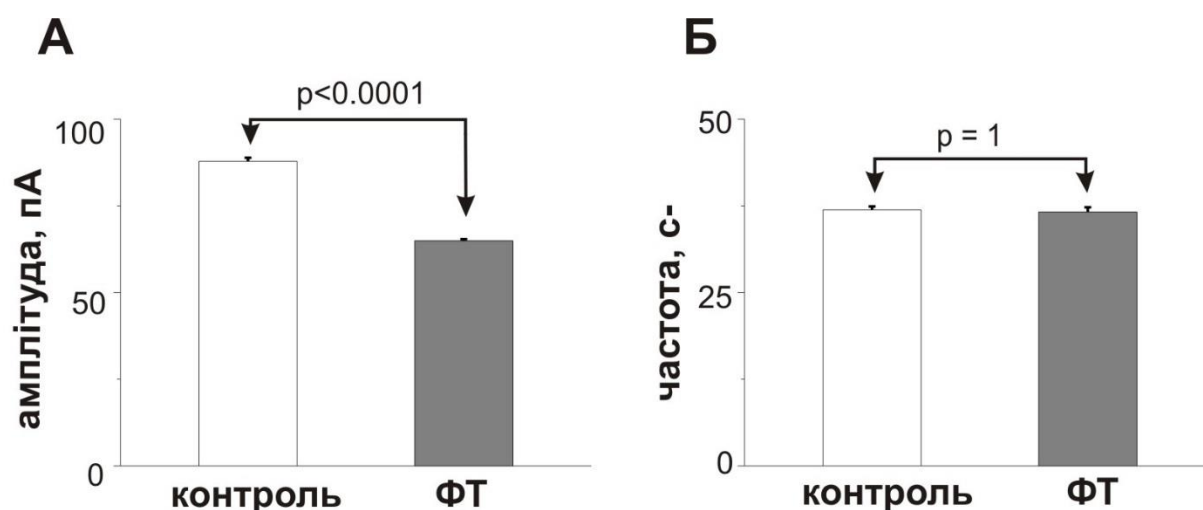


Рис. 4.8. Вплив неонатальних судом на амплітуду і частоту спонтанних гальмівних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК мозку 20-30-тиденних щурів. Діаграми амплітуд (А) і частот (Б) сГПСС в контрольній (білий) та ФТ(сірий) групах.

На **Рис. 4.9.** наведено результати аналізу впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики сГПСС в нейронах ССК щурів контрольної та ФТ груп. Показано, що усереднені показники часу наростання та напівширина сГПСС не розрізнялись в досліджених групах (**Рис. 4.9**).

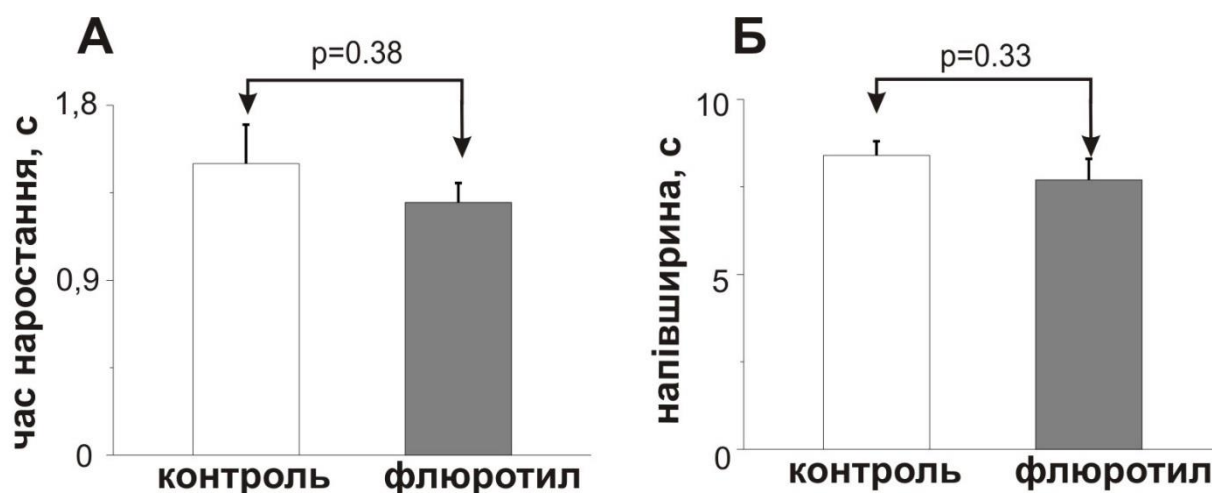


Рис. 4.9. Вплив неонатальних судом на кінетичні характеристики спонтанних гальмівних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 20-30-тиденних щурів. Діаграми часу наростання (А) і напівширини (Б) сГПСС в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

В наступній серії експериментів оцінювали вплив неонатальних епілептичних судом на незалежні від ПД ГПСС, викликані флуктуаційним вивільненням медіатору в синапсі. Мініатюрні ГПСС (мГПСС) вимірювали за присутності блокатору потенціалкерованих натрієвих каналів, ТТХ. На **Рис 4.10.** представлені результати досліджень впливу неонатальних судом на амплітуду і частоту мГПСС в нейронах ССК 20-30-ти денних щурів контрольної та ФТ груп.

Аналіз розподілу амплітуд і частот мГПСС показав статистично вірогідне зниження частоти мГПСС, без змін у амплітуді мГПСС в ФТ-групі порівняно з контролем ($P = 0,03$, **Рис. 4.10Б**).

На **Рис. 4.11** показано, що час наростання та напівширина мГПСС не розрізнялись між досліджуваними групами.

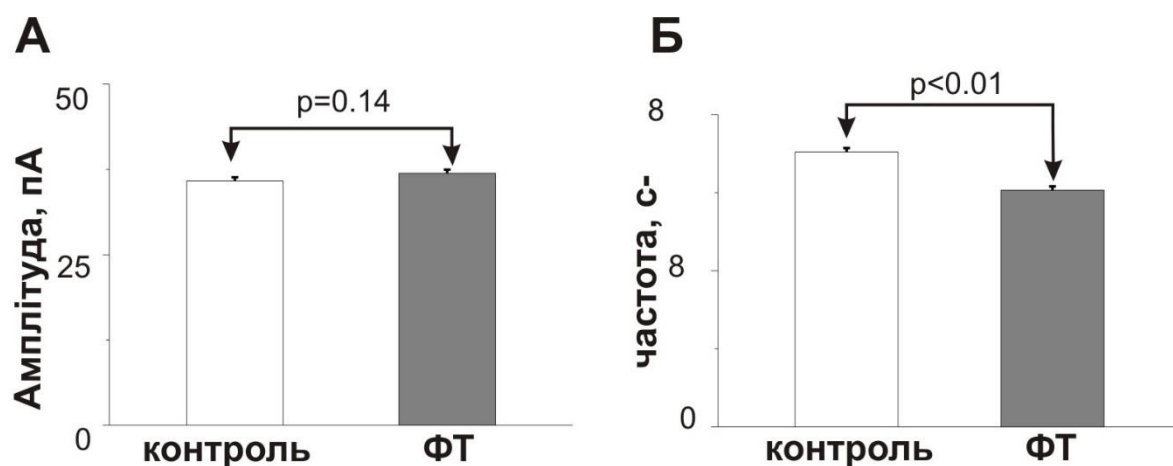


Рис. 4.10. Вплив неонатальних судом на мініатюрні гальмівні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 20-30-тиденних щурів. Діаграми амплітуд (А) і частот (Б) мГПСС в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

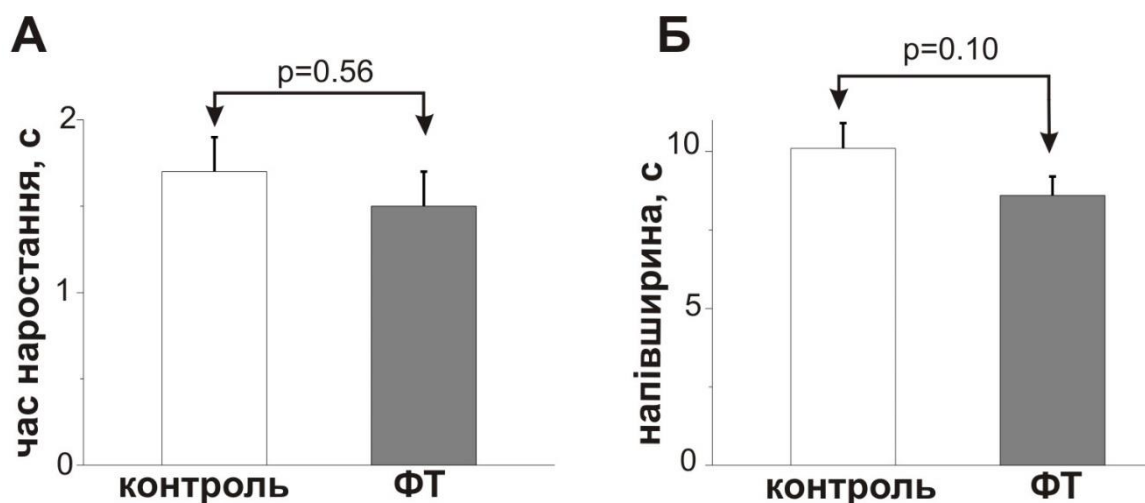


Рис. 4.11. Вплив неонатальних судом на кінетичні характеристики мініатюрних гальмівних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 20-30-тиденних щурів. Діаграми часу наростання (А) і напівширини (Б) мГПСС в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

У відведеннях від зрізів 60-80-тиденних щурів амплітуда сГПСС в нейронах ФТ-групи також була зменшена порівняно з амплітудою сГПСС в контрольній групі (ФТ-група: $47,7 \pm 0,6$ пА, $n = 18$, контрольна група $51,5 \pm 0,7$ пА, $n = 16$, $P < 0,001$, **Рис. 4.12**). Частота сГПСС не розрізнялася між досліджуваними групами (ФТ-група $5,3 \pm 0,1$ с⁻¹, контрольна група $5,2 \pm 0,1$ с⁻¹; $P = 0,7$).

Аналіз впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики сГПСС в нейронах ССК 60-80-тиденних щурів контрольної та ФТ груп показав, що усереднені показники часу наростання та напівширина сГПСС не розрізнялись між досліджуваними групами (час наростання: $2,9 \pm 0,5$ мс та $2,2 \pm 0,4$ мс; напівширина: $15,1 \pm 1,9$ мс та $16,4 \pm 2,3$ мс в контрольній та ФТ групах, відповідно).

Аналіз характеристик мГПСС, що вимірювали в нейронах ССК 60-80-тиденних щурів контрольної та ФТ груп показав статистично вірогідну різницю між групами у частоті мГПСС (контроль: $2,8 \pm 0,1$ с⁻¹, $n = 12$; ФТ група: $2,4 \pm 0,1$ с⁻¹, $n = 14$, $P < 0,001$, **Рис. 4.13В**) без змін у амплітуді мГПСС.

Отже, представлені дані вказують на хронічне зниження гальмівної синаптичної передачі в нейронах шарів 2/3 ССК у щурів з історією повторюваних неонатальних судом. Аналіз впливу неонатальних судом на характеристики мініатюрних постсинаптичних струмів вказує на пресинаптичний характер змін гальмівної синаптичної передачі в цих нейронах.

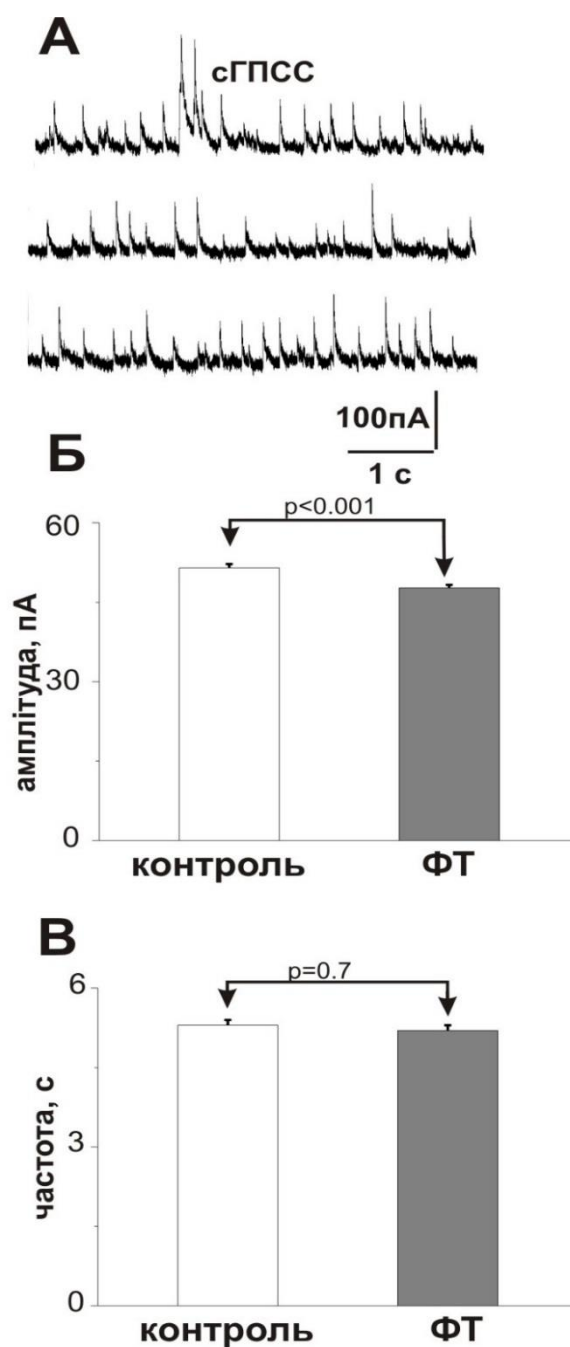


Рис. 4.12. Вплив неонатальних судом на спонтанні гальмівні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 60-80-тиденних щурів. (А) Приклади сГПСС відведених при підтримуваному потенціалі 0 мВ. Діаграми амплітуд (Б) та частот (В) сГПСС в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

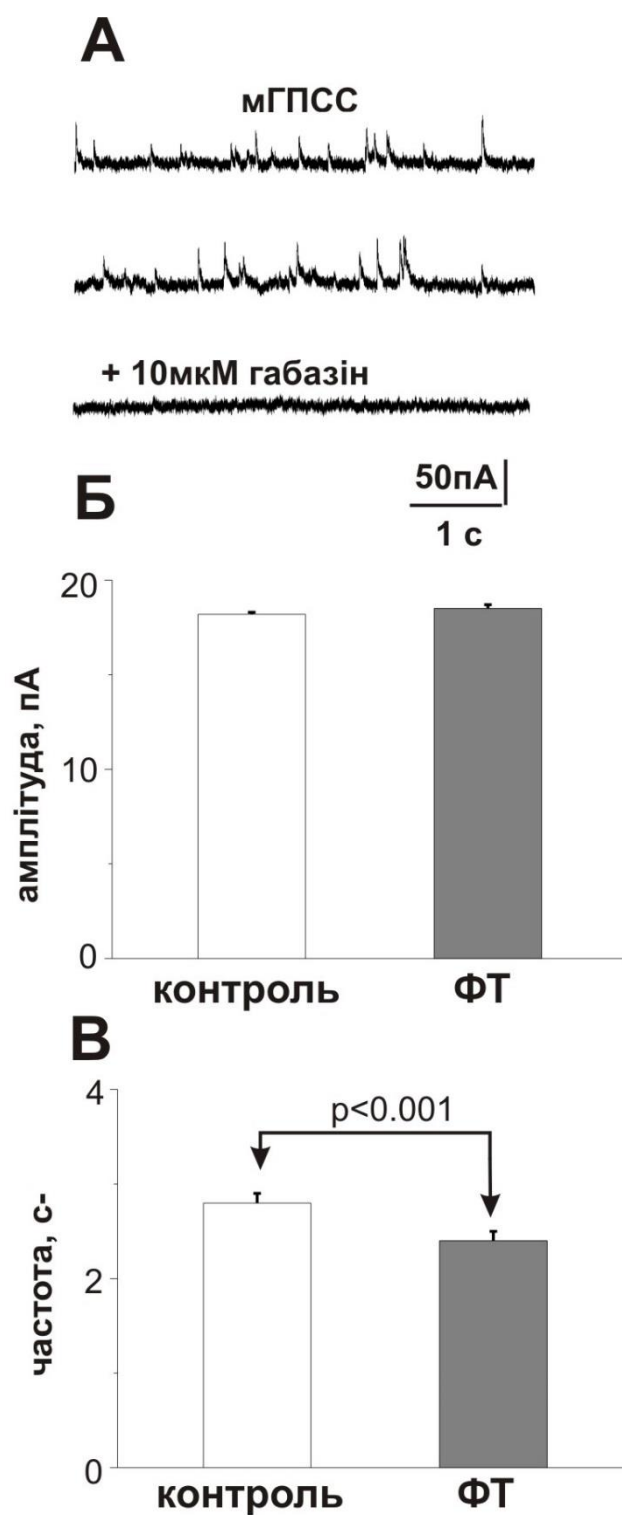


Рис. 4.13. Вплив неонатальних судом на мініатюрні гальмівні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 60-80-тиденних щурів. (А) Приклади мГПСС відведених від нейронів при підтримуваному потенціалі 0 мВ. Ефект додавання габазіну на мГПСС.

Діаграми амплітуд (Б) та частот (В) мГПСС в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

4.4. Збуджувальна синаптична передача в нейронах соматосенсорної кори

В наступній серії експериментів досліджували вплив неонатальних судом на збуджувальну синаптичну передачу в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК. сЗПСС вимірювали в нейронах на зрізах мозку 60-80-тиденних щурів контрольної та ФТ груп при підтриманому потенціалі -80 мВ та за присутності блокатора гальмівної синаптичної передачі габазіну в позаклітинному середовищі (10 мкМ). Середня амплітуда сЗПСС відведених від пірамідних нейронів ФТ-групи ($39,9 \pm 0,7$ пА, $n = 9$) була значно більшою порівняно з контролем ($33,0 \pm 0,6$ пА, $n = 8$, $p < 0,05$) (**Рис. 4.14Б**). Також у ФТ-групі ми виявили значне збільшення частоти сЗПСС (контроль: $2,1 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 8$; ФТ-група $2,7 \pm 0,1$ с⁻¹, $n = 9$; $p < 0,05$, **Рис 4.14В**). Час наростання та напівширина сЗПСС не розрізнялися між досліджуваними групами. При додаванні до позаклітинного розчину специфічного блокатора НМДА-рецепторів, D-APV у концентрації 50 мкМ, в контрольній групі амплітуда сЗПСС істотно не змінювалася ($31,8 \pm 0,5$ пА, $n = 13$, $p > 0,01$), але частота сЗПСС значно зменшувалася (з $2,1 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 8$ до $1,7 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 13$, $p < 0,01$) (**Рис 4.14В** порівняно з **Рис 4.15В**).

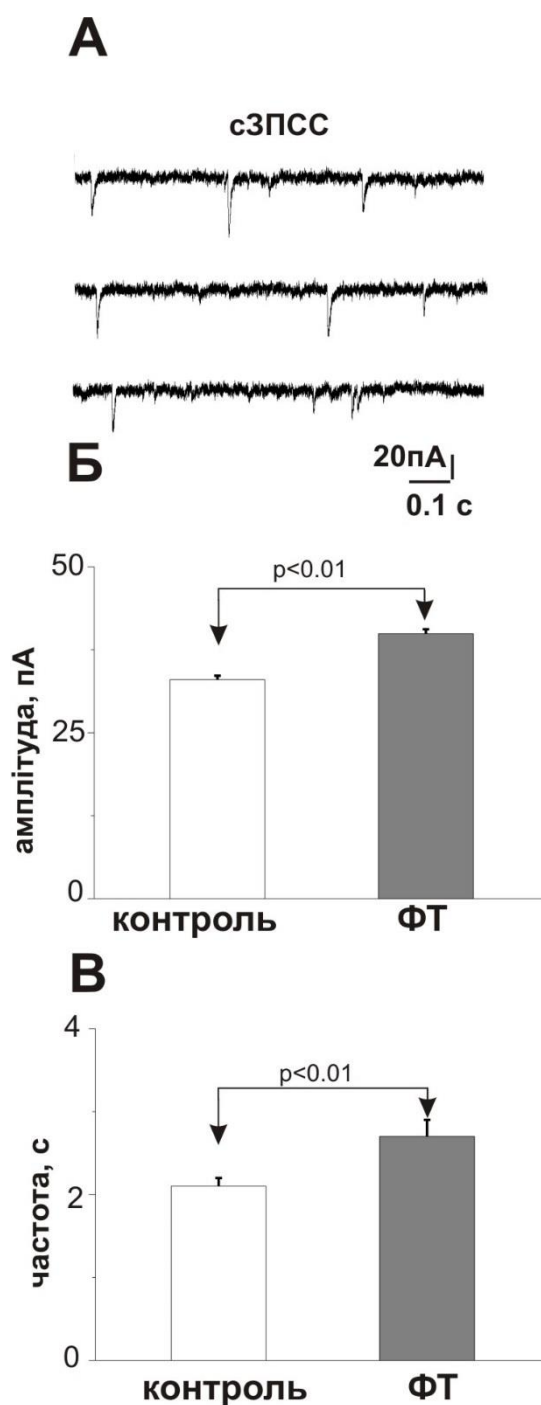


Рис. 4.14. Вплив неонатальних судом на спонтанні збуджувальні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 60-80-тиденних щурів. (А) Приклади сЗПСС відведених при підтриманому потенціалі -80 мВ за присутності 10 мкМ габазіну в

позаклітинному розчині. Діаграми вказують на збільшення частоти (Б) та амплітуди (В) сЗПСС в ФТ-групі (сірий) порівняно з контрольною групою (білий).

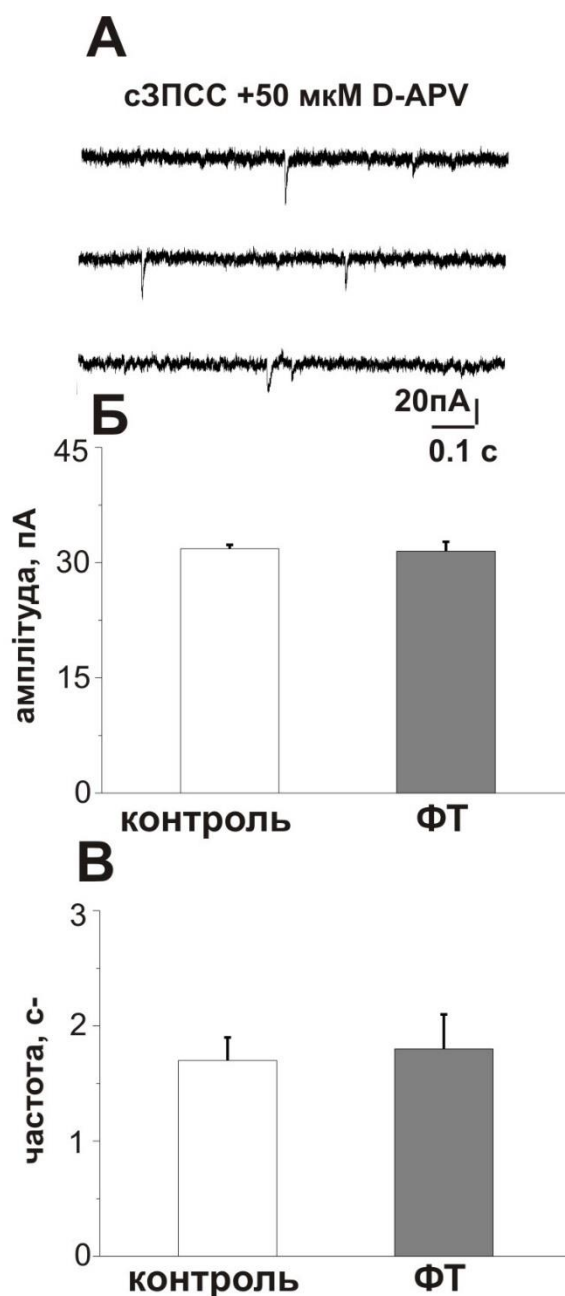


Рис. 4.15. Вплив неонатальних судом на спонтанні збуджувальні постсинаптичні струми за присутності в позаклітинному розчині 10 мкМ

габазіну і 50 мкМ D-APV. (А) Приклади сЗПСС відведених від нейронів ССК при підтриманому потенціалі -80 мВ за умов присутності 10 мкМ габазіну та 50 мкМ D-APV. Сумарні графіки амплітуд (Б) та частот (В) АМПА сЗПСС в ФТ-групі (сірий) порівняно з контрольною групою (білий).

В ФТ-групі ми виявили значне зниження амплітуди сЗПСС за умов присутності блокатора НМДА-рецептора, D-APV, в позаклітинному розчині (з $39,9 \pm 0,7$ пА до $31,5 \pm 1,2$ пА, $n = 15$, $P < 0,001$, **Рис. 4.15Б** порівняно з **Рис. 4.14Б**) та зниження частоти сЗПСС (з $2,7 \pm 0,1$ с⁻¹, $n = 9$ до $1,8 \pm 0,3$ с⁻¹, $n = 15$, $P < 0,001$, **Рис 4.14В** порівняно з **Рис 4.15В**). Кінетичні параметри сЗПСС за даних умов не розрізнялись в досліджених групах.

Аналіз характеристик мЗПСС, що відводили від нейронів шарів 2/3 ССК щурів контрольної та ФТ груп, показав статистично вірогідну різницю в частоті мЗПСС (контроль: $1,9 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 21$; дослідна група: $2,3 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 14$, $P < 0,01$, **Рис. 4.16В**). Амплітуда та кінетичні характеристики мЗПСС істотно не розрізнялись між досліджуваними групами. Додавання D-APV до позаклітинного розчину призвело до тотального зменшення амплітуди мЗПСС в контрольній і ФТ групах (контроль: з $16,1 \pm 0,2$ пА, $n = 21$, до $15,3 \pm 0,2$ пА, $n = 10$, $P < 0,05$; дослідна група: з $16,3 \pm 0,2$ пА, $n = 14$, до $15,2 \pm 0,1$ пА, $n = 11$, $P < 0,05$). Частота мЗПСС в контрольній групі зменшилась не істотно після додавання D-APV в позаклітинній розчин (з $1,9 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 21$, до $1,8 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 10$, $P > 0,05$). Однак, додавання D-APV значно зменшило частоту мЗПСС в ФТ-групі (з $2,3 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 14$, до $1,9 \pm 0,2$ с⁻¹, $n = 11$, $P < 0,01$). В умовах блокади НМДА-рецепторів частота мЗПСС в досліджених групах статистично не розрізнялася (**Рис 4.17В**).

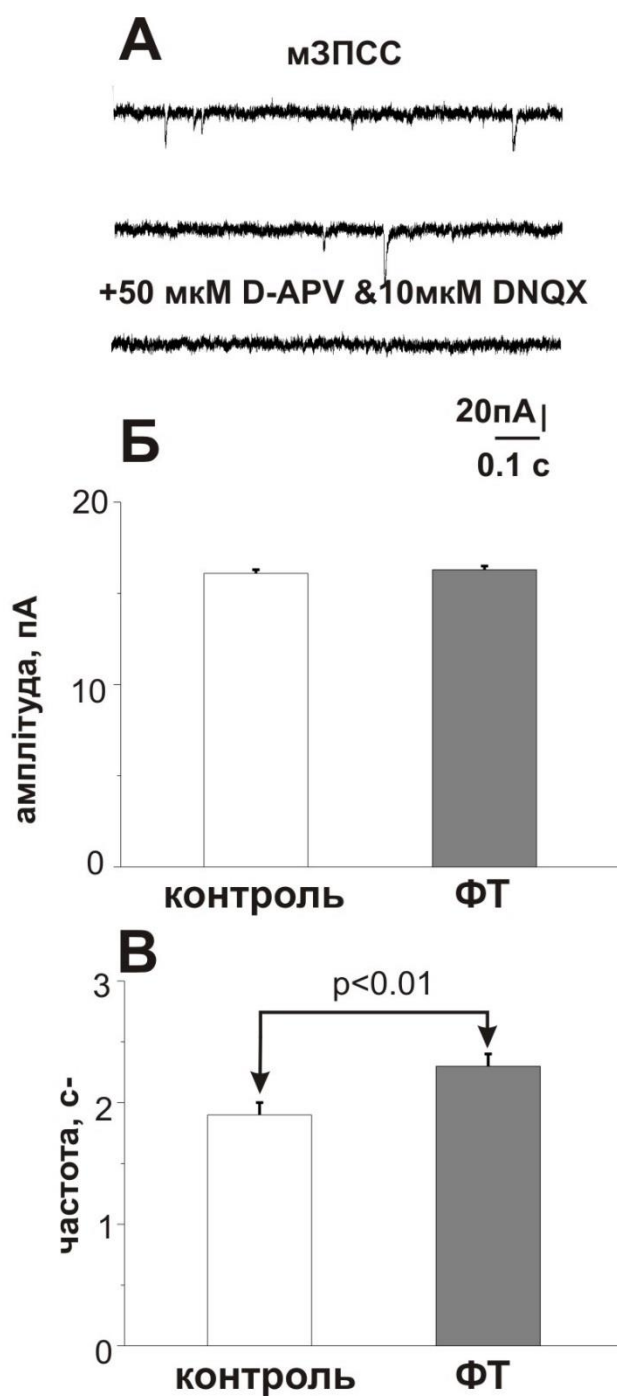


Рис. 4.16. Вплив неонатальних судом на мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 60-80-тиденних щурів. (А) Приклади мЗПСС відведених від нейронів при підтриманому потенціалі -80 мВ за умов присутності в позаклітинному розчині 10 мкМ габазіну. Додавання в позаклітинний розчин 50 мкМ D-APV та

10мкМ DNQX призводило до повного пригнічення мЗПСС. Сумарні графіки вказують на зростання частоти (В) без змін у амплітуді (Б) мЗПСС в ФТ-групі (сірий) порівняно з контрольною групою (білий).

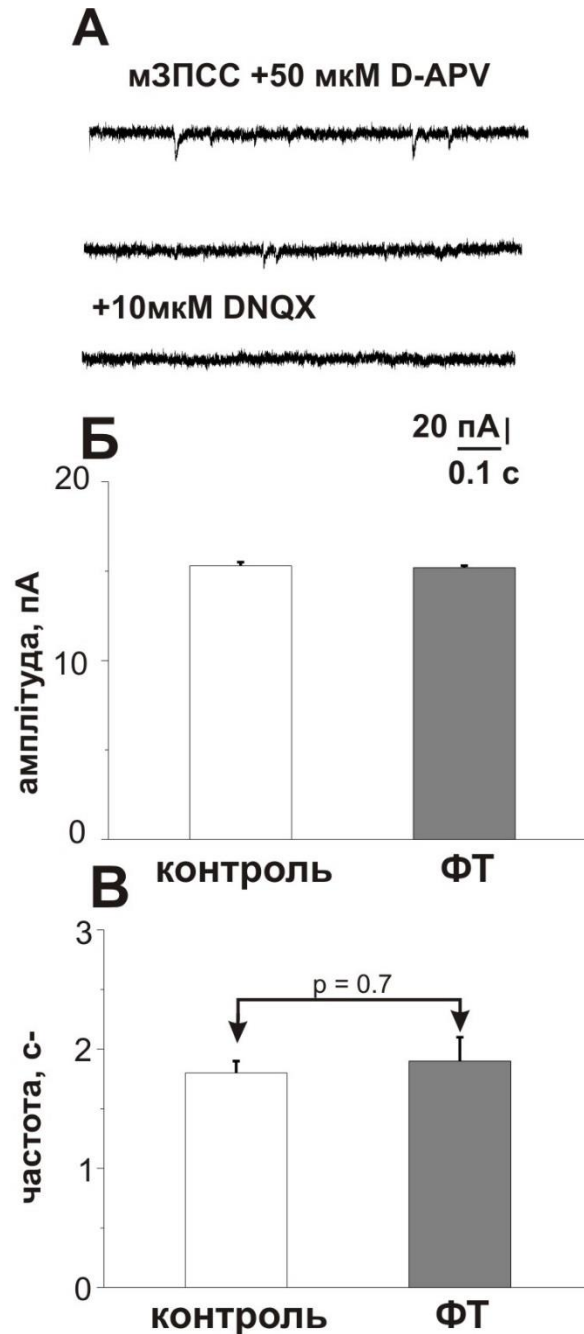


Рис. 4.17. Вплив неонатальних судом на мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку 60-80-тиденних щурів за умов присутності в позаклітинному розчині 10

мкМ габазіну та 50 мкМ D-APV. (А) Приклади мЗПСС відведених від нейронів при підтриманому потенціалі -80 мВ за умов присутності 10 мкМ габазіну та 50 мкМ D-APV. Додавання в позаклітинний розчин 10 мкМ DNQX призводило до повного пригнічення постсинаптичних струмів, що вказує на те, що ці струми, опосередковані активацією АМПА-рецепторів. Сумарні графіки амплітуд (Б) і частот (В) мЗПСС в контрольній (білий) та ФТ групах (сірий).

Отже, наведені дані показують, що на відміну від досліджень на нейронах гіпокампа, повторювані судомні напади в період раннього розвитку призводять до хронічних змін збуджувальної синаптичної передачі в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК. Додавання D-APV з позаклітинний розчин призводило до зменшення амплітуди і частоти сЗПСС та частоти мЗПСС в нейронах ФТ-групи до рівня, що спостерігався в контрольній групі, що вказує на внесок НМДА-рецепторів у різницю в характеристиках ЗПСС між досліджуваними групами. Збільшення частоти мЗПСС в нейронах ССК головного мозку щурів з історією неонатальних нападів, швидше за все, віддзеркалює пресинаптичні зміни глутаматергічної синаптичної передачі.

4.5. Синаптична пластичність

В попередніх розділах показано, що епілептичні напади, спровоковані інгаляцією ФТ у неонатальний період життя, призводять до хронічних змін балансу збудження/гальмування синаптичної передачі в нейронах шарів 2/3 ССК та підвищення збудливості нервових мереж. Описані зміни можуть впливати на важливі процеси в цій зоні кори головного мозку такі, як синаптична пластичність. Відомо, що синапси утворені між нейронами шарів

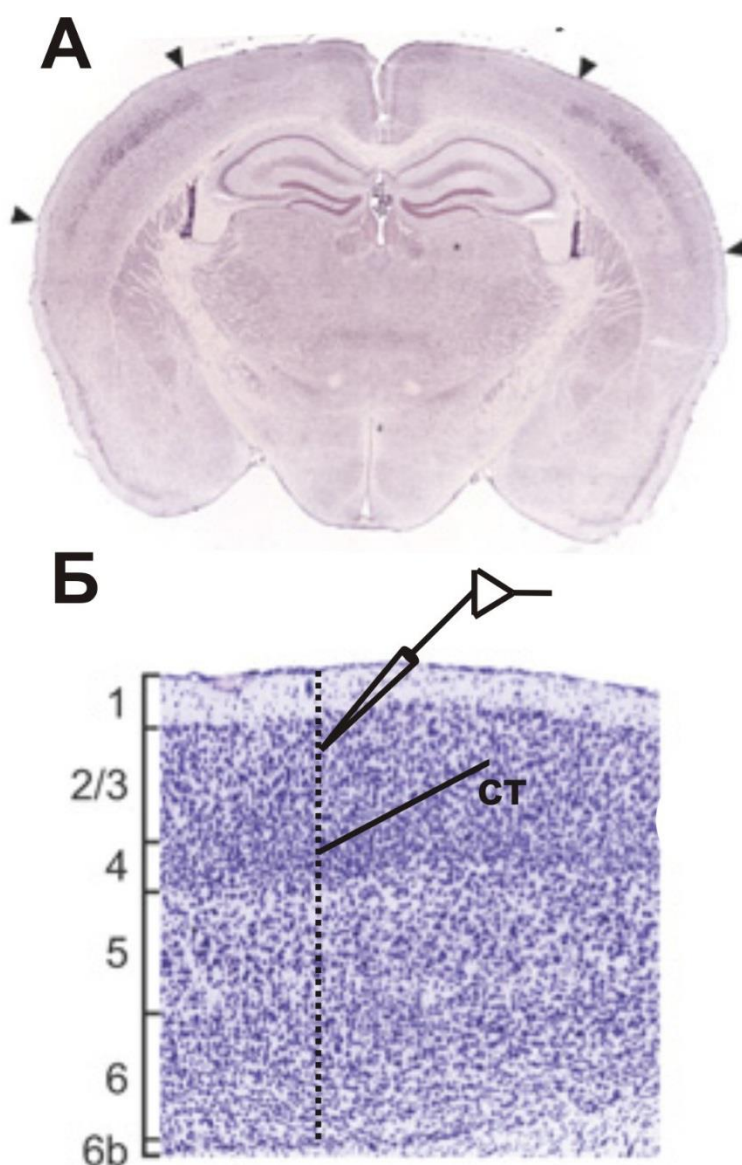


Рис 4.18. Схема розташування стимулюючого і відвідного електродів на зрізі мозку. (А) Ділянка ССК, де проводили дослідження, відмежована стрілками на коронарному зрізі мозку дорослого щура. (Б) Фрагмент ССК забарвлений тіоніном з позначеними шарами. Постсинаптичні потенціали викликали в шарах 2/3 ССК подразненням шару 4 відповідної колонки. Чорною лінією позначено місце розташування стимулюючого електрода, білий трикутник вказує на місце розташування відвідного електрода.

Переривчаста лінія показує, що стимулюючий електрод розміщали, таким чином, щоб активувати вертикальний синаптичний шлях.

4 та 2/3 ССК здатні до різних форм короткотривалої та довготривалої синаптичної пластичності [365]. В наступній серії експериментів ми досліджували вплив неонатальних епілептичних нападів на синаптичну пластичність між нейронами шарів 4 та 2/3 ССК (**Рис. 4.18**).

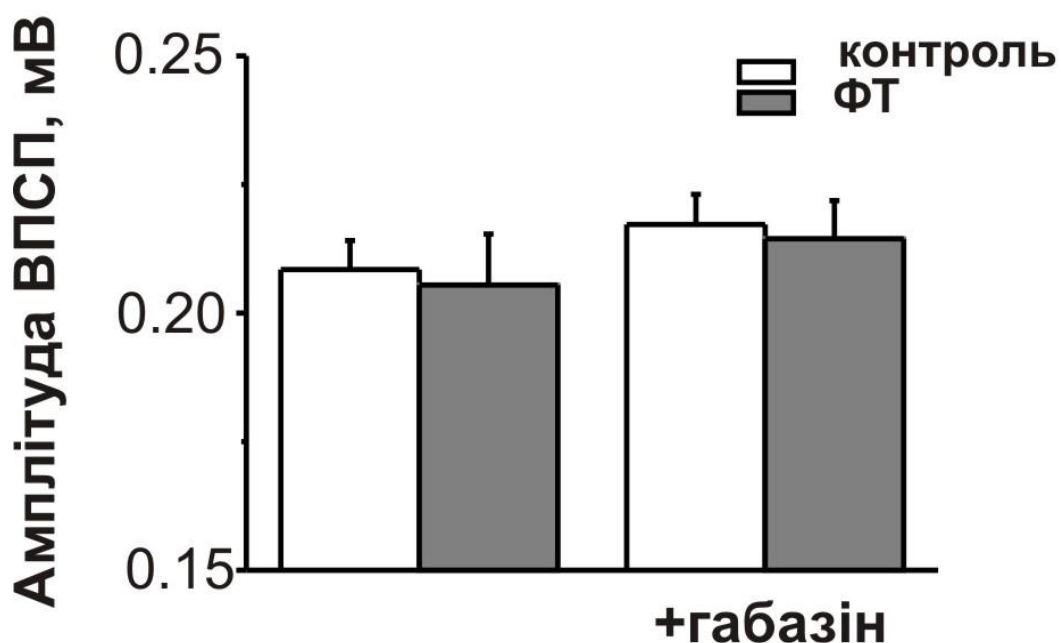


Рис 4.19. Неонатальні судоми не впливають на амплітуду викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) в нейронах шарів 2/3 ССК головного мозку. Діаграми амплітуд ВПСП до і після додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі, габазіну, в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

Після подразнення шару 4 ССК, ВПСП відводили від шару 2/3 відповідного стовпчика ССК протягом однієї години. Максимальна амплітуда ВПСП не розрізнялася між досліджуваними групами ($208,4 \pm 5,7$ мкВ, $n = 12$ в

контрольній групі порівняно з ФТ-групою, $205,5 \pm 9,9$ мкВ, $n = 7$, $P = 0,8$, **Рис. 4.19**). При додаванні блокатора ГАМК_A-рецепторів, габазіну у позаклітинний розчин амплітуди ВПСП не істотно збільшувались в контрольній ($217,2 \pm 5,8$ мкВ, $n = 16$) і в ФТ ($214,4 \pm 7,4$ мкВ, $n = 14$) групах (**Рис. 4.19**).

Для дослідження впливу повторюваних епілептичних нападів, викликаних інгаляцією ФТ, на синаптичну пластичність використовували протокол високочастотної стимуляції четвертого шару ССК на зрізах мозку тварин контрольної та ФТ груп описаний раніше [337]. Після подразнення шару 4 ВПСП відводили від шару 2/3 відповідної колонки ССК протягом однієї години із частотою $0,03 \text{ с}^{-1}$.

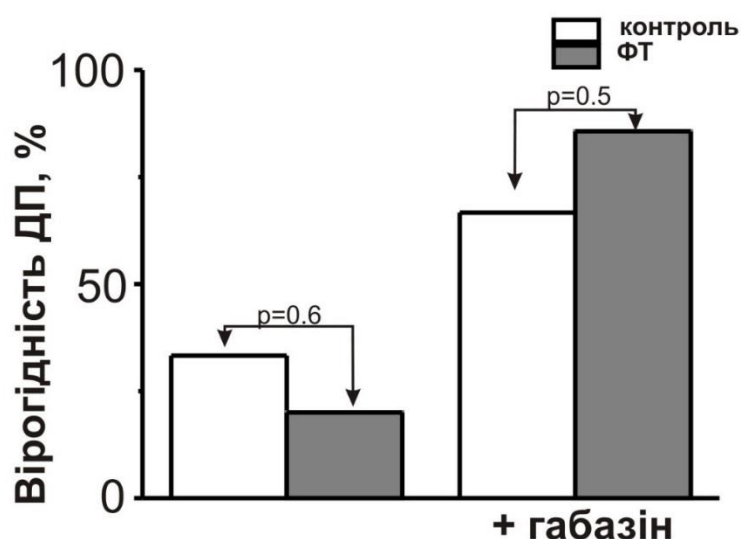


Рис 4.20. Вірогідність виникнення довготривалої потенціації в синапсах 4→2/3 ССК щурів досліджених груп. Аплікація 10 мкМ габазіну призводила до підвищення вірогідності виникнення довготривалої потенціації в обох досліджених групах. Неонатальні судоми не впливали на вірогідність виникнення довготривалої потенціації ВПСП.

Довготривалу потенціацію ВПСП (більше 30 хвилин) спостерігали в чотирьох з дванадцяти (33,3 %) зрізів контрольної групи та в двох із десяти

зрізів (20,0 %) ФТ-групи. В решті зрізів високочастотна стимуляція викликала короткотривалу потенціацію ВПСП (тривалістю 2-3 хв). Рівень максимальної потенціації амплітуди ВПСП після стимуляції в зрізах досліджених груп статистично не розрізнявся і становив в контрольній групі $120,2 \pm 13,0$ % ($n = 8$) та ФТ групі $130,1 \pm 9,8$ % ($n = 8$) від середнього значення базової амплітуди ВПСП, яку відводили протягом 10-20 хв перед стимуляцією ($P > 0,05$).

Відомо, що пригнічення ГАМК-ергічної синаптичної передачі може сприяти індукції довготривалої потенціації синаптичних відповідей [282]. За умов присутності 50 мкМ габазіну в позаклітинному розчині більшість зрізів в контрольній (6/9, 66.7%) та ФТ (6/7, 85.7%) групах відповідали на високочастотну стимуляцію тривалим підвищенням амплітуди ВПСП (**Рис. 4.20**). Додавання специфічного антагоніста НМДА-рецепторів, D-APV, призводило до пригнічення потенціації синаптичних відповідей в обох групах, що свідчить про залучення НМДА-рецепторів до індукції довготривалої потенціації в досліджених синапсах.

Аналіз даних показав, що за умов присутності габазіну в позаклітинному розчині середня максимальна потенціація ВПСП після тетанічної стимуляції суттєво не розрізнялася між групами: контроль, $157,8 \pm 6,5$ % та ФТ-група, $152,0 \pm 11,9$ %, $P = 0.7$ (**Рис. 4.21**). Через 50 хв після стимуляції потенціація амплітуди ВПСП спостерігалася тільки в ФТ- групі ($126,1 \pm 7,5$ %; $P = 0,01$ порівняно з базовою лінією). В контрольній групі через 50 хв після стимуляції амплітуда ВПСП повністю відновилася до базового рівня ($98,8 \pm 7,8$ %) (**Рис. 4.21**). Довготривала потенціація амплітуд ВПСП була значно збільшена в ФТ-групі порівняно з контролем ($P < 0,001$).

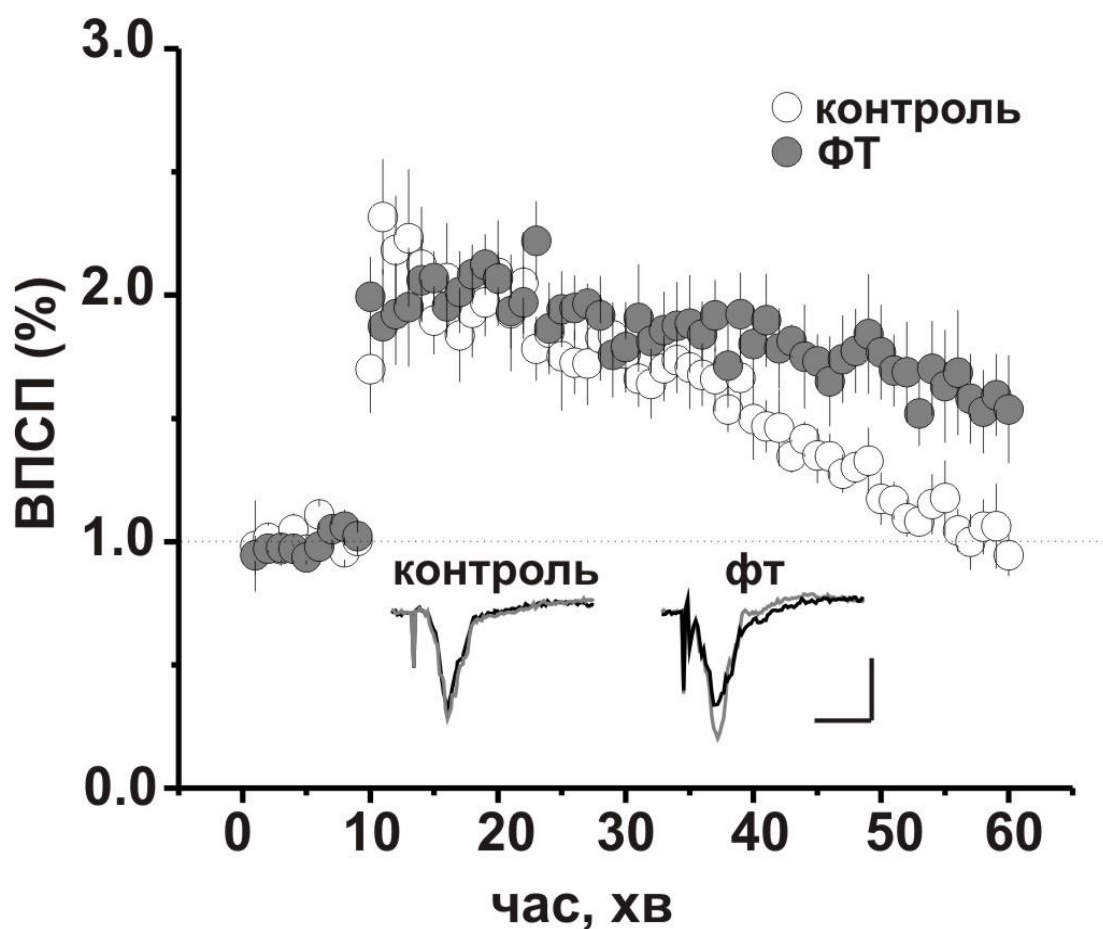


Рис. 4.21. Вплив неонатальних судом на довготривалу потенціацію синаптичних відповідей в ССК. Реєстрації проводили за умов присутності в позаклітинному розчині 50 мкМ габазіну. Нормовані амплітуди ВПСП до і після стимуляції. Приклади оригінальних записів ВПСП у шарах 2/3 ССК до (чорний) і через 50 хв після стимуляції (сірий). Шкала 0,3 мВ, 10 мс.

Впродовж високочастотної стимуляції спостерігалось значне зниження амплітуди ВПСП (Рис 4.22). Ця форма короткотривалої синаптичної пластичності була описана в різних ділянках мозку [366–368] і, як вважають, забезпечує специфічний синаптичний контроль кортикальних мереж [369].

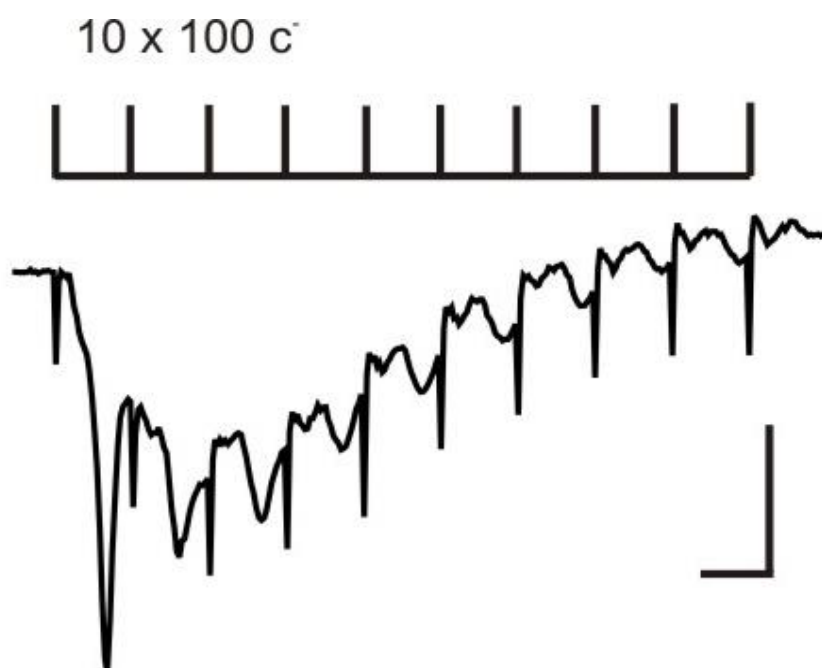


Рис. 4.22. Постсинаптичні потенціали в нейронах 2/3 шару ССК, викликані високочастотною стимуляцією четвертого шару відповідної колонки кори. Протокол стимуляції – 10 прямокутних імпульсів тривалістю 0,1 с і частотою 100 с⁻¹. Запис викликаних постсинаптичних потенціалів в шарах 2/3 ССК. Абсциса – 10 мс Ордината 0,3 мВ.

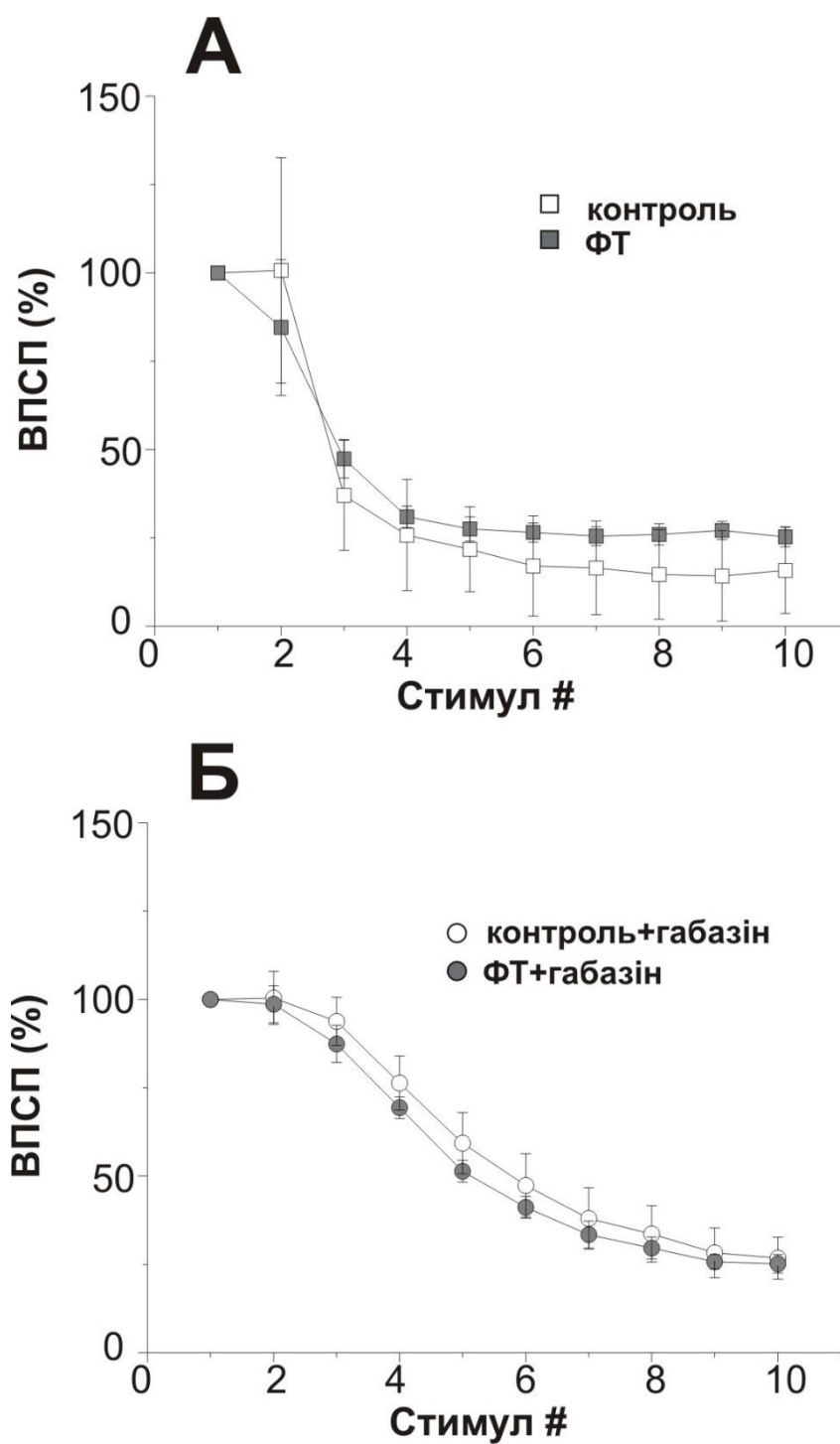


Рис 4.23. Вплив ФТ-індукованих судом на короткотривалу депресію викликаних постсинаптичних потенціалів. Депресія викликаних постсинаптичних потенціалів спостерігалася впродовж високочастотної

стимуляції в синапсах між шарами 4 і 2/3 ССК. На рисунку зображена залежність ВПСП нормованих за значенням амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на перший стимул, від порядкового числа стимулу. Білим кольором зображені середні амплітуди ВПСП в контрольних зрізах; сірим кольором позначені амплітуди ВПСП в зрізах ФТ-групи щурів до (А) і після (Б) додавання блокатора гальмівної синаптичної передачі, габазіну.

Високочастотна стимуляція викликала статистично достовірне зниження амплітуди ВПСП відносно базового рівня (до $15,8 \pm 0,1 \%$, $n = 7$ в контролі, та $25,2 \pm 0,1 \%$, $n = 5$ в ФТ-групі, $P < 0,001$ в обох досліджених групах, **Рис 4.23А**). За умов присутності габазіну в позаклітинному розчині зниження постсинаптичної відповіді впродовж високочастотної стимуляції відбувалося повільніше в обох досліджених групах порівняно з експериментами без додавання блокатора ГАМК-ергічної синаптичної передачі (**Рис. 4.23Б**), але впродовж 100 мс стимуляції амплітуда ВПСП знижувалася до рівня, який спостерігався без додавання габазіну ($26,8 \pm 0,1 \%$, $n = 10$ в контрольній та $25,2 \pm 0,1 \%$, $n = 7$ в ФТ-групі). Аналіз змін амплітуди ВПСП впродовж високочастотної стимуляції не виявив достовірної різниці між значеннями амплітуд ВПСП в досліджених групах за умов присутності або відсутності габазіну в позаклітинному розчині ($P > 0.05$, **Рис 4.23**).

Отже, результати дослідження впливу повторюваних неонатальних судом на синаптичну пластичність в синапсах 4→2/3 ССК показали, що

1) амплітуда ВПСП не розрізнялася в досліджених групах, що вказує на те, що неонатальні напади не впливають на синаптичну передачу в цьому вертикального шляху неокортексу;

2) неонатальні судами не впливали на вірогідність виникнення довготривалої потенціації в цих синапсах;

3) судомні напади, індуковані інгаляцією ФТ в неонатальний період, не впливали на середню максимальну посттетанічну потенціацію ВПСП та депресію ВПСП, що спостерігалася впродовж високочастотної стимуляції;

4) неонатальні судоми призводили до хронічного підвищення довготривалої потенціації амплітуди ВПСП, викликаній високочастотною стимуляцією.

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НЕОНАТАЛЬНИХ СУДОМНИХ НАПАДІВ НА НЕРВОВУ АКТИВНІСТЬ МЕДІАЛЬНОЇ ЗОНИ ПРЕФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ ЩУРІВ

В попередніх досліджах показано, що наявність неонатальних нападів має істотний вплив на збуджувальну та гальмівну синаптичну передачу в гіпокампі і ССК головного мозку щурів. Ще однією важливою ділянкою кори, де розвертаються ефекти стресової ситуації є ПФК, яка залучена у реалізацію численних функцій: регуляцію емоцій, процеси планування, прийняття рішень, формування оперативної пам'яті, уваги, контроль соціальної поведінки і міжіндивідуальних взаємодій. Розвиток ПФК у перебігу онтогенеза є досить тривалим. Так у людини дозрівання ПФК триває до 20-річного віку [370–373], що співвідноситься з тим, що вищі психічні функції, безпосередньо пов'язані з роботою ПФК, досягають свого повного розвитку приблизно в цьому віці [374]. Якщо взяти до уваги винятково важливу роль ПФК в організації психічної діяльності людини та тривалий онтогенез цієї ділянки порівняно з іншими структурами мозку, видається вірогідним, що ЕФА в період раннього розвитку може спричинити негативний вплив на розвиток функції цієї структури і, як наслідок, зумовити появу когнітивних та поведінкових порушень в подальшому житті. Це припущення підтверджується попередніми дослідженнями. Так, з використанням ФТ моделі неонатальних судом було показано, що епілептичні напади в період раннього розвитку призводять до різноманітних тривалих змін ПФК-залежних поведінкових феноменів [138, 139]. Клітинні механізми негативного впливу неонатальних судом на функцію ПФК поки залишаються в значній мірі невивченими. Тому в наступній серії експериментів ми досліджували вплив неонатальних судомних нападів у щурів на синаптичну активність в ПФК.

5.1. Синаптична передача в нейронах медіальної зони префронтальної кори

Дослідження впливу неонатальних ФТ-індукованих судом на синаптичну передачу в мПФК проводили на пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК щурів віком 47 - 60 діб після народження.

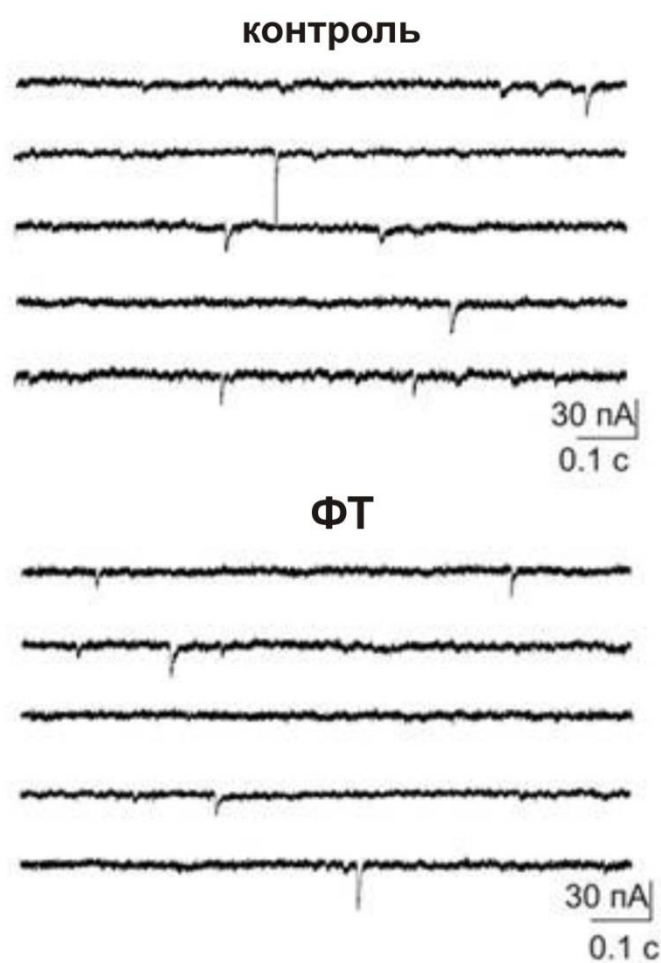


Рис. 5.1. Мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК щурів контрольної та ФТ груп. Запис струмів при підтримуваному потенціалі -65 мВ за умов присутності блокатора потенціал-залежних натрієвих каналів, ТТХ, та блокатора гальмівної синаптичної передачі, габазіну, в позаклітинному розчині

Пірамідні нейрони шару 5 мПФК є основними вихідними нейронами мПФК, що мають проєкції як на інші клітини кори, так і на нейрони низки підкіркових структур. Підвищення активності пірамідних нейронів ПФК, котра спостерігається під час фази затримки при виконанні поведінкових тестів, вказує на те, що дані нейрони можуть бути залучені у кодування інформації в оперативній пам'яті [343].

На **Рис. 5.1** зображено приклади запису мЗПСС в нейронах п'ятого шару мПФК при підтримуваному потенціалі -65 мВ за умов присутності в позаклітинному розчині блокатора потенціал-залежних натрієвих каналів, ТТХ, та блокатора гальмівної синаптичної передачі, габазіну.

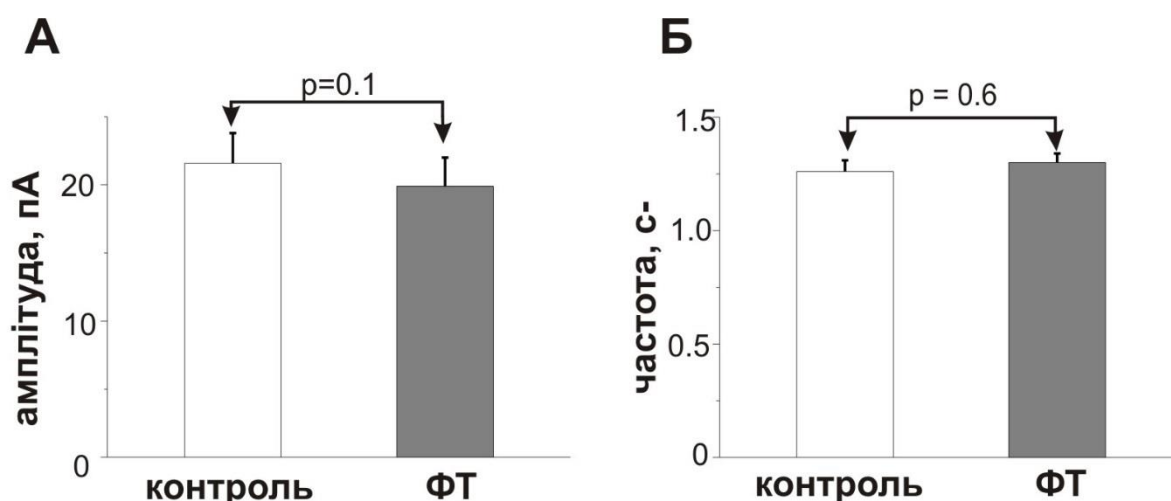


Рис 5.2. Вплив неонатальних судом на мініатюрні збуджувальні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах п'ятого шару медіальної зони префронтальної кори головного мозку щурів. Діаграми амплітуд (А) і частот (Б) мЗПСС в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах.

На **Рис 5.2.** представлено сумарні діаграми амплітуд та частот мЗПСС, що вимірювали в нейронах шару 5 мПФК. Показано, що частота

мЗПСС (контроль: $1,26 \pm 0,05 \text{ с}^{-1}$, $n = 11$; ФТ- група: $1,29 \pm 0,04 \text{ с}^{-1}$, $n = 10$) та амплітуда мЗПСС (контроль: $21,6 \pm 2,2 \text{ пА}$, $n = 11$; ФТ- група: $19,9 \pm 2,1 \text{ пА}$, $n = 10$) статистично не розрізнялись між досліджуваними групами (відповідно, $P = 0,6$ та $P = 0,1$).

На **Рис. 5.3** наведено результати аналізу впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики мЗПСС в нейронах мПФК досліджених груп. Показано, що усереднені показники часу наростання та напівширина мЗПСС не розрізнялись між досліджуваними групами (час наростання та напівширина для контролю: $1,0 \pm 0,1 \text{ мс}$ і $7,2 \pm 0,8 \text{ мс}$, $n = 11$; для ФТ- групи: $1,2 \pm 0,1 \text{ мс}$ та $8,0 \pm 0,5 \text{ мс}$, $n = 10$).

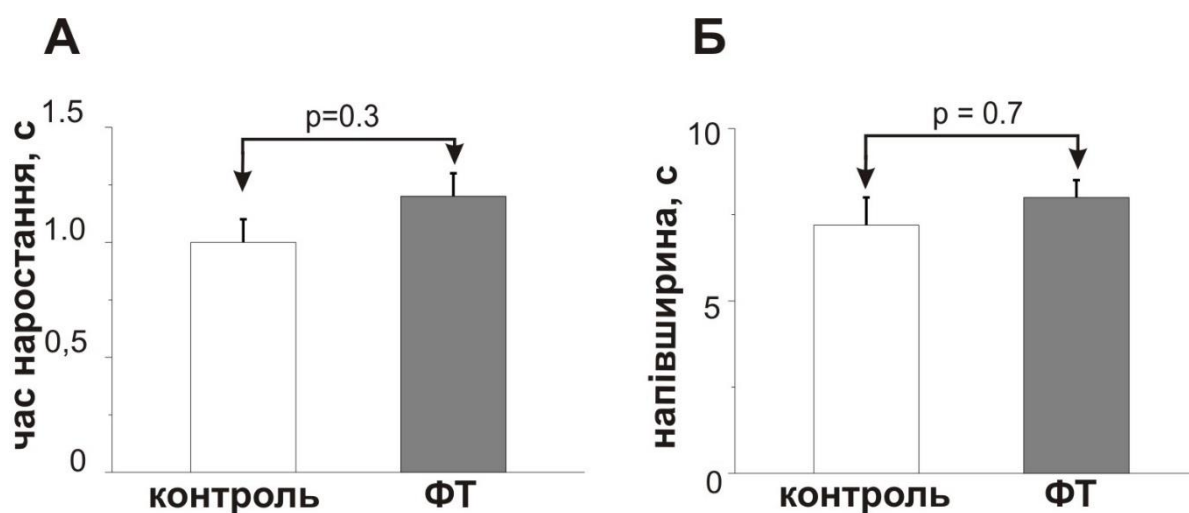


Рис 5.3. Вплив неонатальних судом на кінетичні характеристики мініатюрних збуджувальних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК головного мозку щурів. Діаграми часу наростання (А) і напівширини (Б) мЗПСС в пірамідних клітинах мПФК в контрольній (білий) та ФТ (сірий) групах щурів.

Для оцінки впливу неонатальних судомних нападів на гальмівну синаптичну передачу в мПФК вимірювали мГПСС в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК. мГПСС відводили при підтримуваному потенціалі 0 мВ за умов присутності в позаклітинному розчині блокатора потенціал-залежних натрієвих каналів, ТТХ. На **Рис 5.4** показано, що амплітуда мГПСС не розрізнялася між досліджуваними групами (контроль: $16,7 \pm 3,2$ пА, $n = 14$; ФТ-група: $15,2 \pm 1,5$ пА, $n = 16$). Частота мГПСС в ФТ-групі ($1,6 \pm 0,5$ с⁻¹, $n = 14$) була значно меншою, ніж в контрольній групі ($2,2 \pm 0,1$ с⁻¹, $n = 16$, $P < 0,05$).

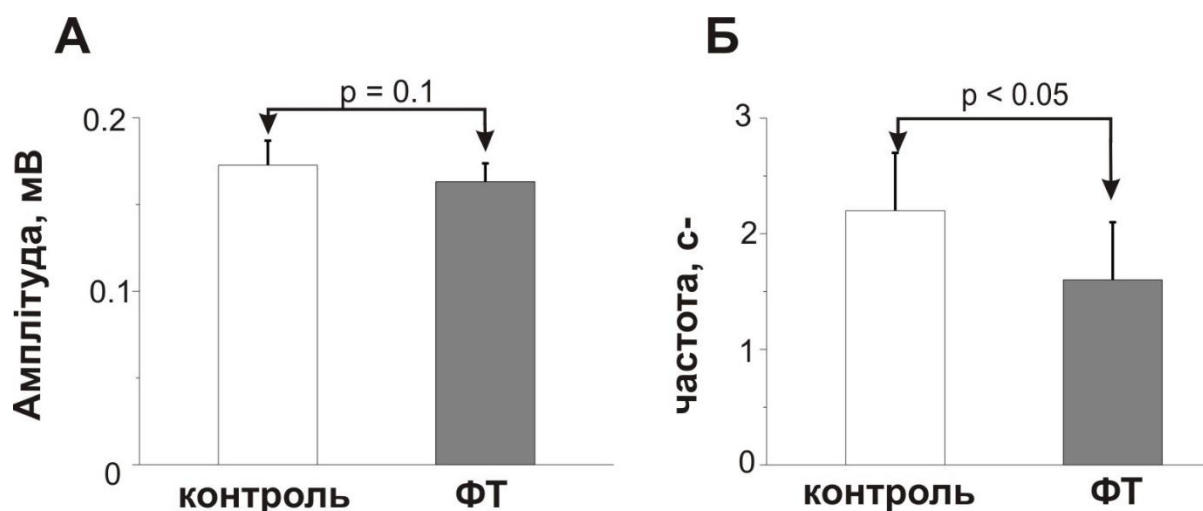
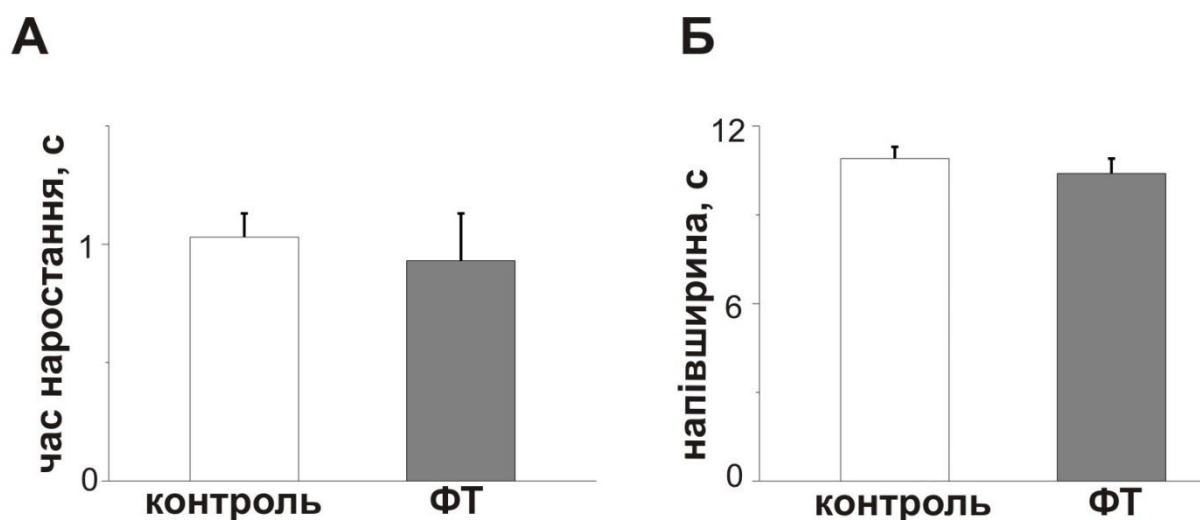


Рис 5.4. Вплив неонатальних судом на мініатюрні гальмівні постсинаптичні струми в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК головного мозку щурів. Діаграми амплітуди (А) і частоти (Б) мГПСС не розрізнялись між контрольною (білий) та ФТ (сірий) групами.

На **Рис 5.5** наведено результати аналізу впливу неонатальних судом на кінетичні характеристики мГПСС в пірамідних нейронах мПФК

контрольної та ФТ груп. Показано, що кінетичні характеристики мГПСС істотно не розрізнялися між досліджуваними групами.



***Рис. 5.5.** Вплив неонатальних судом на кінетичні характеристики мініатюрних гальмівних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК головного мозку щурів. Діаграми часу наростання (А) і напівширини (Б) мГПСС в пірамідних клітинах мПФК в контрольній (білий) та ФТ(сірий) групі щурів.*

Отже, наведені дані вказують на те, що повторювані судомні напади під час раннього розвитку призводять до хронічного зниження частоти гальмівних синаптичних відповідей в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК. Порівняльний аналіз мініатюрних збуджувальних постсинаптичних струмів в пірамідних нейронах п'ятого шару мПФК щурів контрольної та ФТ груп не виявив різниці в жодному з досліджених параметрів спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів між досліджуваними групами, що

вказує на те що, неонатальні напади не впливають на збуджуючу синаптичну передачу цих нейронів.

5.2. Викликані постсинаптичні потенціали

Відомо, що апікальні дендрити пірамідних клітин 5-го шару мПФК отримують безліч збуджувальних входів від пірамідних клітин 2-3-го шарів [304, 375]. Також показано, що нейрони 5-ого шару іннервують сусідні нейрони, формуючи локальну мережу взаємопов'язаних пірамідних нейронів глибоких шарів неокортексу [306, 307]. В наступній серії експериментів ми досліджували вплив повторюваних неонатальних нападів на амплітуду ВПСП при передачі між шарами 2/3 і 5, а також в межах шару 5 мПФК (**Рис 5.6**).

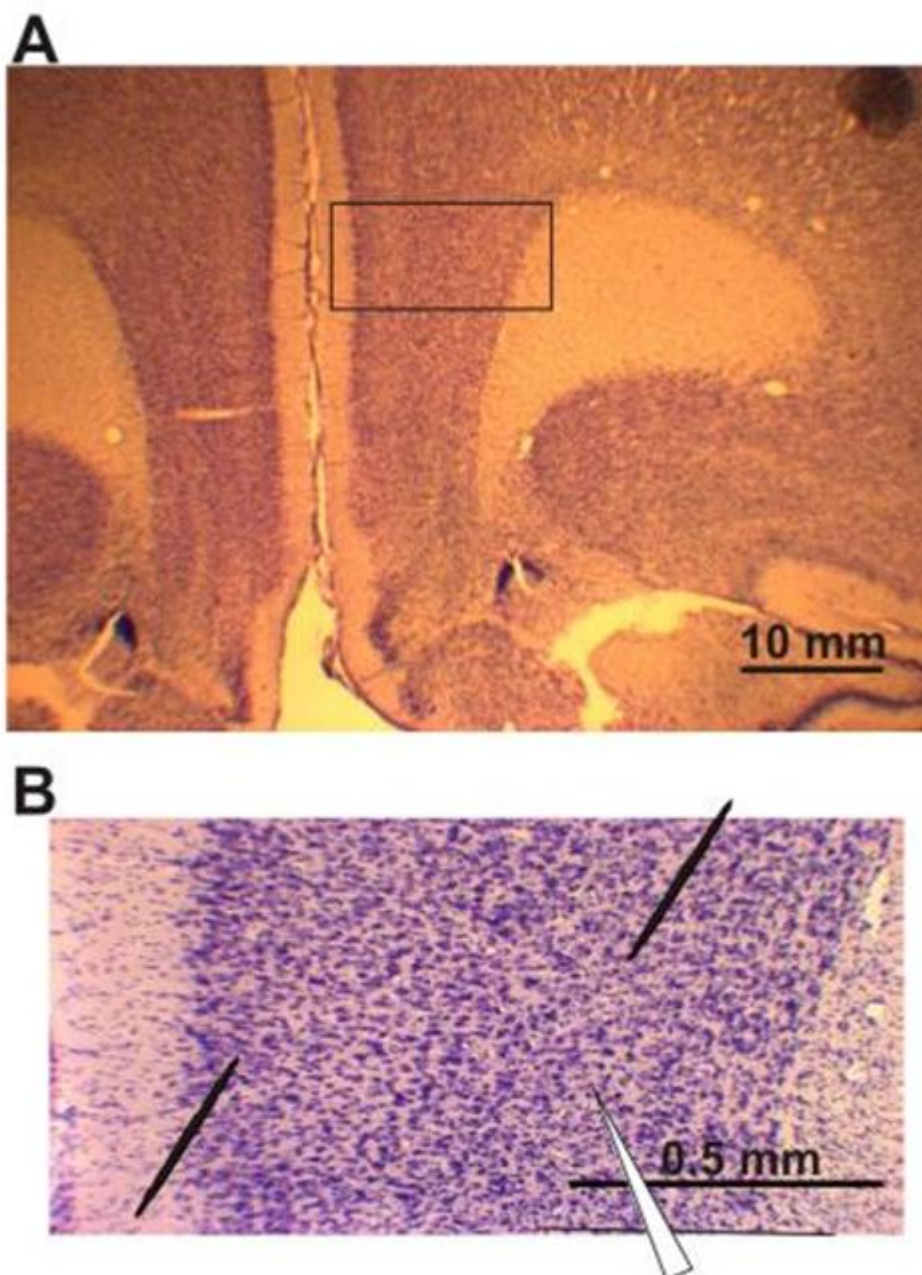


Рис 5.6. Схема розташування стимулюючих і відвідних електродів на зрізі мозку (А) На зрізі мозку щура відокремлена медіальна зона префронтальної кори, де було проведено дослідження. (В) Постсинаптичні потенціали викликали подразненням шарів 5 або 2/3 мПФК та вимірювали в шарі 5 мПФК. Чорними лініями позначено місця розташування стимулюючих

електродів, білий трикутник вказує на місце розташування відповідного електроду.

Стимуляція шарів 2/3 або 5 мПФК викликала ВПСП в шарі 5 мПФК у всіх зрізах досліджених груп. Амплітуда ВПСП становила в контрольній групі $172,6 \pm 14,2$ мкВ, $n = 40$ в синапсах між шарами 2/3 та 5; $159,2 \pm 14,2$ мкВ, $n = 32$ у межах шару 5 та в дослідній групі, відповідно, $163,1 \pm 10,6$ мкВ, $n = 36$, та $167,6 \pm 14,2$ мкВ, $n = 30$. Аналіз даних показав, що амплітуда ВПСП не розрізнялася між досліджуваними групами ($P = 1$ в синапсах між шарами 2/3 та 5; $P = 0.6$ у межах шару 5 мПФК, **Рис. 5.7**).

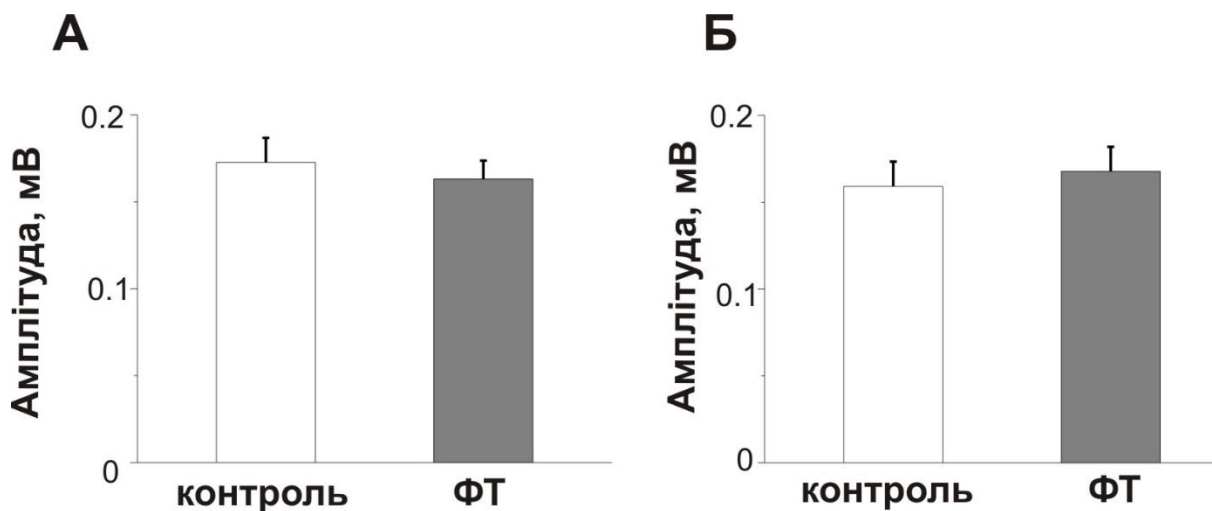


Рис 5.7. Неонатальні судомні напади не впливають на амплітуду викликаних постсинаптичних потенціалів в п'ятому шарі мПФК щурів. Діаграми амплітуд ВПСП в синапсах між шарами 2/3 і 5 (А) та у межах шару 5 мПФК (Б).

5.3. Короткотривала синаптична пластичність

Для дослідження впливу повторюваних неонатальних судом на короткотривалу синаптичну пластичність в синапсах мПФК використовували:

- 1) протокол парної стимуляції (ініціація фасилітації синаптичних відповідей);
- 2) протокол короткотривалої тетанічної стимуляції (ініціація посттетанічної потенціації і короткотривалої потенціації впродовж стимуляції) .

Фасилітація синаптичних відповідей

Парні подразнення шарів 2/3 або 5 мПФК проводили із різним інтервалом між стимулами (15, 25, 50, 100 та 400 мс). Відомо, що у відповідь на парну стимуляцію може спостерігатися збільшення або зменшення амплітуди ВПСР в залежності від початкової ймовірності вивільнення медіатора [376]. Депресія амплітуди ВПСР у відповідь на друге подразнення спостерігалася незалежно від інтервалу між стимулами в 1-2 зрізах в кожній з досліджених груп. Ці зрізи були виключені з подальшого аналізу. В інших зрізах як контрольної, так і ФТ групі парна стимуляція шарів 2/3 або 5 мПФК викликала значну фасилітацію амплітуди ВПСР у відповідь на другий стимул в шарі 5 при інтервалах між стимулами від 15 до 100 мс, з максимальним значенням фасилітації амплітуди ВПСР при інтервалі між стимулами 50 мс (**Рис. 5.8-9**). Аналіз даних показав, що фасилітація амплітуди ВПСР не розрізнялася між досліджуваними групами при стимуляції шарів 2/3 ($n = 53$ контроль, $n = 31$ дослідна група, $P = 0,4$, **Рис. 5.8**) або 5 ($n = 40$ контроль, $n = 24$ дослідна група, $P = 0,2$, **Рис. 5.9**) мПФК.

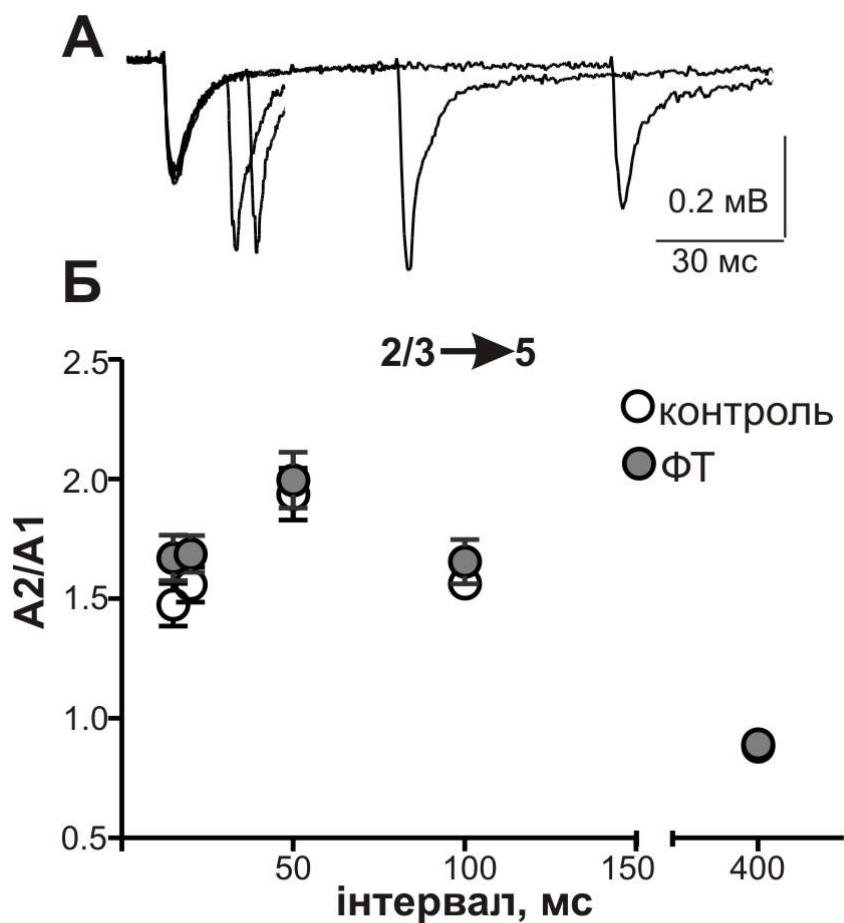


Рис. 5.8. Неонатальні судомні напади не впливають на синаптичну пластичність викликану парною стимуляцією в синапсах 2/3 → 5 мПФК (А) Усереднені (3-4 реєстрації) ВПСП після додавання пари стимулів із інтервалами 15, 25, 50 та 100 мс відведені в зрізі контрольної групи. (Б) Залежність значення співвідношення амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на другий стимул (А2), до амплітуди ВПСП, викликаних у відповідь на перший стимул (А1), під час парної стимуляції від інтервалу між стимулами.

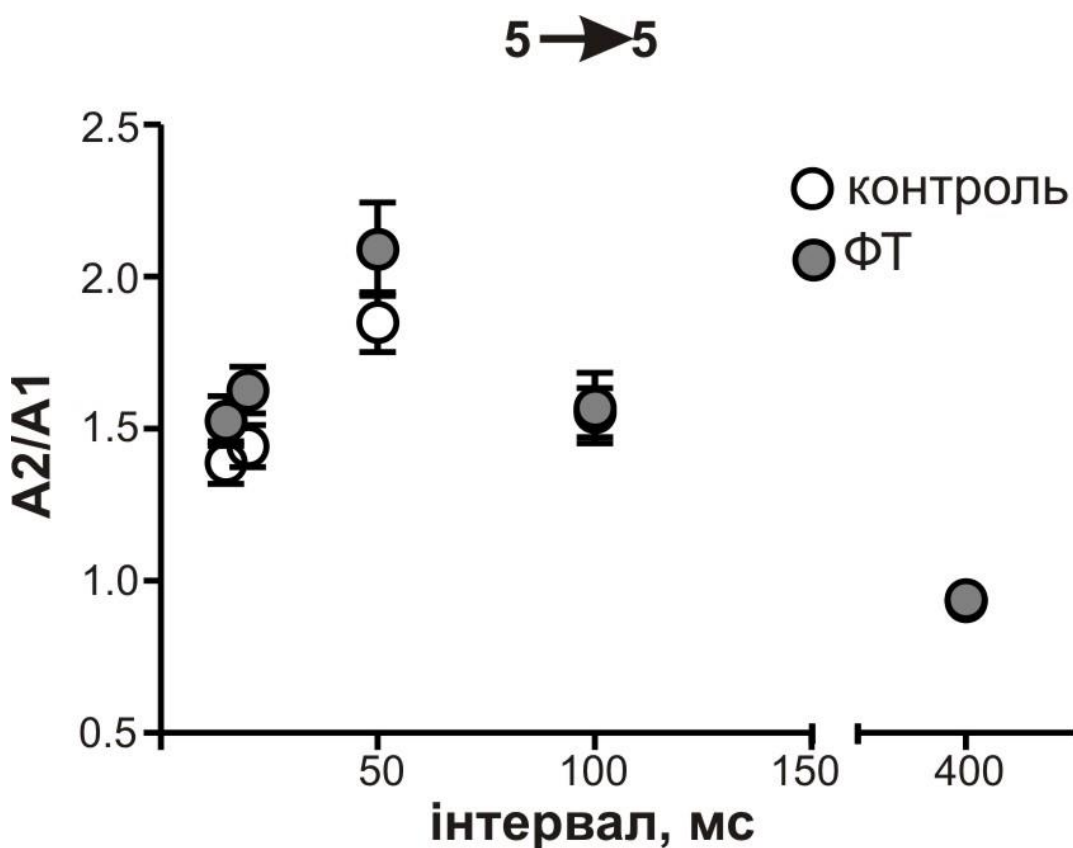


Рис. 5.9. Неонатальні судомні напади не впливають на синаптичну пластичність викликану парною стимуляцією в синапсах $5 \rightarrow 5$ мПФК. Залежність значення співвідношення амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на другий стимул ($A2$), до амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на перший стимул ($A1$), під час парної стимуляції від інтервалу між стимулами.

Короткотривала посттетанична потенціація

Короткотривала потенціація ВПСП у відповідь на високочастотну (тетаничну) стимуляцію в шарі 5 мПФК була описана в попередніх дослідках [377]. В наступній серії експериментів досліджували вплив неонатальних нападів на посттетаничну потенціацію ВПСП в синапсах між шарами 2/3 і 5 та

в межах шару 5 мПФК. Для реєстрації базових умов, величину стимулів зменшували таким чином, щоб амплітуда ВПСП дорівнювала приблизно 50 % максимальної відповіді та наносили їх кожні 10 с. Запис стабільної базової активності тривав 10-30 хв. Відомо, що під час затримки оперативної пам'яті нейрони мПФК отримують сигнали від сусідніх нейронів в діапазоні частот 20 – 60 Гц. Для імітації цих фізіологічних умов в наших дослідах для індукції короткотривалої потенціації ВПСП в шарі 5 мПФК використовували коротку тетаничну стимуляцію шарів 2/3 або 5 мПФК (15 прямокутних імпульсів, тривалістю 0,1 с і частотою 50 с⁻¹) [336].

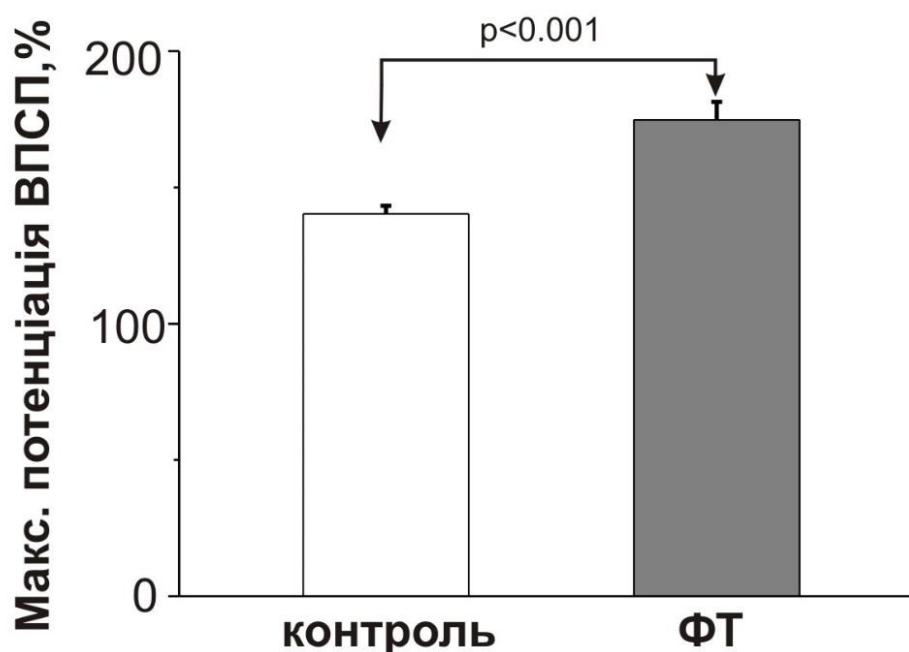


Рис. 5.10. Вплив неонатальних епілептичних нападів на максимальну потенціацію постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК у відповідь на короткотривалу тетаничну стимуляцію шарів 2/3 мПФК.

Високочастотна стимуляція викликала короткотривале (4-10 хв) збільшення амплітуд ВПСП в усіх досліджуваних групах. Максимальна

потенціація постсинаптичних відповідей в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ становила в контрольній $140,3 \pm 3,0 \%$, $n = 42$ та ФТ групах $174,7 \pm 6,6 \%$, $n = 32$ ($P < 0,001$, Рис 5.10).

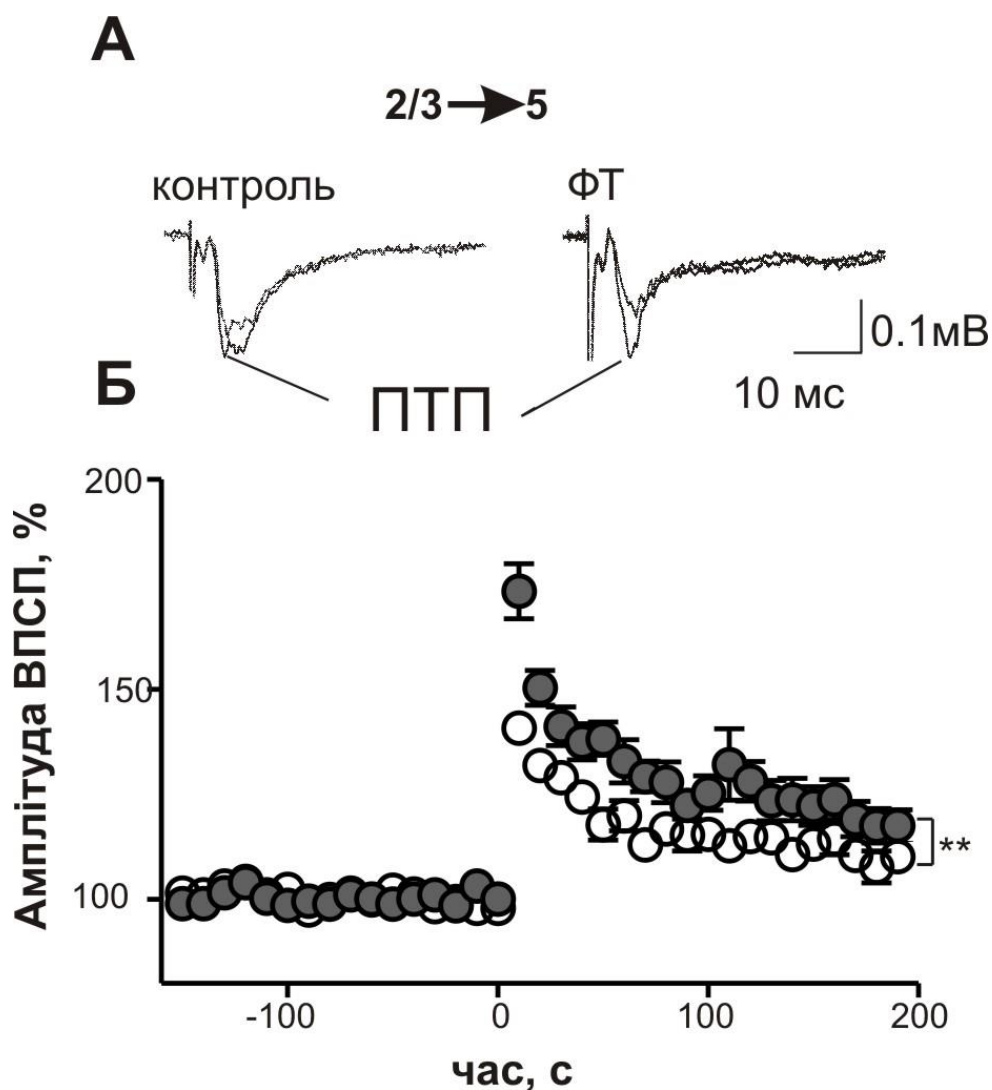


Рис. 5.11. Вплив неонатальних нападів на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ мПФК. (А) Записи ВПСР в шарі 5 мПФК до і після високочастотної стимуляції шарів 2/3 відповідної колонки в контрольній та ФТ групах. ПТП-посттетанична потенціація (Б) На графіку зображено нормовані амплітуди ВПСР до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (білі кружечки),

та в дослідній групі (сірі кружечки). Постсинаптична потенціація амплітуд ВПСП була значно збільшена в дослідній групі. $** P < 0,01$, ANOVA тест.

Статистичний аналіз даних показав, що рівень потенціації постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК на подразнення шарів 2/3 мПФК був істотно збільшений в ФТ-групі порівняно з контрольною ($P < 0,01$, **Рис. 5.11**).

В синапсах в межах шару 5 максимальна потенціація амплітуд ВПСП в контрольній групі становила $140,8 \pm 3,3 \%$ ($n = 31$). В ФТ- групі максимальна потенціація ВПСП була значно більше, ніж у контролі ($159,1 \pm 7,8 \%$, $n = 26$, $P < 0,01$, **Рис. 5.12**).

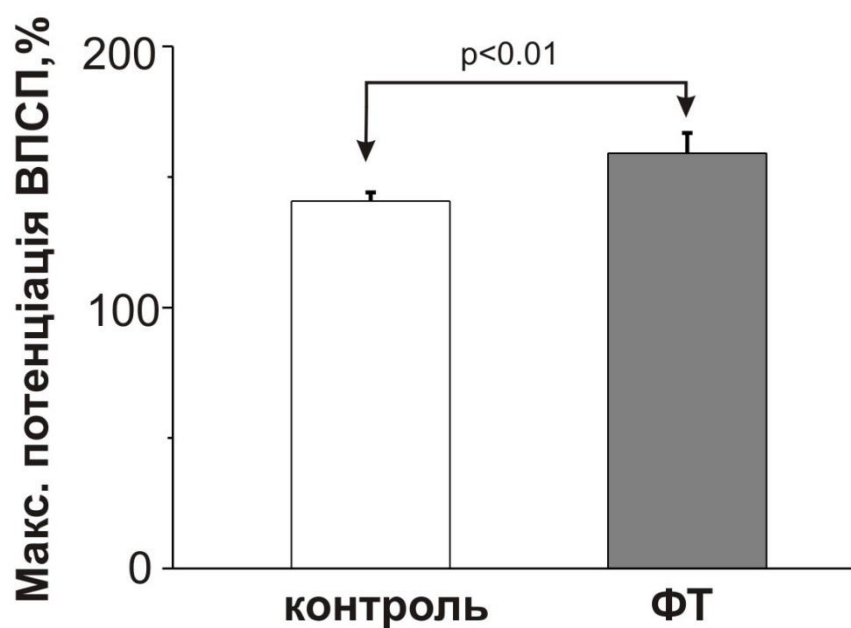


Рис. 5.12. Вплив неонатальних нападів на максимальну потенціацію постсинаптичних відповідей в синапсах між нейронами шару 5 мПФК.

Рівень посттетаничної потенціації амплітуди ВПСП в синапсах 5 → 5 мПФК був істотно збільшений в ФТ-групі порівняно з контрольною ($P < 0,01$, Рис. 5.13).

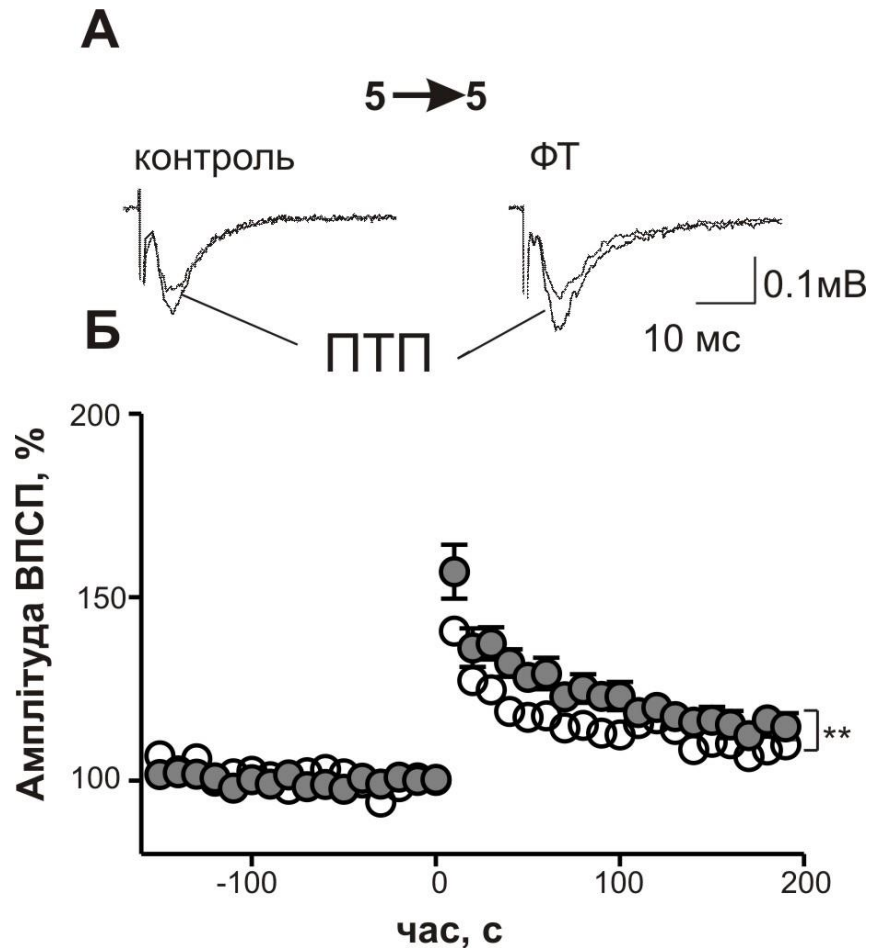


Рис. 5.13. Вплив неонатальних нападів на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах шару 5 мПФК. (А) Записи ВПСП в шарі 5 мПФК до і після високочастотної стимуляції в контрольній та ФТ-групах. ПТП- посттетанична потенціація (Б) На графіку зображено нормовані амплітуди ВПСП до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (білі кружечки), та в ФТ-групі (сірі кружечки). Посттетанична потенціація амплітуди ВПСП була значно збільшена в ФТ-групі. ** $P < 0,01$, ANOVA тест.

Збільшення частоти стимуляції під час реєстрації базової активності у 5 разів не впливала на амплітуду ВПСП (контроль: $179,1 \pm 15,2$ мкВ в синапсах $2/3 \rightarrow 5$, $n = 36$; $161,1 \pm 14,4$ мкВ в $5 \rightarrow 5$, $n = 32$, та ФТ- група: $176,7 \pm 12,7$ мкВ в $2/3 \rightarrow 5$, $n = 30$; $172,6 \pm 15,6$ мкВ в $5 \rightarrow 5$, $n = 23$, **Рис. 5.14**).

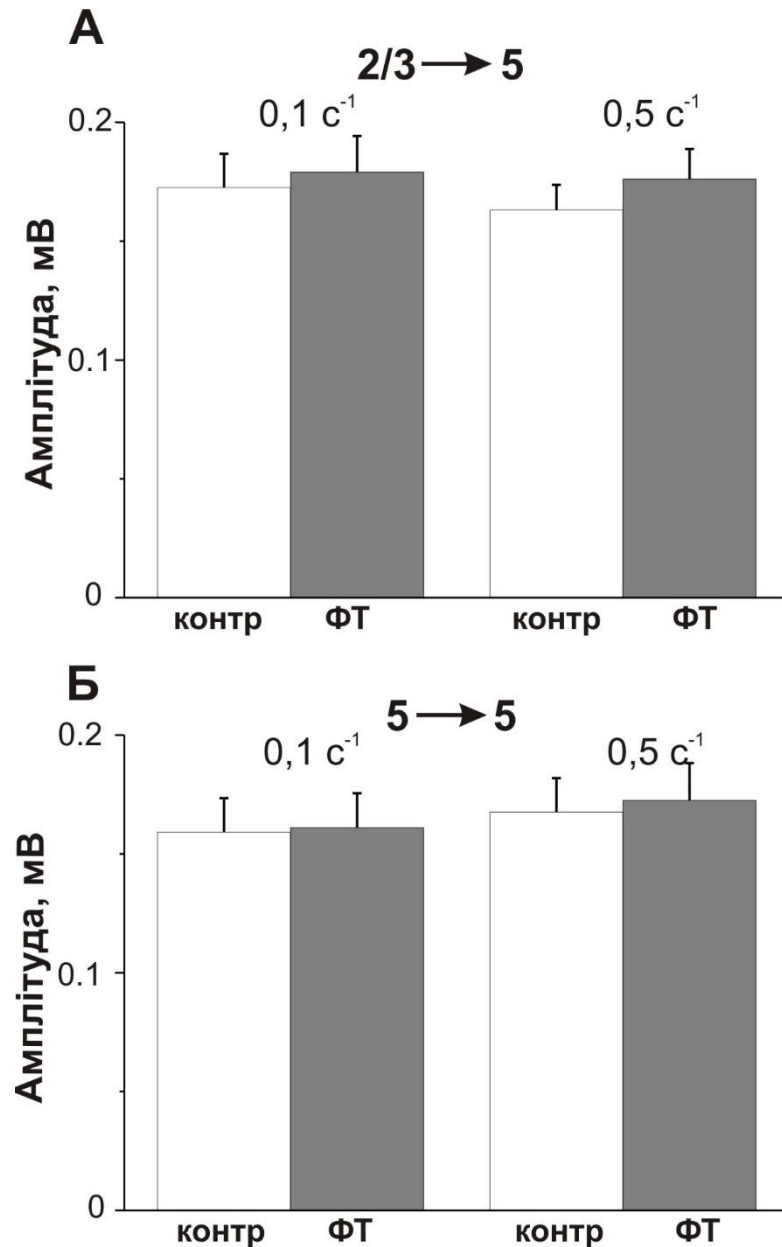


Рис. 5.14. Залежність амплітуди викликаних постсинаптичних потенціалів в досліджуваних групах від частоти базової стимуляції. Діаграми амплітуд ВПСП в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ (А) та в $5 \rightarrow 5$ (Б).

В умовах підвищеної базової активності ($0,5 \text{ c}^{-1}$) максимальна потенціація амплітуд ВПСП після високочастотної стимуляції була значно нижчою порівняно з такою в дослідженнях при частоті базової активності $0,1 \text{ c}^{-1}$ в обох досліджуваних синаптичних мережах, як в контрольній, так і ФТ-групі ($P < 0,01$ у всіх випадках). В контрольній групі вона становила $127,3 \pm 3,3 \%$, $n = 31$ в $2/3 \rightarrow 5$ синапсах та $127,6 \pm 4,5 \%$, $n = 22$ в $5 \rightarrow 5$ синапсах; в ФТ-групі максимальна потенціація амплітуди ВПСП становила $139,3 \pm 3,7 \%$, $n = 29$ в $2/3 \rightarrow 5$ синапсах та $136,7 \pm 4,7 \%$, $n = 23$ в $5 \rightarrow 5$ синапсах.

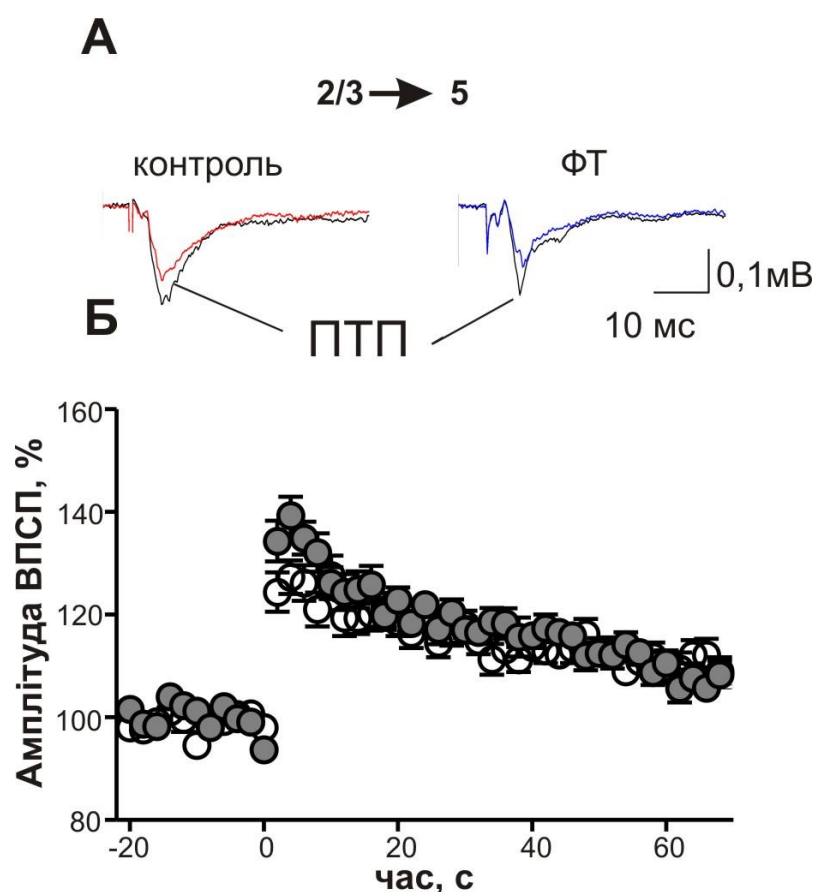


Рис. 5.15. Вплив неонатальних нападів на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ мПФК в умовах підвищеної базової активності. (А) Записи ВПСП в шарі 5 мПФК до і після додавання високочастотної стимуляції шарів 2/3 в контрольній та ФТ груп. ПТП- посттетанична потенціація (Б) На графіку зображено

нормовані амплітуди ВПСП до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (білі кружечки), та у ФТ- групі (сірі кружечки).

Рівень посттетанічної потенціації амплітуд ВПСП в умовах підвищеної базової активності ($0,5 \text{ c}^{-1}$) не розрізнявся між досліджуваними групами в синапсах між шарами 2/3 і 5 (в контроль $n = 31$, ФТ- група $n = 29$, $P > 0,05$) та в межах шару 5 мПФК (контроль $n = 22$, ФТ- група $n = 23$, $P > 0,05$, **Рис. 5.15-5.16**).

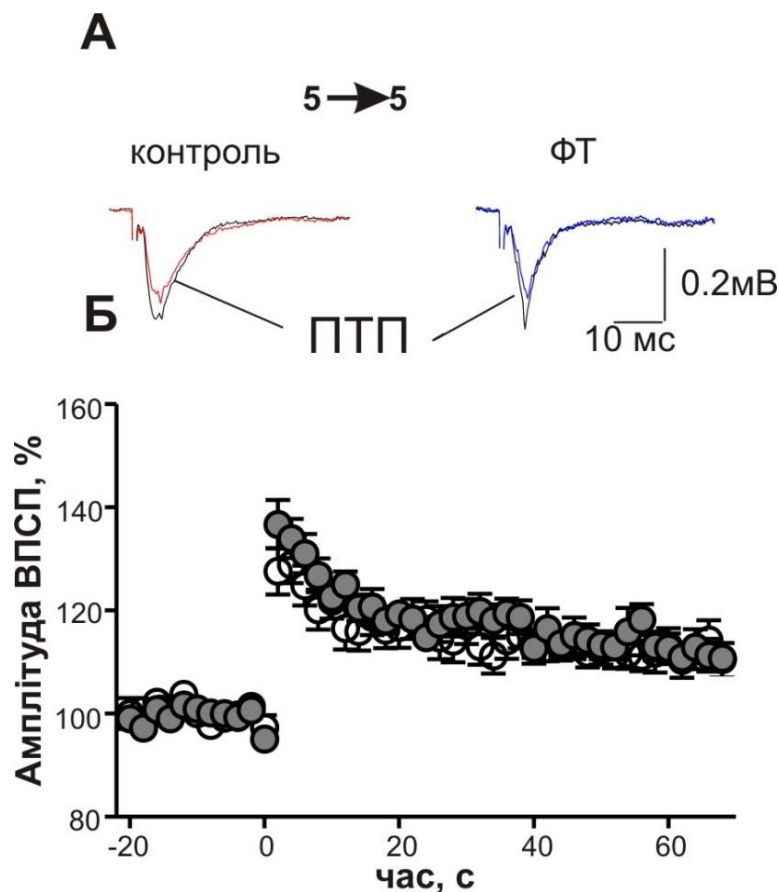


Рис. 5.16. Вплив неонатальних нападів на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах в межах шару 5 мПФК в умовах підвищеної базової активності. (А) Записи ВПСП в шарі 5 мПФК до і після додавання високочастотної стимуляції сусідніх нейронів в контрольній та ФТ групах. ПТП- посттетанична потенціація (Б) На графіку

зображено нормовані амплітуди ВПСП до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (білі кружечки), та у ФТ- групі (сірі кружечки). В умовах підвищеної базової активності ($0,5 \text{ c}^{-1}$) посттетанична потенціація амплітуд ВПСП була не змінена в ФТ- групі порівняно з контролем.

Синаптична пластичність впродовж високочастотної стимуляції

В наступній серії експериментів досліджували вплив неонатальних судом на синаптичну пластичність, що спостерігалася впродовж високочастотної стимуляції [378–380]. В обох досліджуваних групах, високочастотна стимуляція викликала спочатку збільшення, а потім зменшення амплітуди ВПСП.

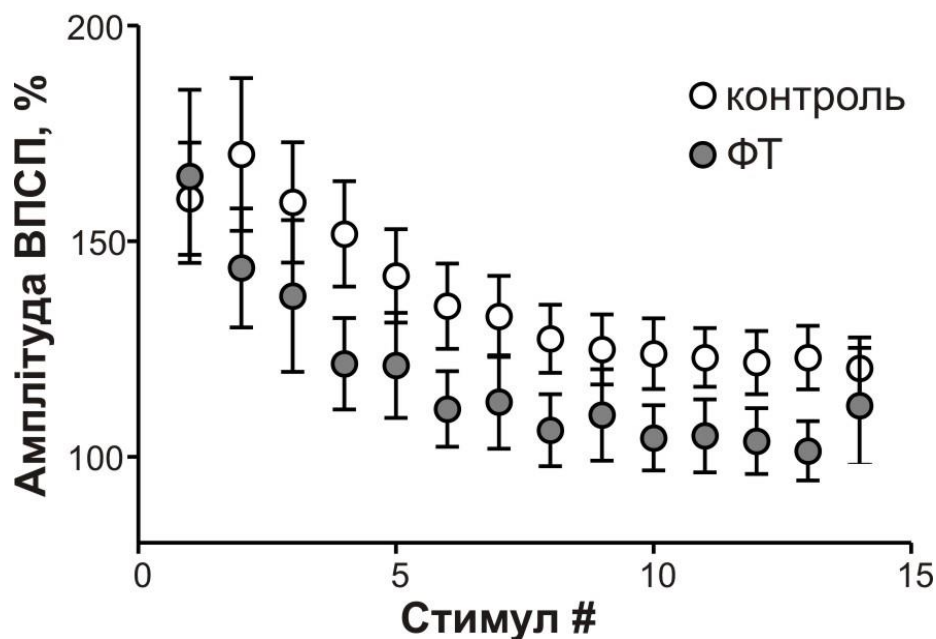


Рис. 5.17. Вплив неонатальних судом на синаптичну пластичність, що спостерігалася впродовж високочастотної стимуляції в синапсах між шарами 2/3 і 5 мПФК. Високочастотна стимуляція (частота 50 c^{-1}) шарів 2/3 мПФК викликала потенціацію амплітуд ВПСП в п'ятому шарі відповідної

колонки. На рисунку зображена залежність ВПСП нормованих за значенням амплітуд ВПСП викликаних у відповідь на перший стимул від порядкового числа стимулу. Білим кольором зображені середні амплітуди ВПСП в контрольних зрізах; сірим кольором позначені амплітуди ВПСП в зрізах ФТ-групи щурів (** $P < 0,01$ тест ANOVA).

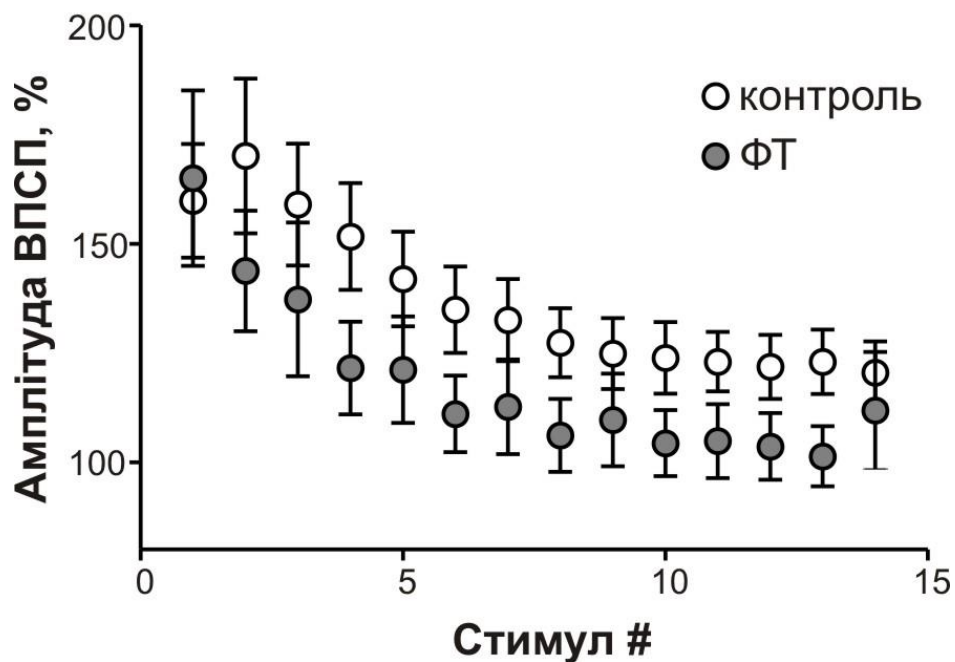


Рис. 5.18. Вплив неонатальних судом на синаптичну пластичність впродовж високочастотної стимуляції в синапсах шару 5 мПФК. Високочастотна стимуляція (частота 50 c^{-1}) шару 5 мПФК викликала потенціацію амплітуд ВПСП в сусідній ділянці п'ятого шару мПФК. На рисунку зображена залежність ВПСП нормованих за значенням амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на перший стимул, від порядкового числа стимулу. Білим кольором зображені середні амплітуди ВПСП в контрольних зрізах; сірим кольором позначені амплітуди ВПСП в зрізах ФТ-групи щурів

На **Рис. 5.17** показано, що в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ амплітуди ВПСП, що спостерігались у відповідь на перші чотири стимули високочастотної стимуляції не істотно розрізнялись між досліджуваними групами, але крива спаду значень ВПСП у зрізах ФТ-групи щурів дещо розрізнялася від кривої спаду ВПСП в контрольних зрізах: в ФТ-групі спостерігалось більш різке зниження амплітуд ВПСП порівняно з контролем. В синапсах $2/3 \rightarrow 5$ амплітуда ВПСП в кінці стимуляції становила в контрольній групі $115,2 \pm 7,9$ % ($n = 49$), а ФТ-групі $99,4 \pm 4,3$ % ($n = 29$). Аналіз змін амплітуди ВПСП впродовж високочастотної стимуляції показав статистично достовірну різницю між значеннями амплітуд ВПСП в контрольній та ФТ групах ($P < 0,01$).

В синапсах $5 \rightarrow 5$ амплітуда ВПСП в кінці стимуляції становила в контрольній групі $120,5 \pm 7,2$ % ($n = 38$) та ФТ-групі $111,8 \pm 13,4$ % ($n = 25$). Аналіз змін амплітуд ВПСП впродовж стимуляції показує, що потенціація амплітуд ВПСП впродовж стимуляції не розрізнялася між досліджуваними групами ($P = 0,4$, **Рис. 5.18**).

Отже наші дані вказують на те, що судомні напади під час раннього розвитку:

- 1) не впливали на найкоротшу форму синаптичної пластичності-пластичність викликану парною стимуляцією, в синапсах між шарами $2/3$ і 5 та в межах шару 5 мПФК;
- 2) викликали хронічні підвищення посттетанічної потенціації в обох досліджених синаптичних мережах;
- 3) мали селективний вплив на синаптичну пластичність впродовж тетанічної стимуляції в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ мПФК.

Хронічні зміни синаптичної пластичності в синапсах мПФК у тварин з історією повторюваних судомних нападів можуть бути клітинним

підґрунтям негативних наслідків судом на ПФК-залежні поведінкові реакції описані для ФТ-моделі неонатальних нападів в попередніх роботах [139, 381].

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ПОВТОРЮВАНОЇ ЕПІЛЕПТИФОРМНОЇ АКТИВНОСТІ, ЛОКАЛІЗОВАНОЇ В МЕЖАХ ПРЕФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ, НА СИНАПТИЧНУ ПЛАСТИЧНІСТЬ НЕЙРОНІВ МЕДІАЛЬНОЇ ЗОНИ ПРЕФРОНТАЛЬНОЇ КОРИ І ПОВЕДІНКОВІ ФЕНОМЕНИ.

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

6.1. Модель епілептиформної активності, локалізованої в межах префронтальної кори.

Для моделювання локальної повторюваної ЕФА в період раннього розвитку була розроблена модель ЕФА з використанням повторюваних мікроін'єкцій бікукуліну, антагоніста ГАМК_A-рецепторів, в мПФК молодих щурів. На **Рис 6.1** представлена схема експерименту.



Рис. 6.1. Схема експерименту.

Перед ініціацією ЕФА ювенільним щурам віком 17-19 діб після народження проводили операцію з імплантації системи ЕЕГ-електрод/канюля в медіальну зону правої префронтальної кори. В окремій серії експериментів проводили одночасну імплантацію системи ЕЕГ-електрод/канюля в праву ПФК та імплантацію ЕЕГ-електроду в ліву ПФК або ССК. Докладно процедура імплантації описана в **Розділі 2.4.1**. Починаючи з 2-4 дня після операції щурам «бікукулінової (БК)»-групи вводили інтрацеребральні ін'єкції бікукуліну (0,5 мкл, розчин 200 мкМ) 3-4 рази на добу (загалом 19 ін'єкцій). Тваринам контрольної групи вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

В першій серії експериментів було досліджено, вплив інтрацеребральних ін'єкцій БК на вірогідність появи ЕФА та судом. Відразу ж після кожної ін'єкції БК в мПФК, локальні (на відстані не більше ніж 100-200 мкм від місця ін'єкції) ЕЕГ реєстрували протягом 30 хв. Відеомоніторинг тварин проводили у режимі реального часу з метою відстеження судомних нападів. В контрольній групі тварин, що отримували ін'єкції фізіологічного розчину, не було виявлено судомних нападів та електрографічної ЕФА (**Рис. 6.2А**).

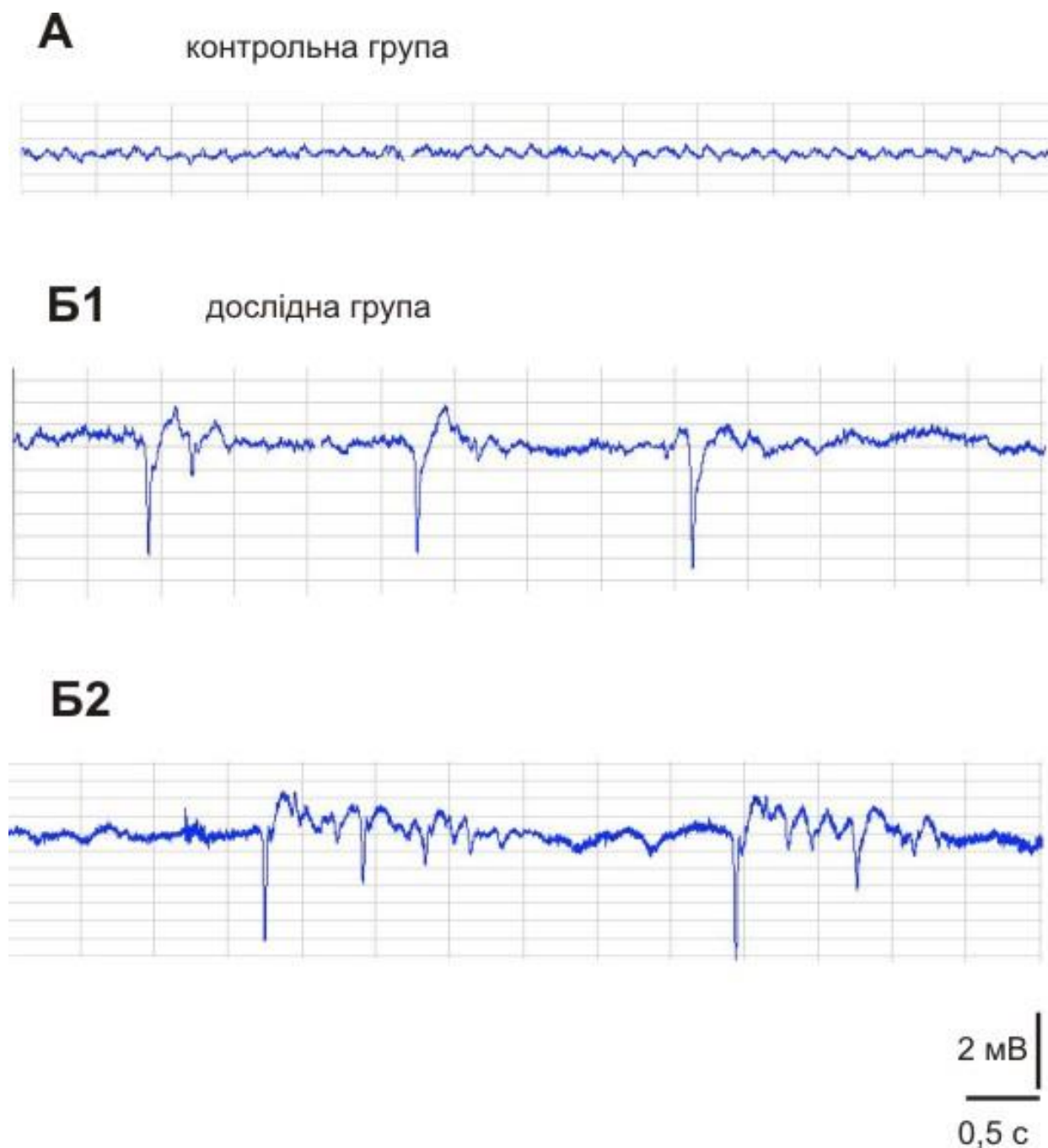


Рис. 6.2. Епілептиформна активність в ПФК щура, викликана локальною інтрацеребральною ін'єкцією бікукуліну. (А) Приклад позаклітинного відведення польових потенціалів в ПФК контрольної групи щурів. (Б1,2) Приклади позаклітинного відведення інтеріктальної активності, викликаної ін'єкцією бікукуліну, в ПФК.

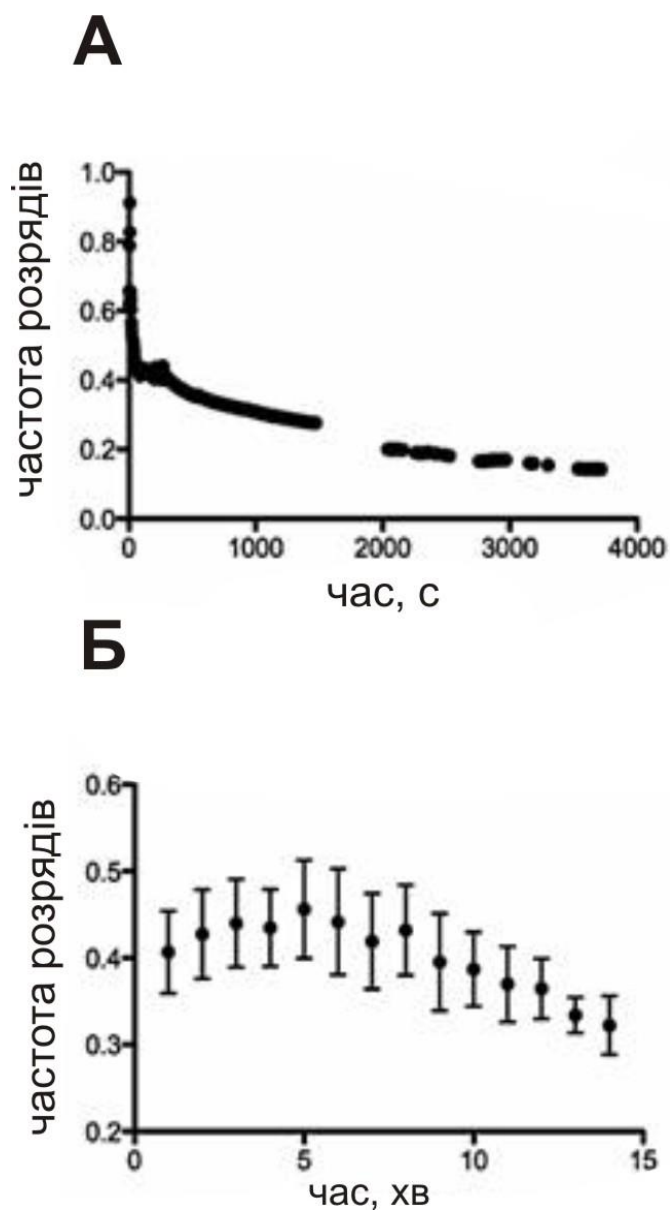


Рис. 6.3. Залежність частоти поодиноких інтеріктальних розрядів, відведених в мПФК щурів, відносно часу після ін'єкції бікукуліну. (А) Найвища частота інтеріктальних розрядів спостерігалася у перші секунди після ін'єкції. (Б) Усереднені записи ЕЕГ демонструють кінетику змін частоти поодиноких інтеріктальних розрядів відносно часу після ін'єкції бікукуліну.

В БК-групі щурів також не було виявлено судомних нападів, але відразу після ін'єкції на ЕЕГ спостерігалася інтеріктальна активність (**Рис. 6.2Б1**). Інтеріктальні розряди мали вигляд поодиноких (**Рис. 6.2Б1**) або множинних спайків (**Рис. 6.2Б2**). Аналіз частоти поодиноких інтеріктальних розрядів показав найвищу частоту розрядів в перші 15-30 с після ін'єкцій бікукуліну із подальшим уповільненим спадом частоти розрядів (**Рис. 6.3**).

Цікаво, що ЕФА зникла протягом 20-25 хвилин після ін'єкції бікукуліну у тварин в період неспання, але відновлювалася під час сну із частотою приблизно 0,2 розряди на секунду (**Рис. 6.4**). В окремій серії дослідів реєстрації ЕЕГ проводили протягом 72-х год після останньої ін'єкції бікукуліну. Довготривалі реєстрації ЕЕГ показали, що під час сну ЕФА можна було спостерігати в період до 24 год після ін'єкції бікукуліну (**Рис. 6.4**). Виявилося також, що у трьох тварин БК-групи ЕФА спостерігалися під час повільного сну.

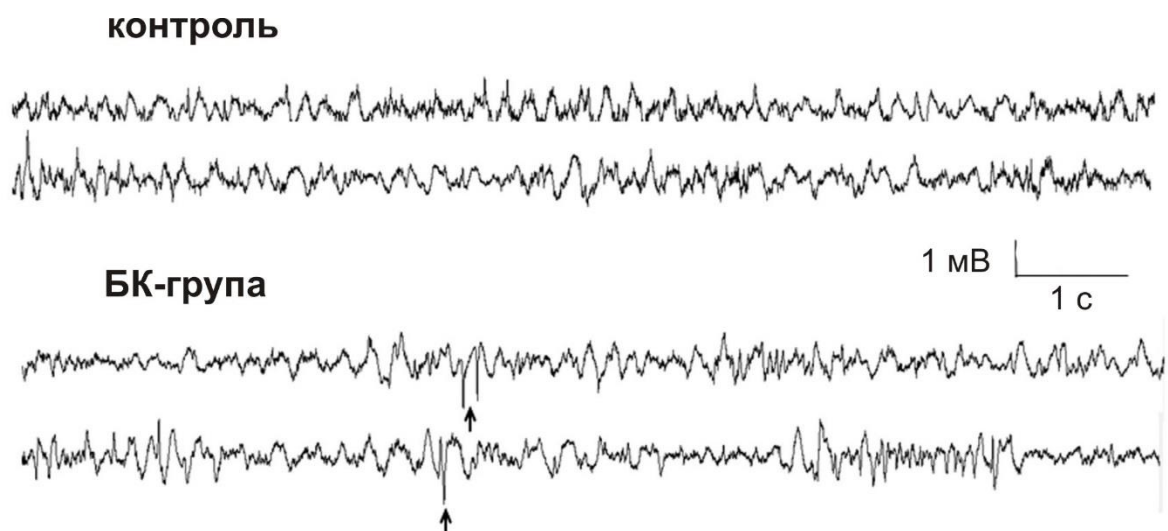


Рис. 6.4. Інтеріктальна активність в префронтальній корі щурів під час повільного сну. Стрілками позначені поодинокі інтеріктальні розряди, які спостерігалися протягом 24 год після ін'єкції бікукуліну.

Аналіз тридцяти хвилинних сегментів ЕЕГ показав, що тривалість фази повільного сну не розрізнялася між досліджуваними групами і становила в контрольній групі $5,1 \pm 2,6$ хв та в БК-групі щурів $3,3 \pm 2,1$ хв ($P = 0,6$). ЕФА не спостерігалася на ЕЕГ реєстраціях через два тижня після останньої ін'єкції бікукуліну.

В окремій серії експериментів проводили одночасну реєстрацію фокальних потенціалів в ПФК обох півкуль головного мозку (**Рис 6.5**), а також реєстрації потенціалів в ССК протягом перших 24 год після ін'єкції БК.

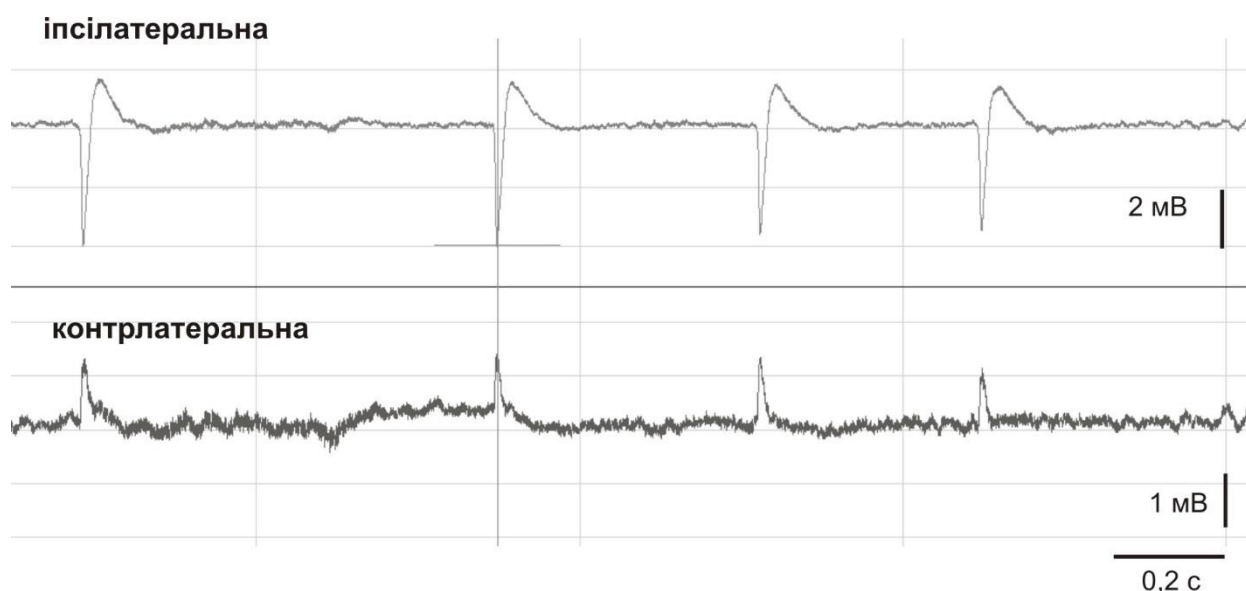


Рис. 6.5. *Поширення епілептиформної активності у контрлатеральну, відносно до місця ін'єкцій бікукуліну, півкулю. Приклади одночасної реєстрації потенціалів в ПФК обох півкуль.*

Поширення ЕФА у контрлатеральну півкулю реєстрували в експериментах, де унілатеральні ін'єкції БК проводили протягом білатеральної реєстрації потенціалів. Ми не спостерігали ЕФА на записах ЕЕГ, відведених від ССК, що свідчить про суто локальний характер ефекту ін'єкцій БК.

Хоча в переважній більшості експериментів у відповідь на локальну інтрацеребральну ін'єкцію БК спостерігалася ЕФА, у двох з тринадцяти тварин була зареєстрована іктальна активність, яка тривала менше ніж 15 с. Іктальна активність не супроводжувалася із змінами в поведінці тварин. Приклад іктальної активності, викликаной локальною ін'єкцією БК і зареєстрованої в мПФК щурів, показано на **Рис. 6.6**. Наявність або відсутність іктальної активності у щурів БК-групи не впливала на результати електрофізіологічних та поведінкових тестів.

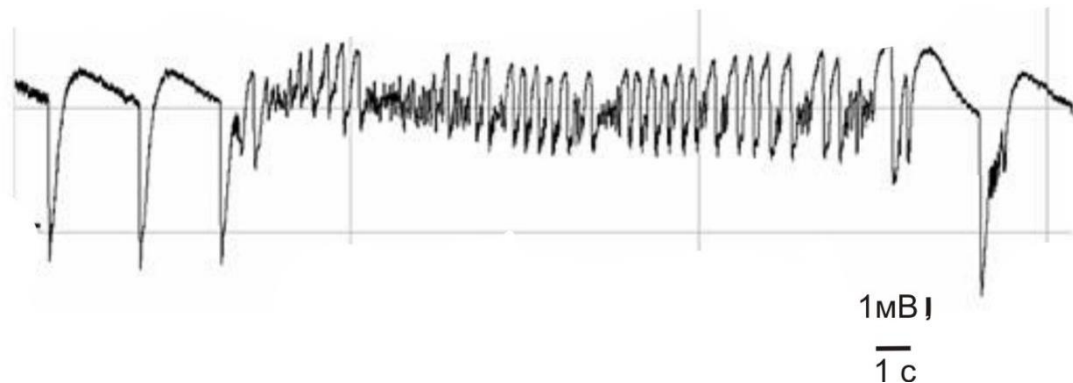


Рис. 6.6. Іктальна активність в префронтальній корі щурів, викликана локальною інтрацеребральною ін'єкцією бікукуліну

6.2. Викликані постсинаптичні потенціали та синаптична пластичність

В попередніх дослідах з використанням ФТ моделі судомних нападів було показано, що неонатальні судоми не впливають на амплітуду ВПСП в п'ятому шарі мПФК щурів. В наступній серії експериментів з використанням БК моделі досліджували вплив безсудомної ЕФА на амплітуду ВПСП в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ та в $5 \rightarrow 5$ мПФК. Дослідження проводили на щурах контрольної та БК груп віком 45-60 діб після народження.

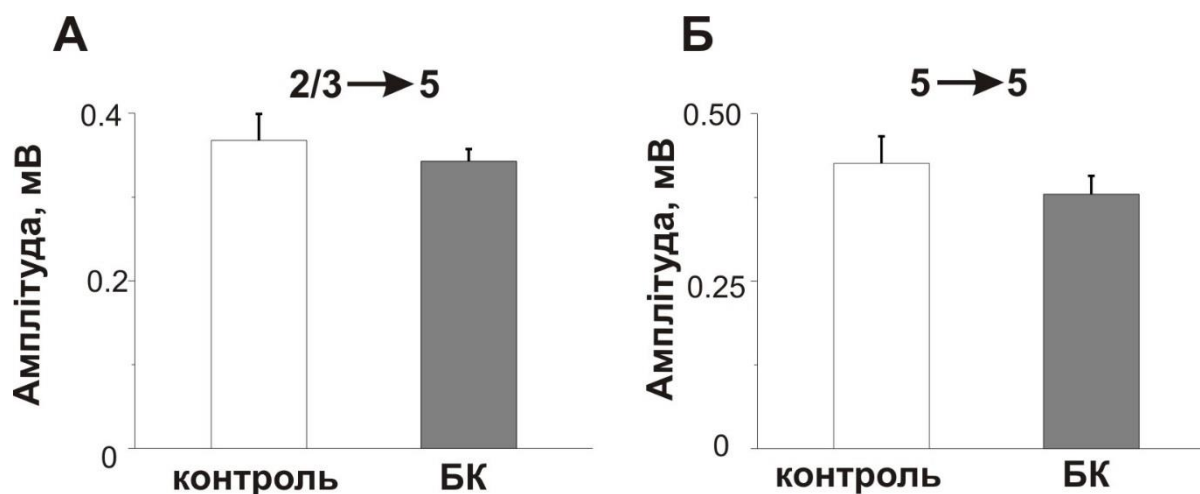


Рис. 6.7. Вплив повторюваної епілептиформної активності, викликаной локальною ін'єкцією бікукуліну в мПФК, на амплітуду викликаних постсинаптичних потенціалів в п'ятому шарі мПФК щурів. Гістограми амплітуд ВПСП в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ (А) та $5 \rightarrow 5$ (Б) мПФК.

Стимуляція шарів 2/3 або 5 мПФК викликала ВПСП в шарі 5 на всіх зрізах контрольної та БК груп щурів. Амплітуда ВПСП становила в контрольній групі $367,7 \pm 31,5$ мкВ ($n = 24$) в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ та $425,9 \pm 40,3$ мкВ ($n = 23$) в синапсах $5 \rightarrow 5$. В БК- групі щурів амплітуда ВПСП становила $342,6 \pm 14,7$ мкВ ($n = 25$) в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ та $379,6 \pm 27,4$ мкВ [$n = 22$] в синапсах $5 \rightarrow 5$. Аналіз даних показав, що амплітуда ВПСП не розрізнялася між досліджуваними групами ($P = 0,74$ в $2/3 \rightarrow 5$ синапсах; $P = 0,71$ в синапсах $5 \rightarrow 5$, **Рис. 6.7**).

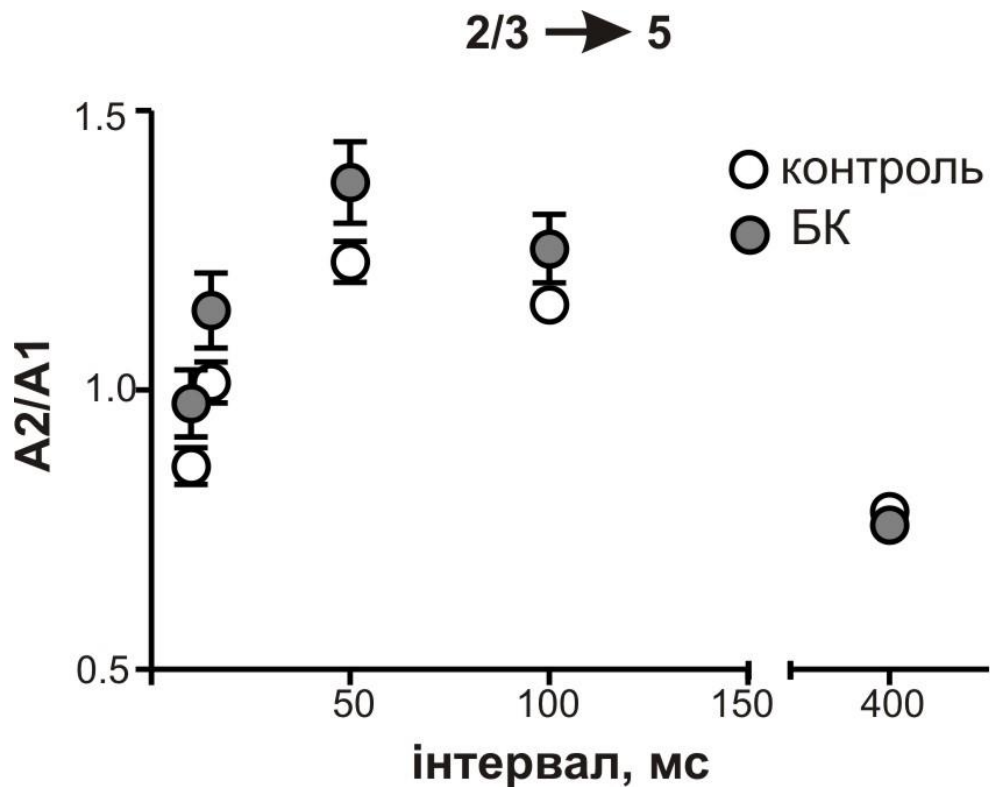


Рис. 6.8. Вплив безсудомної ЕФА, спровокованої локальною ін'єкцією бікукуліну в мПФК, на синаптичну пластичність, викликану парною стимуляцією синапсів 2/3 → 5 мПФК. Залежність значення співвідношення амплітуд ПСП, викликаних у відповідь на другий стимул ($A2$), до амплітуд ПСП, викликаних у відповідь на перший стимул ($A1$), під час парної стимуляції від інтервалу між стимулами.

В наступній серії експериментів досліджували вплив локальної ЕФА в період раннього розвитку на різні форми синаптичної пластичності в синапсах між шарами 2/3 та 5 та в межах шару мПФК. На **Рис. 6.8-6.9** представлені сумарні графіки дослідів впливу ЕФА, спровокованої локальною ін'єкцією бікукуліну в мПФК, на синаптичну пластичність викликану парною стимуляцією.

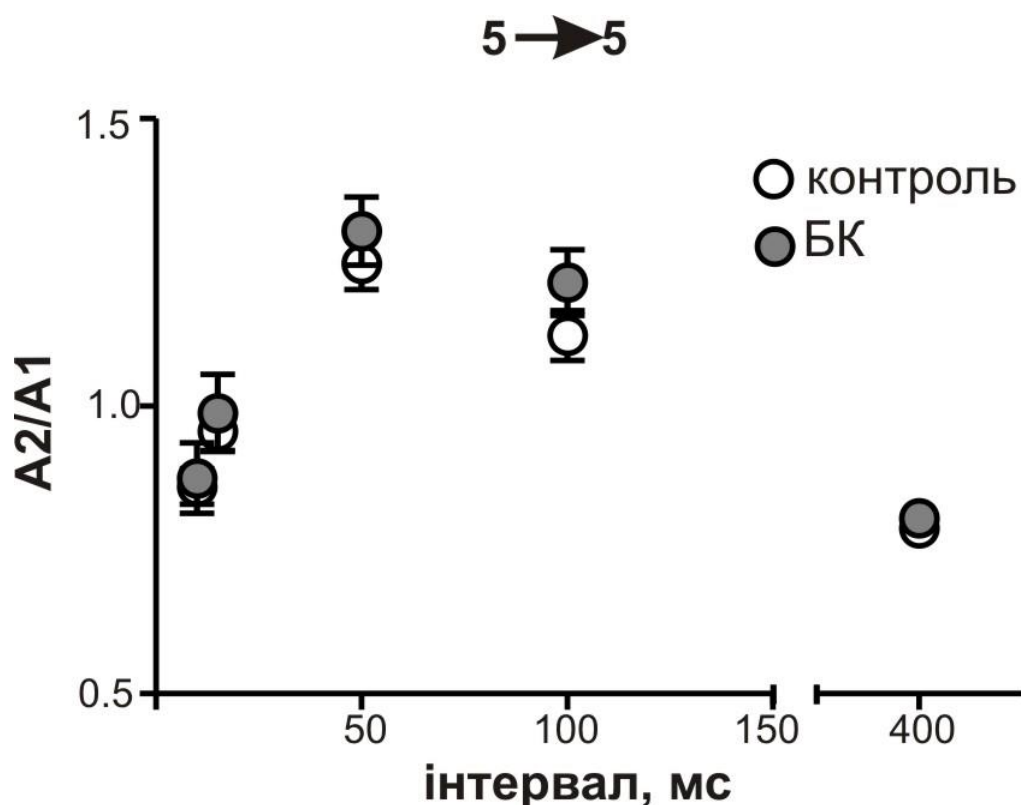


Рис. 6.9. Вплив ЕФА, спровокованої локальною ін'єкцією бікукуліну в мПФК в період раннього розвитку, на синаптичну пластичність викликану парною стимуляцією синапсів $5 \rightarrow 5$ мПФК. Залежність значення співвідношення амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на другий стимул (A_2), до амплітуд ВПСП, викликаних у відповідь на перший стимул (A_1), під час парної стимуляції від інтервала між стимулами.

Аналіз даних показав, що синаптична пластичність, викликана парною стимуляцією, не розрізнялася між досліджуваними групами в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ (Рис. 6.8, контрольна група $n = 22$, БК- група $n = 22$, $P = 0,1$, ANOVA тест) та $5 \rightarrow 5$ мПФК (Рис. 6.9, контрольна група $n = 23$, БК- група $n = 23$, $P = 0,4$, ANOVA тест).

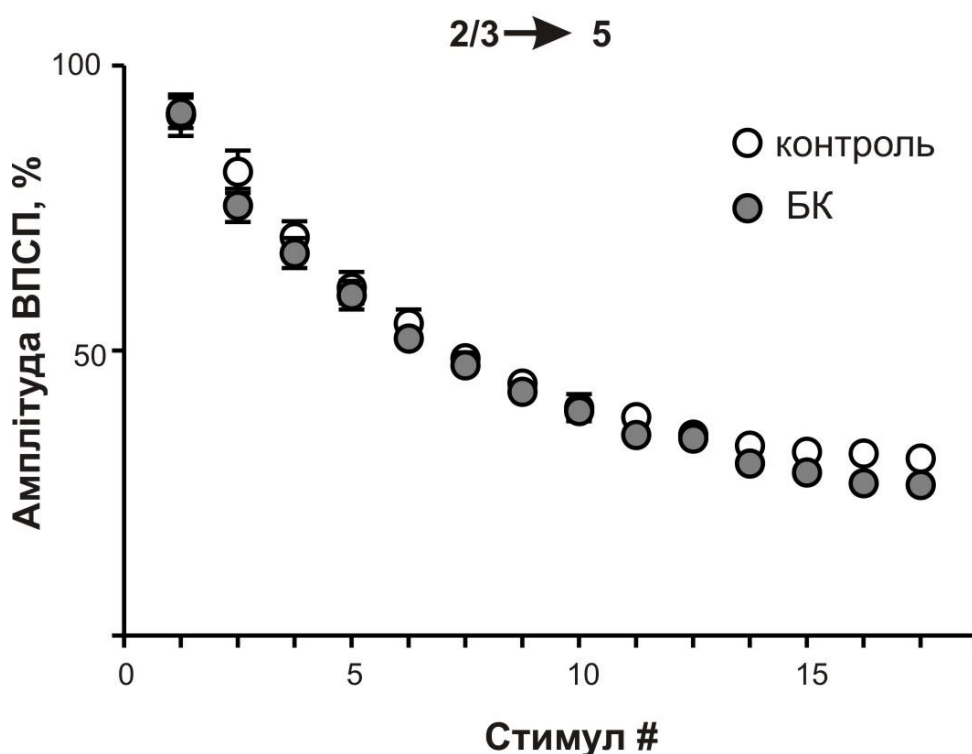


Рис. 6.10. Вплив епілептиформної активності, спровокованої локальною ін'єкцією бікукуліну в мПФК, на синаптичну пластичність впродовж високочастотної стимуляції в синапсах між шарами 2/3 та 5 мПФК. На рисунку зображена залежність амплітуд ВПСР, нормованих за значенням амплітуди ВПСР, викликаного у відповідь на перший стимул, від порядкового числа стимулу. Білим кольором позначені середні амплітуди ВПСР в контрольних зрізах; сірим кольором - амплітуди ВПСР в зрізах БК-групи щурів.

Синаптична пластичність ВПСР впродовж високочастотної стимуляції (15 стимулів частотою 50 c^{-1}) суттєво не розрізнялася між досліджуваними групами в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ (контрольна група $n = 24$, БК-група $n = 25$, $P = 0,3$, ANOVA тест, **Рис. 6.10**) та в синапсах $5 \rightarrow 5$ мПФК (контрольна група $n = 23$, БК-група $n = 22$, $P = 0,4$, ANOVA тест, **Рис. 6.11**).

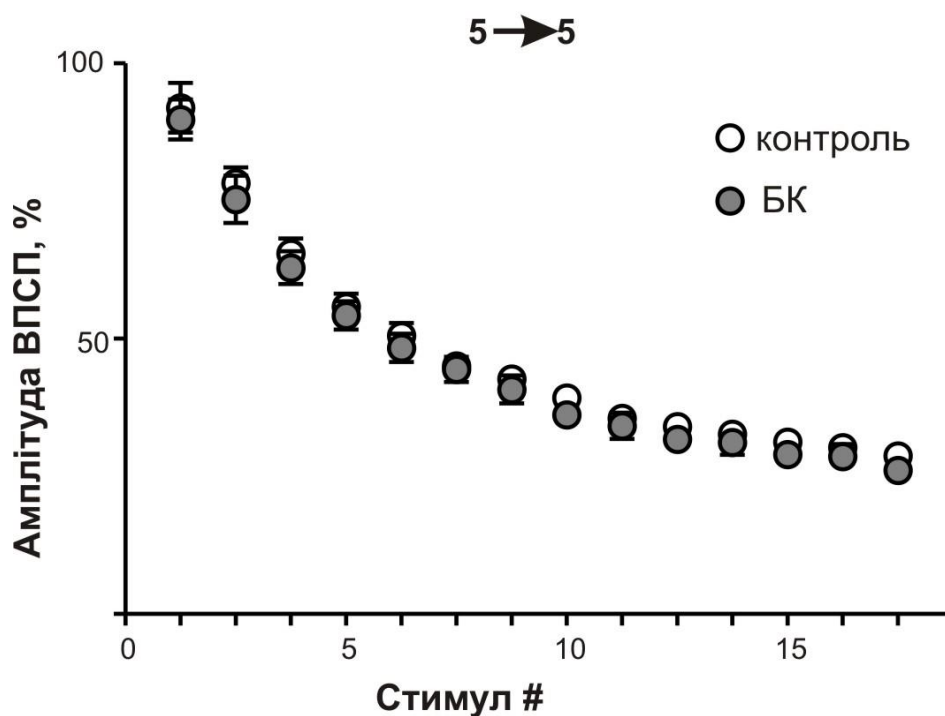


Рис. 6.11. Вплив неонатальних нападів на синаптичну пластичність впродовж високочастотної стимуляції в синапсах в межах шару 5 мПФК. На рисунку зображена залежність амплітуд ВПСП, нормованих за значенням амплітуди ВПСП, викликаного у відповідь на перший стимул, від порядкового числа стимулу. Білим кольором позначені середні амплітуди ВПСП в контрольних зрізах; сірим кольором - амплітуди ВПСП в зрізах БК-групи щурів.

Для дослідження впливу безсудомної ЕФА в період раннього розвитку на посттетаничну потенціацію використовували протокол короткої високочастотної стимуляції шарів 2/3 або 5 (15 прямокутних імпульсів, тривалістю 0,1 с і частотою 50 с⁻¹). ВПСП відводили від шару 5 мПФК, як і в дослідях з використанням ФТ-моделі неонатальних судомних епілептичних нападів.

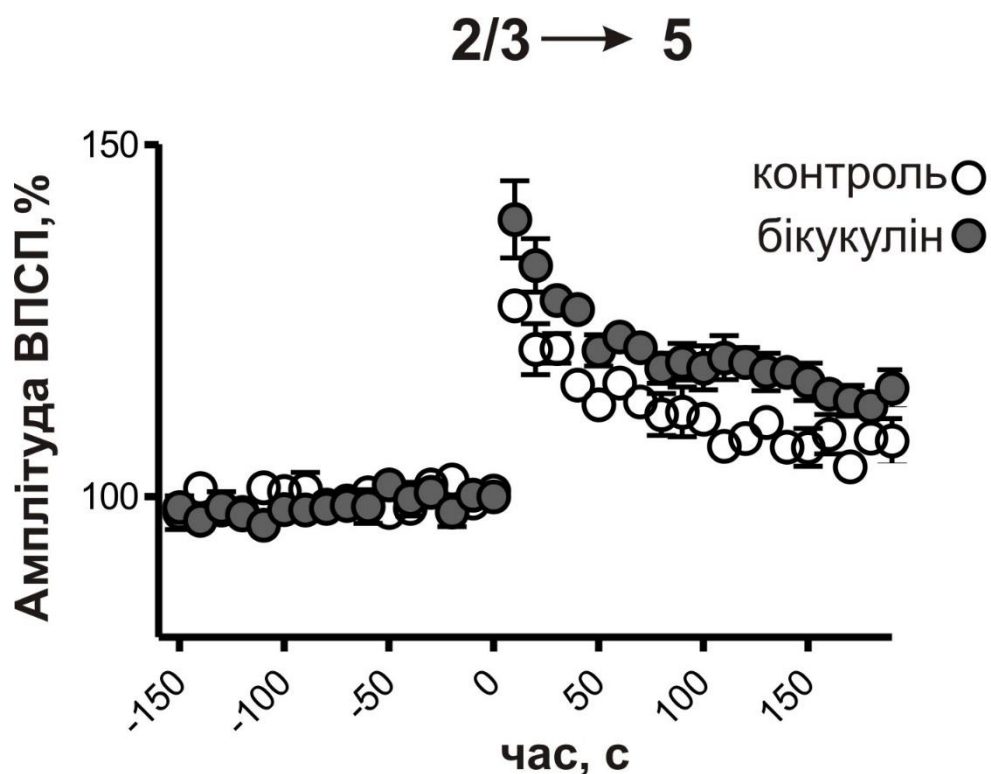


Рис. 6.12. Вплив безсудомної епілептиформної активності на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах 2/3 → 5 мПФК. На графіку зображено нормовані амплітуди ВПСП до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (білі кружечки), та в БК- групі (сірі кружечки). Посттетанічна потенціація амплітуд ВПСП була значно збільшена в БК- групі.

На **Рис. 6.12-14** представлені сумарні графіки дослідів впливу безсудомної ЕФА на синаптичну пластичність в синапсах між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК викликану високочастотною стимуляцією.

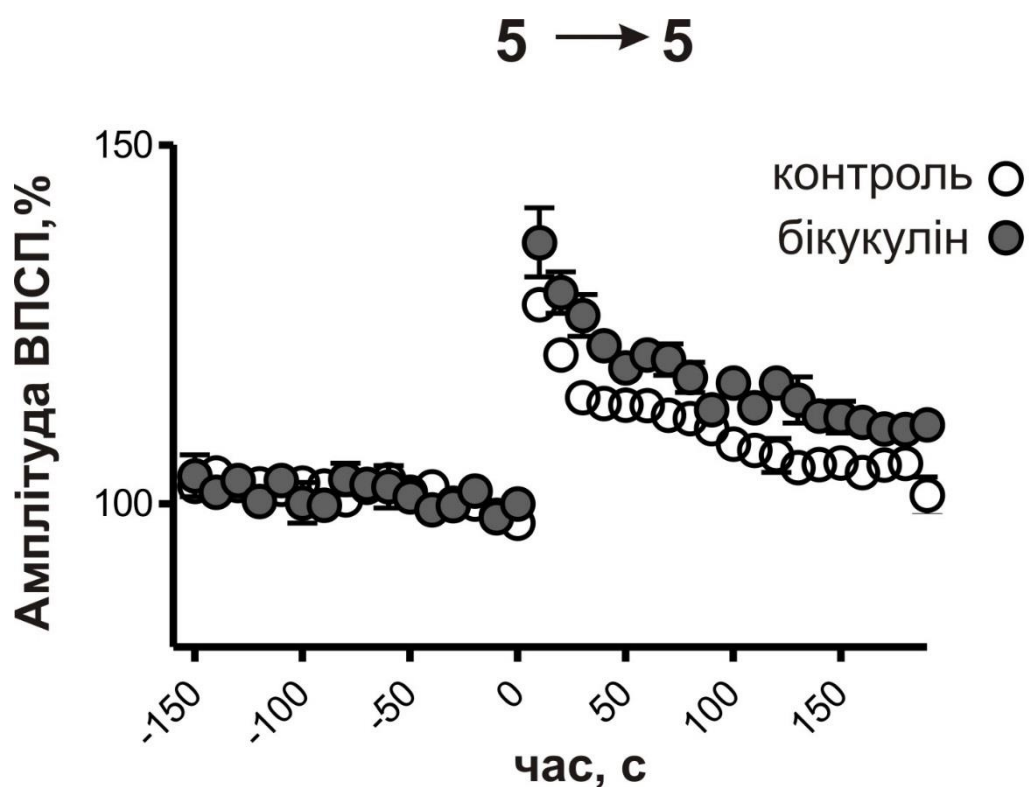


Рис. 6.13. Вплив безсудомної епілептиформної активності на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах 5 → 5 мПФК. На графіку зображено нормовані амплітуди ВПСП до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (білі кружечки) та в БК-групі (сірі кружечки). Посттетанічна потенціація амплітуд ВПСП була значно збільшена в БК-групі.

В синапсах 2/3 → 5 максимальна потенціація синаптичних відповідей становила в контрольній групі $127,1 \pm 1,8 \%$ ($n = 24$) та БК-групі $139,4 \pm 5,5 \%$ ($n = 25$) від вимірювань під час реєстрації базової лінії (**Рис. 6.14**). Рівень потенціації постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК на подразнення шарів 2/3 мПФК був істотно збільшений в БК-групі порівняно з контрольною ($P < 0,001$, ANOVA тест, **Рис. 6.12**). В синапсах 5 → 5 максимальна потенціація амплітуди ВПСП в контрольній групі становила $127,7 \pm 0,4 \%$ ($n = 23$).

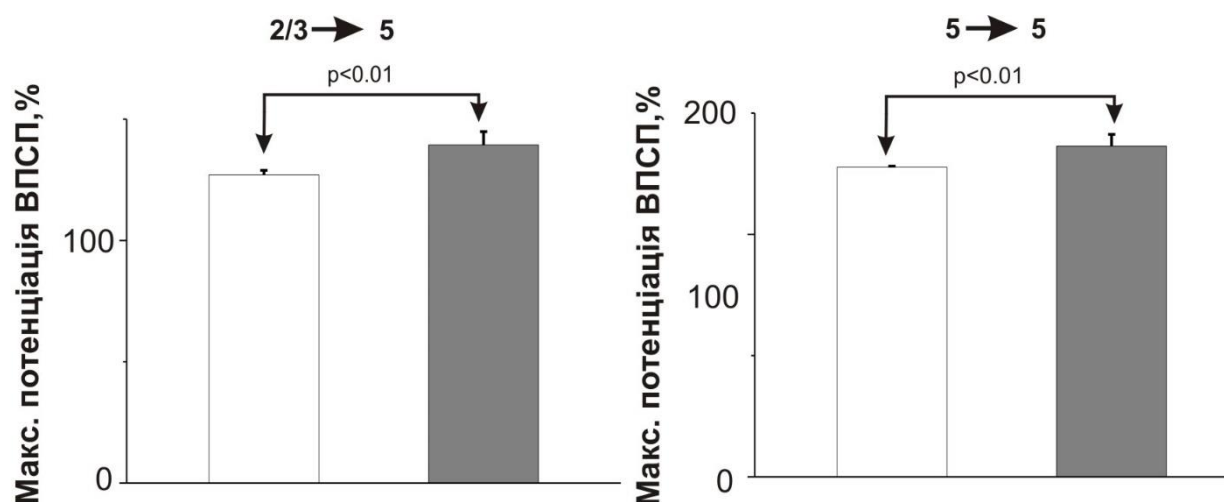


Рис. 6.14. Вплив локальної епілептиформної активності під час раннього розвитку, викликану ін'єкцією бікукуліну в мПФК, на максимальну потенціацію постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК у відповідь на короткотривалу тетаничну стимуляцію шарів 2/3 або 5. Білим кольором позначено дані отримані на контрольних зрізах; сірим кольором - дані отримані в зрізах БК- групи щурів.

В БК-групі максимальна потенціація постсинаптичних відповідей в шарі 5 мПФК на подразнення сусідніх нейронів шару 5 мПФК дорівнювала $136,4 \pm 4,8\%$ ($n = 22$), $P < 0,01$, **Рис. 6.14**). Рівень посттетанічної потенціації в синапсах $5 \rightarrow 5$ мПФК був істотно збільшений в БК-групі порівняно з контрольною ($P < 0,001$, ANOVA тест, **Рис. 6.13**). Збільшення посттетанічної потенціації синаптичних відповідей в БК-групі було значним в мПФК обох півкуль, як іпсі-, так і контрлатерально до ін'єкції бікукуліну (**Рис. 6.15**).

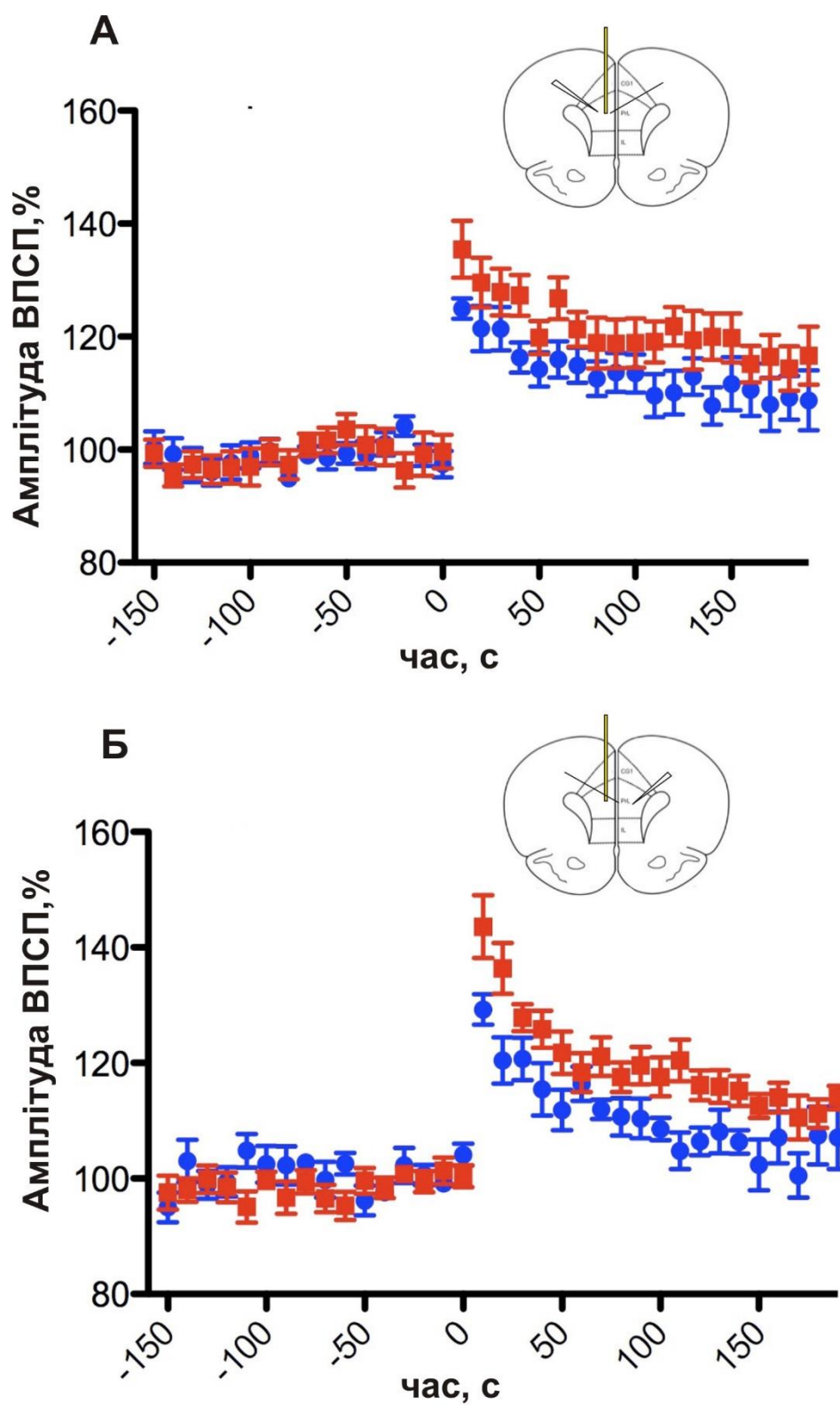


Рис. 6.15. Вплив епілептиформної активності на посттетаничну потенціацію викликаних постсинаптичних потенціалів в синапсах 2/3→ 5

мПФК, відведених іпсі- (А) або контрлатерально (Б) до ін'єкції бікукуліну. На графіку зображено нормовані амплітуди ВПСП до і після тетанічної стимуляції за контрольних умов (кружечки), та в БК- групі (квадрати). Над графіками схематично зображено розташування ін'єкційної канюлі (жовтий), відвідного (білий трикутник) і стимуляційного (чорна лінія) електродів.

Отже, отримані результати дослідження показують, що повторювана ЕФА, викликана в період раннього розвитку інтрацеребральними ін'єкціями бікукуліну в ПФК:

- 1) не впливає на амплітуду ВПСП в синапсах між нейронами шарів 2/3 і 5 та в межах шару 5 мПФК;
- 2) не призводить до змін синаптичної пластичності, викликані парною стимуляцією, та пластичності синаптичних відповідей впродовж тетанічної стимуляції в цих синапсах;
- 3) призводять до хронічного підвищення посттетанічної потенціації амплітуди ВПСП в мПФК обох півкуль, як іпсі-, так і контрлатерально до місця ін'єкцій бікукуліну.

6.3. Архітектоніка медіальної зони префронтальної кори

На **Рис. 6.16** представлені сумарні графіки дослідів впливу безсудомної ЕФА на архітектоніку мПФК. Аналіз архітектоніки різних шарів мПФК контрольних тварин та тварин з історією БК-індукованої ЕФА в період раннього розвитку не виявив істотних змін площі окремих шарів мПФК і дослідженої ділянки мПФК в цілому.

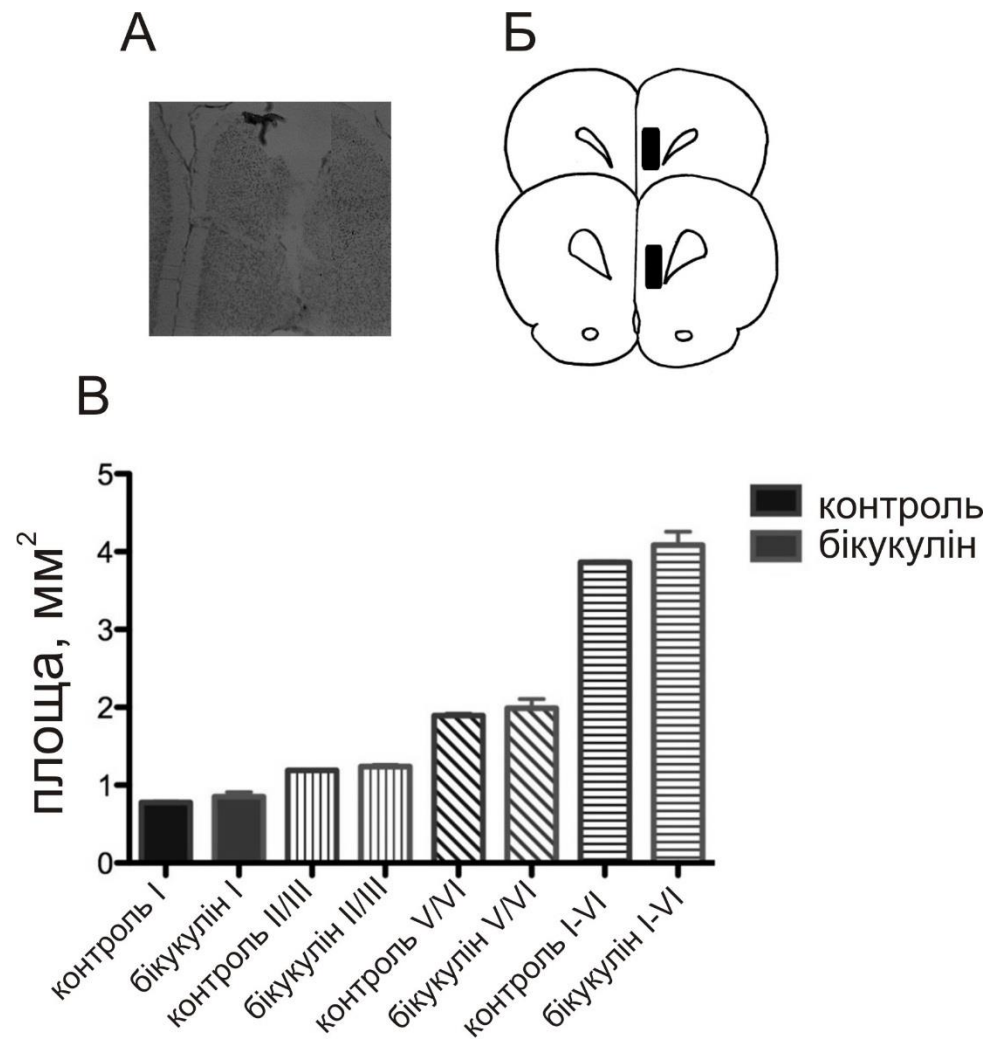


Рис. 6.16. Епілептиформна активність під час раннього розвитку, викликана локальною інтрацеребральною ін'єкцією бікукуліну, не впливає на архітектуру мПФК. (А) На забарвленому тіоніном фрагменті зрізу мозку, отриманому від щура (65 дпн) БК-групи показано місце розташування системи ЕЕГ-електрод/канюля (Б) На схемі позначено місце ін'єкції бікукуліну (В) Сумарні діаграми площі окремих ділянок мПФК, а також дослідженої зони мПФК в цілому в контрольній та БК групах.

6.4. Поведінкові феномени.

У деяких дитячих епілептичних синдромах, таких як генерація безперервних спайк-хвиль під час повільного сну або синдром Ландау-Клеффнера, частота епілептичних нападів є відносно низькою. Тим не менш, у пацієнтів з цими синдромами спостерігаються епілептиформні зміни ЕЕГ у вигляді частих мультифокальних спайков і комплексів спайк-хвиля. Прояви когнітивного та поведінкового дефіциту у дітей з безсудомними епілептичними синдромами досить подібні до таких у дітей з частими судомними нападами [382–384]. Вивчення механізмів негативного впливу безсудомної ЕФА на функціонування головного мозку було досить обмеженим за відсутністю адекватної експериментальної моделі, яка могла би відтворити описані електрографічні та поведінкові розлади. Як було показано в попередньому розділі розроблена нами БК-модель є моделлю безсудомної ЕФА, відмінною рисою якої є часті інтеріктальні розряди при низькому рівні появи електрографічних епілептичних нападів. Хронічні зміни синаптичної пластичності у мПФК щурів з історією повторюваної локальної ЕФА в період раннього розвитку є подібними до змін синаптичної пластичності в цій ділянці мозку, які спостерігалися в експериментах з використанням ФТ-моделі і можуть служити підґрунтям для дослідження можливих змін поведінкових реакцій щурів БК-групи. Для тестування цієї гіпотези в наступній серії експериментів ми використовували низку поведінкових тестів, які здатні надати інформацію по цілому ряду ПФК-залежних і незалежних форм поведінки.

6.4.1. Поведінкова гнучкість

Поведінкова гнучкість є оптимальним поєднанням індивідуальних ефективних патернів поведінки та різноманітних (оригінальних) способів взаємодії з зовнішніми стимулами.

Для дослідження поведінкової гнучкості тварин БК- та контрольної груп піддавали поведінковому тесту, протокол якого описаний в **Розділі 2.6.2.**

Загальна кількість винагород та загальна кількість натискань на важелі вказують на загальний рівень активності та вмотивованості під час виконання завдання. Аналіз даних не виявив відмінностей ні в загальній кількості натискань на важелі, ні в загальній кількості винагород, отриманих за сесію протягом тесту, вказуючи на те, що обидві групи були однаково активні та вмотивовані (**Рис. 6.17**). Для порівняння поведінкової гнучкості між досліджуваними групами також оцінювали: кількість «перемикань» з одного важеля на другий протягом однієї сесії; перевага вибору одного важеля щодо іншого; ефективність натискань (кількість натискань за одну винагороду). Аналіз даних також не виявив відмінностей між цими вимірами між досліджуваними групами ($P > 0,05$ для всіх показників, **Рис. 6.18**). Отже, безсудомна ЕФА під час раннього розвитку не впливала на поведінкову гнучкість тварин при виконанні описаних тестів.

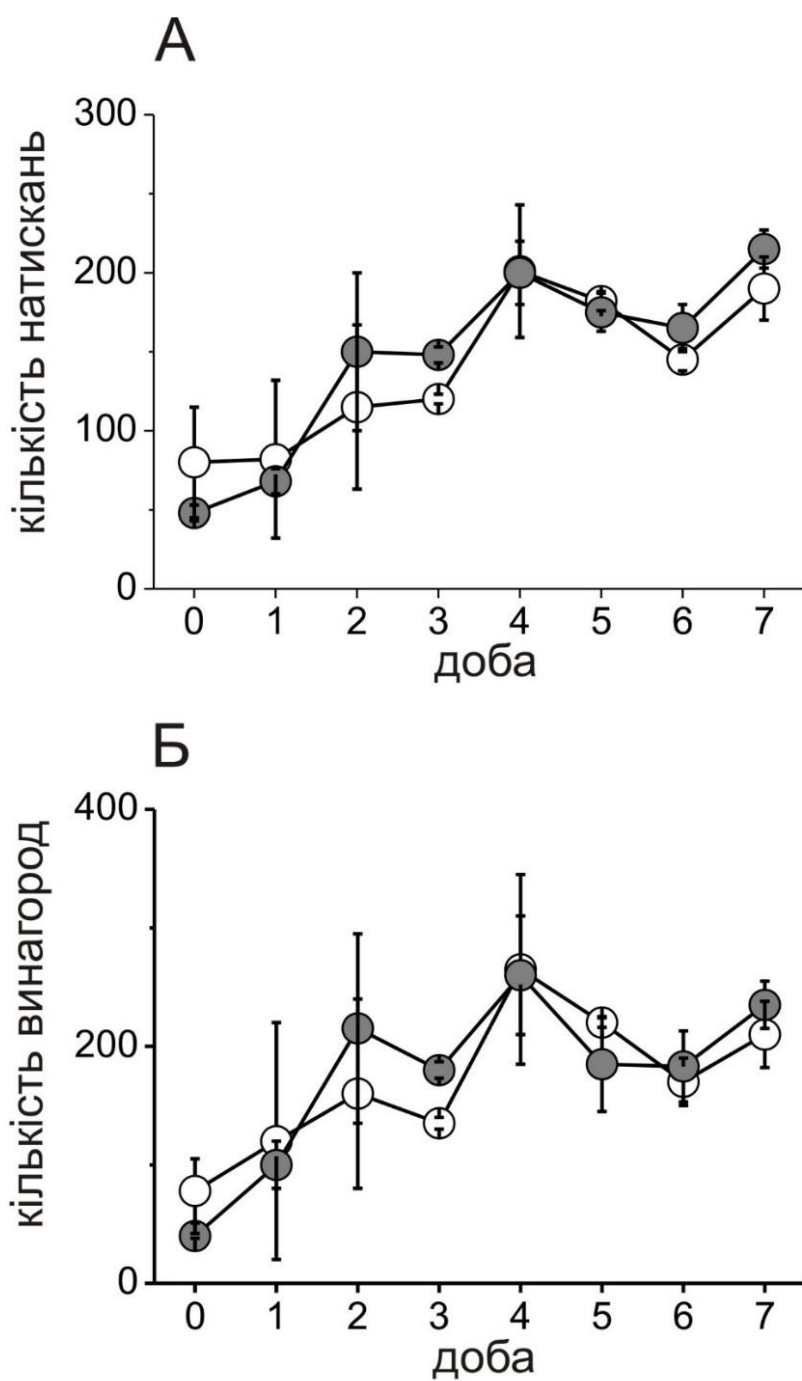


Рис. 6.17. Вплив безсудомної епілептиформної активності в період раннього розвитку на загальну кількість натискань на важелі (А) та кількість винагород (Б), отриманих за сесію протягом тесту на рівень поведінкової гнучкості.

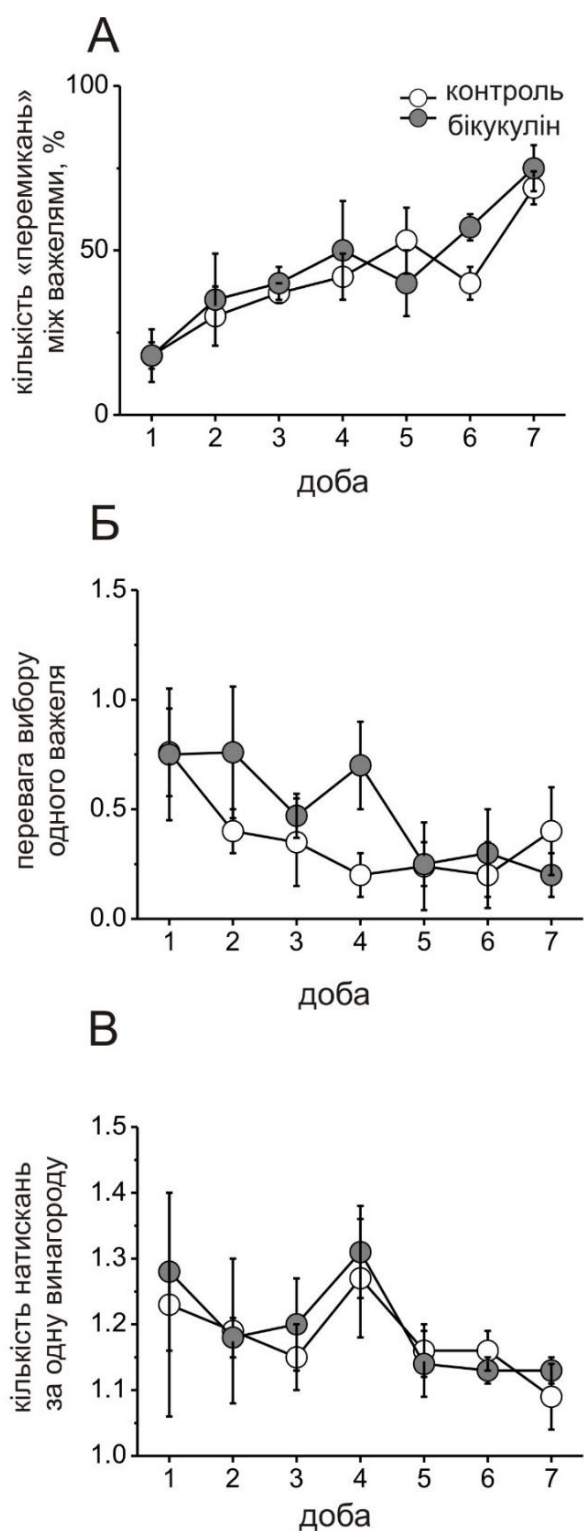


Рис. 6.18. Вплив безсудомної епілептиформної активності в період раннього розвитку на кількість «перемикань» з одного важеля на другий протягом однієї сесії (А); перевагу вибору одного важеля щодо іншого (Б); ефективність натискань (В) протягом тесту на поведінкову гнучкість.

6.4.2. «Затриманий-не-відповідний-до-проби»- тест

Для дослідження можливих змін ПФК-залежної оперативної пам'яті у щурів з історією безсудомної ЕФА в період раннього розвитку використовували «затриманий-не-відповідний-до-проби»-тест (ЗНВП). Цей тест включає коротку презентацію «референсного» об'єкту (фаза кодування), період затримки (фаза збереження), під час якої експериментальна тварина повинна запам'ятати або не забути «референсний» об'єкт, та фазу вибору, протягом котрої, щоб отримати винагороду (їжу) тварина з двох запропонованих об'єктів («референсний» об'єкт та «новий» об'єкт) повинна вибрати «новий». Для успішного виконання ЗНВП-тесту експериментальна тварина повинна запам'ятати та розпізнати «референсний» об'єкт, вміти порівнювати «новий» об'єкт з «референсним» та цілеспрямовано робити вибір на користь «нового» об'єкту.

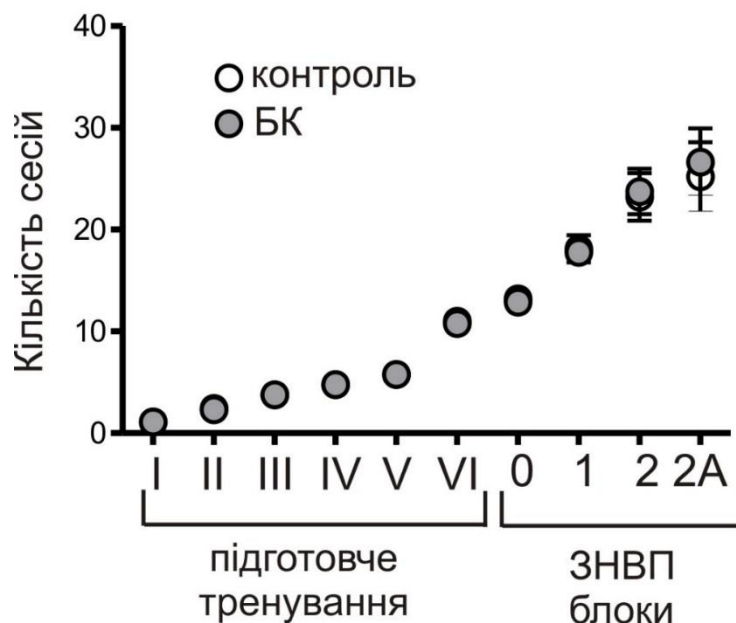


Рис. 6.19. Вплив безсудомної епілептиформної активності на процес підготовчого тренування та різні блоки ЗНВП тесту. Залежність кількості

сесій (діб) для завершення відповідного блоку підготовчого тренування або ЗНВП-тесту в контрольній (білі кружечки) або БК-групі (сірі кружечки). Підготовче тренування (I – VI етапи) і блоки ЗНВП тесту (0-2а) описані в деталях в Розділі 2.6.2 .

Аналіз отриманих даних показав, що кількість діб до завершення кожного блоку підготовчого тренування та ЗНВП-тесту, як вимір компонента тесту, який є пов'язаним з оперативною пам'яттю, не розрізнявся між досліджуваними групами (**Рис. 6.19**). Ми також не знайшли жодної істотної відмінності в точності виконання завдання під час будь-якого з блоків (приклад для VI блоку підготовчого тренування представлено на **Рис. 6.20**). Ці факти свідчать про те, що безсудомна ЕФА під час раннього розвитку не впливає істотно на ПФК-залежний компонент оперативної пам'яті, залучений у виконання цього тесту.

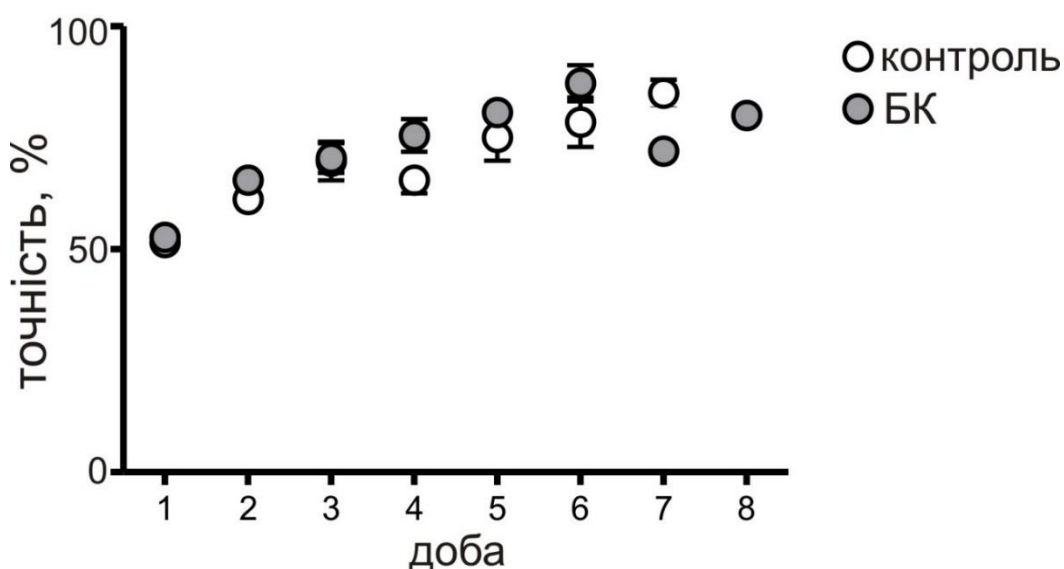


Рис. 6.20. Безсудомна епілептиформна активність під час раннього розвитку не впливає на точність виконання завдання за сесію при виконанні VI блоку підготовчого тренування.

Попередні дослідження показали, що помилки, допущені під час виконання ЗНВП-тесту, свідчать про дефіцит уваги [385, 386]. В наших досліджах тварини БК-групи робили значно більше помилок за сесію, ніж контрольні тварини впродовж всіх 28 діб тестування, із середнім числом помилок на одну тварину за добу $0,6 \pm 0,1$ в контрольній групі та $11,3 \pm 1,5$ в БК-групі ($P < 0,01$, **Рис. 6.21**). Ці дані свідчать про те, що тварини з історією безсудомної ЕФА в період раннього розвитку значно частіше робили помилки в ході виконання окремих завдань.

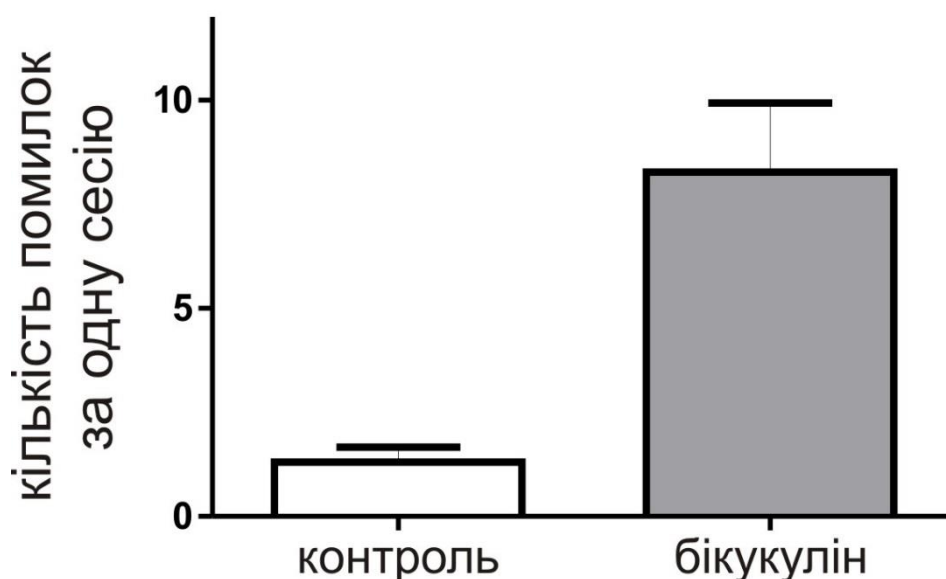


Рис. 6.21. Тварини з історією безсудомної ЕФА під час раннього розвитку робили значно більше помилок під час виконання завдання за сесію у будь-якому з блоків підготовчого тренування та ЗНВП-тесту.

Ці помилки значною мірою були пов'язаними з пропуском фази «кодування» (не натисканням «референсного» важеля) з середньою кількістю помилок за одну сесію $0,3 \pm 0,1$ в контролі та $10,4 \pm 2,0$ в БК-групі, допущених

за одну сесію, а також з фазою «збереження» (помилки зроблені твариною під час виконання цієї фази) ($0,2 \pm 0,1$ помилок за сесію у контрольній групі та $1,7 \pm 0,3$ помилок за сесію в БК-групі, **Рис. 6.22**).

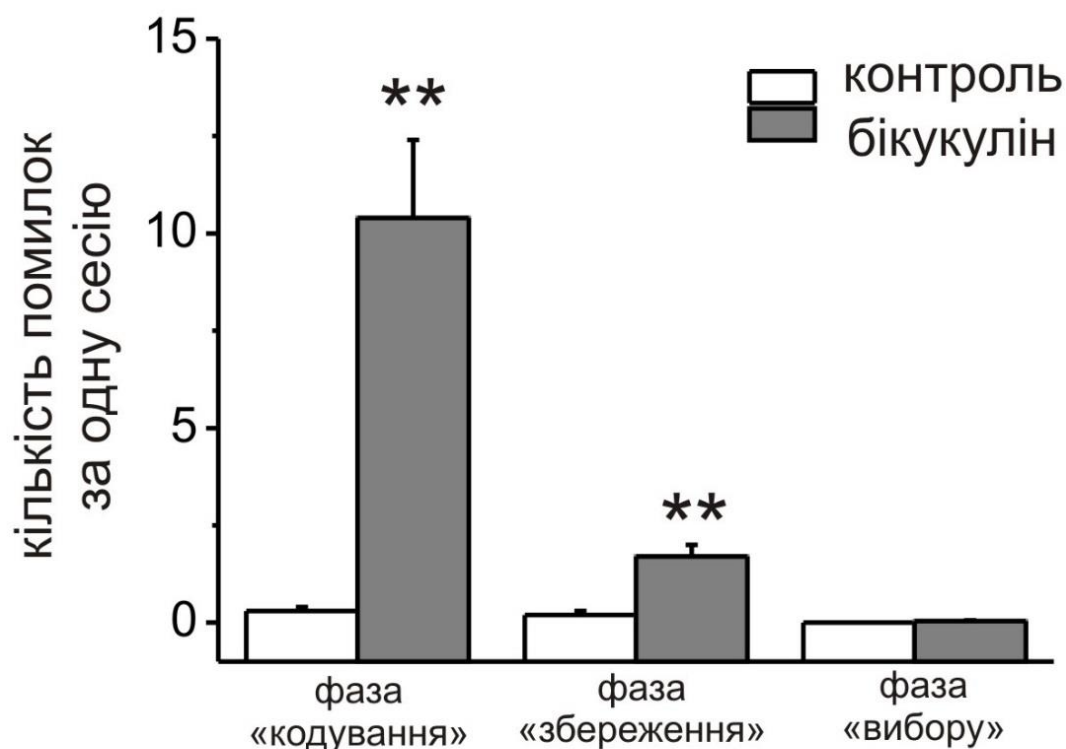


Рис. 6.22. Залежність кількості помилок за одну сесію від фази ЗНВП-тесту. Тварини з історією інтеріктальної активності під час раннього розвитку найчастіше робили помилки під час виконання фази «кодуювання» ЗНВП тесту. Білим кольором зображені дані отримані від контрольних щурів; сірим кольором позначено дані отримані від щурів БК-групи.

Фазу вибору або повернення робили практично без помилок обидві групи (0 помилок в контрольній групі, $0,04 \pm 0,02$ помилок за сесію в БК- групі; **Рис. 6.22**).

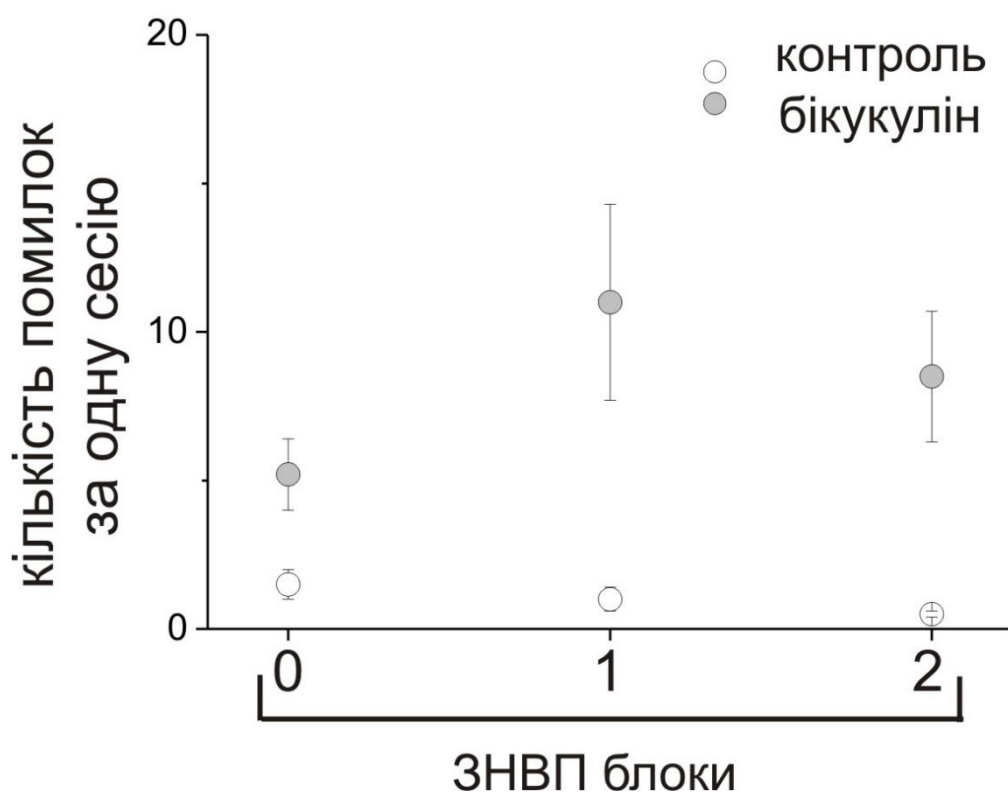


Рис. 6.23. Залежність кількості допущених помилок за одну сесію від блоку ЗНВП тесту в контрольній та БК-групі.

Рис. 6.23 показує, що кількість допущених помилок не залежало від блоку ЗНВП-тесту, отже, безпосередньо вони не є пов'язаними зі змінами компоненти завдання, пов'язаного із використанням оперативної пам'яті, а скоріше є ознакою порушень уваги або концентрації у тварин БК-групи.

6.4.3. Тест «відкрита арена»

З метою більш глибокого розуміння причин помилок, під час виконання ЗНВП-тесту з експериментальними тваринами проводився поведінковий тест «відкрита арена». Цей тест дозволяє кількісно оцінити локомоторну активність щурів, а також дослідити окремі форми емоційної поведінки, такі як тривожність та збудження (гіперактивність).

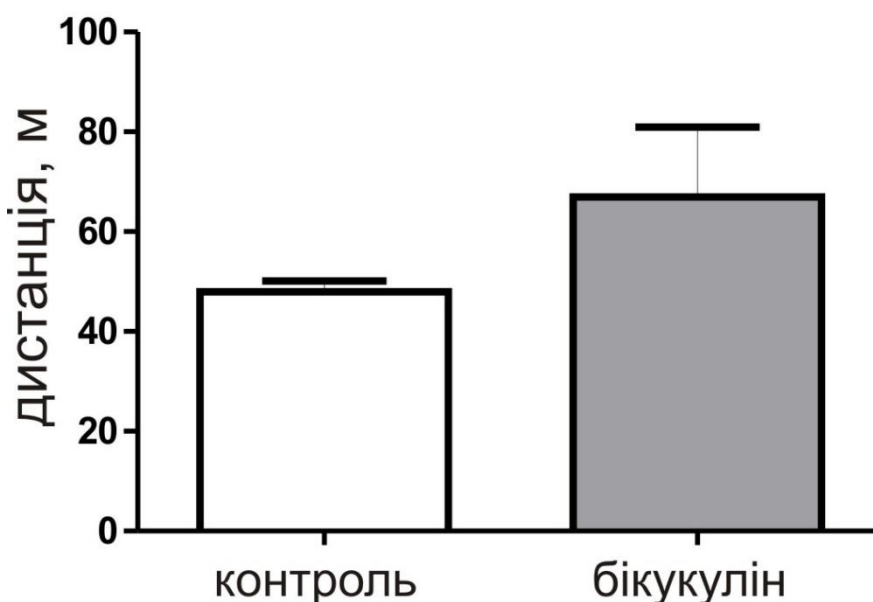


Рис. 6.24. Вплив безсудомної епілептиформної активності на локомоторну активність тварин протягом 10-тихвилинного сеансу під час виконання тесту «відкрита арена».

Під час виконання тесту «відкрита арена» ми не знайшли істотних відмінностей в загальній дистанції, яку тварина долала протягом 10-тихвилинного сеансу в експериментальній арені (як вимір локомоторної

активності, $47,9 \pm 2,2$ м, $n = 5$ у контрольній групі та $66,9 \pm 14,0$ м, $n = 5$ в БК-групі; $P = 0,2$, **Рис. 6.24**), або в співвідношенні між часом, проведеним твариною у центральних квадрантах арени, і часом знаходження на периметрі кругової арени (як вимір, тривожності тварини, контрольна група: $131,3 \pm 39,9$ с в центрі, $462,9 \pm 41,6$ с на периметрі; БК-група: $98,0 \pm 23,9$ с у центрі, $516,2 \pm 23,6$ с на периметрі; $P = 0,2$, **Рис. 6.25**).

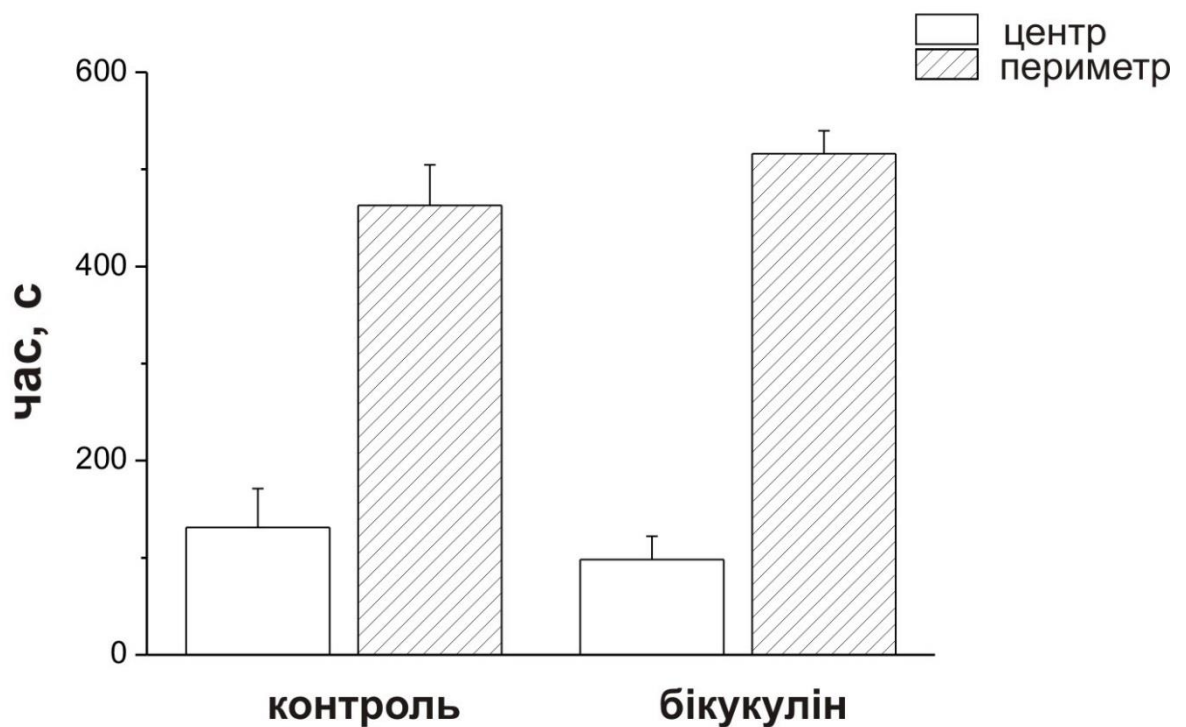


Рис. 6.25. Вплив безсудомної епілептиформної активності на динаміку поведінки тварин контрольної та БК груп під час виконання тесту «відкрита арена». Середній час, проведений твариною в центральних квадрантах арени під час 10-тихвилинного сеансу, позначено білими стовпчиками. Смугасті стовпчики відображають середній час, проведений тваринами на периметрі арени.

Отже можна зробити висновок, що безсудомна ЕФА під час раннього розвитку не впливає на локомоторну активність і тривожність щурів.

6.4.4. Тест «перегородка»

Для дослідження соціальної поведінки тварин в наших експериментах використовували тест «перегородка» описаний в деталях в **Розділі 2.6.4.** Аналіз проведених досліджень з використанням цього тесту показав, що хоча обидві групи досліджених тварин проводили більше часу з щуром ніж з об'єктом, контрольні тварини проводили значно більше часу поряд з щуром ніж об'єктом порівняно з щурами з історією безсудомної ЕФА в період раннього розвитку ($P < 0,05$). Контрольні тварини проводили $65,7 \pm 4,7$ % від загального часу поряд з щуром та $34,3 \pm 4,7$ % часу з об'єктом. Тварини БК-групи, проводили $58,8 \pm 6,1$ % часу з щуром та $41,2 \pm 6,1$ % часу з об'єктом (**Рис. 6.26**).

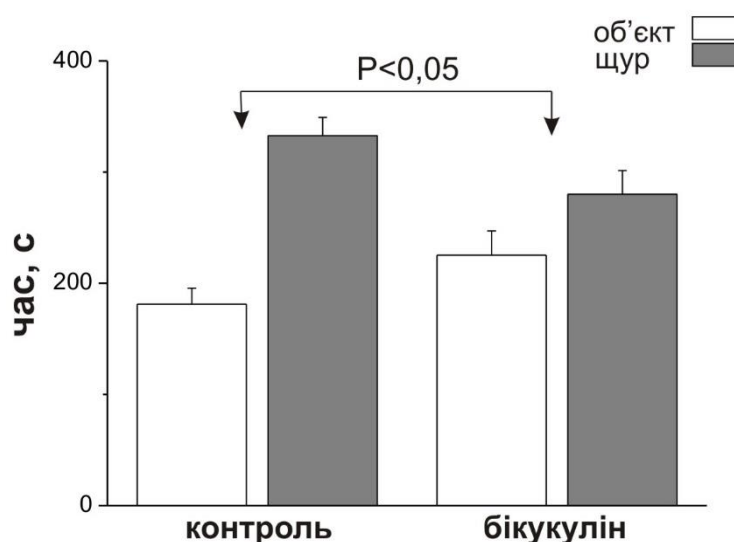


Рис. 6.26. Вплив безсудомної епілептиформної активності на динаміку поведінки тварин контрольної та БК груп під час виконання тесту

«перегородка». Контрольні тварини проводили значно більше часу поряд з щуром ніж об'єктом порівняно з щурами БК- групи.

Зміни в часі, проведеному піддослідними тваринами в кожній камері не залежали ($P = 0,34$) від змін в загальній кількості перетинів центральної камери (Рис. 6.27), що свідчить про те, що тварини БК-групи не просто частіше пересувались з однієї бокової камери до іншої (проявляли гіперактивний фенотип поведінки під час виконання тесту), а витрачали менше часу поряд з щуром.

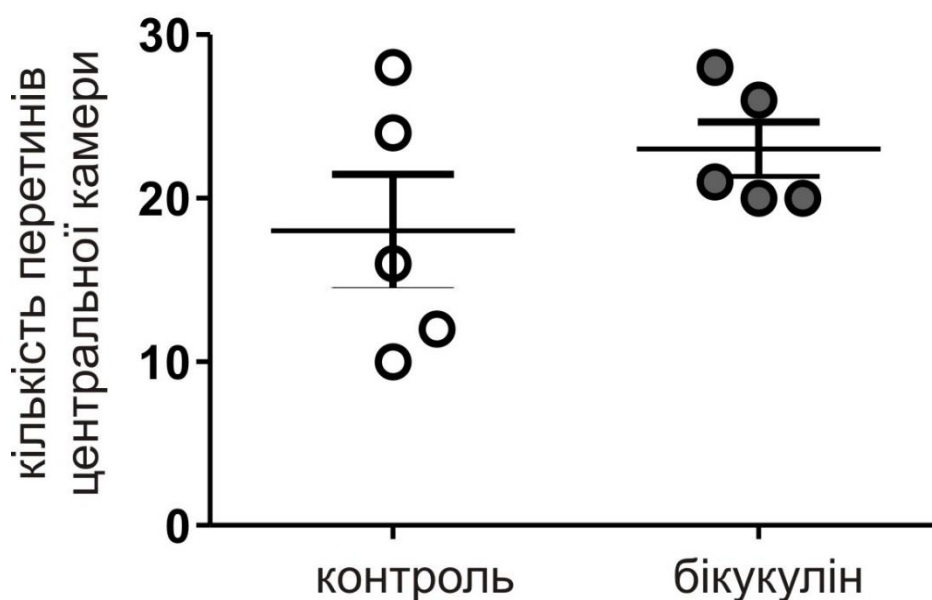


Рис. 6.27. Кількість перетинів центральної камери під час виконання тесту «перегородка» не розрізнялась між досліджуваними групами. Кожен кружечок відображає окремий експеримент.

Ці дані показують, що ЕФА, викликана локальною ін'єкцією бікукуліну в ПФК під час раннього розвитку, призводить до значного дефіциту соціальної поведінки тварин під час виконання тесту «перегородка».

Отже можна зробити висновок, що повторювана ЕФА, спровокована внутрішньоцеребральними ін'єкціями бікукуліну в ПФК в період раннього розвитку:

- 1) не впливає на рівень активності, вмотивованості і поведінкової гнучкості тварин під час виконання тесту на поведінкову гнучкість;
- 2) не впливає на ПФК-залежний компонент оперативної пам'яті, залучений у виконання ЗНВП-тесту;
- 3) призводить до значного дефіциту уваги при виконанні ЗНВП-тесту;
- 4) не впливає на локомоторну активність та рівень тривожності тварин під час виконання тесту «відкрита арена»;
- 5) призводить до дефіциту соціальної поведінки під час виконання тесту «перегородка».

РОЗДІЛ 7. МОРФОЛОГІЧНІ, ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ТА ПОВЕДІНКОВІ ЗМІНИ ПІД ЧАС ВИКЛИКАНОГО ЕПІЛЕПТИЧНИМ СТАТУСОМ ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗУ ТА РОЛЬ ПРОТЕАЗААКТИВОВАНИХ РЕЦЕПТОРІВ 1 В ЦИХ ПРОЦЕСАХ.

Незважаючи на роки інтенсивних клінічних та фундаментальних досліджень, розуміння механізмів, залучених у розвиток набутої епілепсії, залишається значній мірою обмеженим. У багатьох випадках епілептогенез є спровокованим черепномозковою травмою, інсультом, запаленням, пухлиною мозку, формуванням епілептичного статусу (ЕС) і т.д. Безпосередньо за травматизуючою подією наявний так званий латентний період тривалістю від декількох днів або тижнів (в експериментальних моделях) до років (у людини), коли зміни на анатомічному, мережевому, клітинному та молекулярному рівнях в кінцевому підсумку призводять до розвитку хронічних рецидивуючих епілептичних нападів. Проте зовсім не будь-яка серйозна травматична подія призводить до перетворення "нормального" мозку на «епілептичний». Різноманітні фактори, які супроводжують травматичну подію, можуть відігравати важливу роль у розвитку набутої епілепсії.

Як було зазначено в **Розділі 1.3.3.7**, клінічні спостереження та дослідження на різних моделях набутої епілепсії у тварин послідовно вказують на те, що важливим фактором ризику розвитку спонтанних епілептичних нападів може бути порушення ГЕБ. Залучені до такого розвитку сигнальні шляхи поки що залишаються в значній мірі нез'ясованими.

Вірогідною мішенню при дослідженнях молекулярних механізмів, залучених в посттравматичний епілептогенез, який супроводжується порушеннями ГЕБ, є PAR1– рецептори, що активуються тромбіном і які є широко експресованими в клітинах ЦНС. Як зазначалось в **Розділі 1.3.4.**, тромбін і PAR1 відіграють важливу роль в патофізіології наслідків

неврологічних травм. Виявлено, що пригнічення активації PAR1 забезпечує певний нейропротекторний ефект в експериментальних моделях травми мозку та моделях ішемії. Також відомі наступні факти: 1) ін'єкція тромбіну може підсилювати і навіть провокувати розвиток ЕФА через модуляцію активності ТТХ-чутливих перзистентних натрієвих струмів і впливи на збуджувальну та гальмівну синаптичну передачу[18, 272, 387]; 2) активація PAR1 може призводити до ушкодження нейронів, інтенсифікації нейрогенезу та астрогліозу, викликати запалення і хронічну дисфункцію ГЕБ – процеси, які часто спостерігаються при епілептогенезі[17]; 3) фармакологічне інгібування PAR1 забезпечує нейропротекторний і протизапальний ефекти у експериментальних моделях ішемії мозку[290]; 4) PAR1 беруть участь у регуляції функцій ідентифікованих мішеней антиепілептогенної терапії [388, 459]. Ці спостереження призвели до припущення, що PAR1 можуть бути залученими у посттравматичний епілептогенез, який супроводжується порушеннями ГЕБ; пригнічення PAR1 у межах латентного періоду забезпечувати нейропротекторну та антиепілептогенну дії. Правомірність цієї гіпотези була досліджена в наступній серії експериментів з використанням літій-пілокарпінової моделі епілептогенезу, спричиненого формуванням ЕС, тестуванням селективного антагоніста PAR1 (SCH79797) та застосуванням низки морфологічних та електрофізіологічних методик.

7.1. Локалізація PAR1 в зоні CA1 гіпокампа

В попередніх дослідженнях було показано, що в гіпокампі, PAR1 переважно локалізовані в пірамідних зонах [281]. У нашому дослідженні, з використанням імуногістохімічних методів забарвлення зрізів гіпокампа

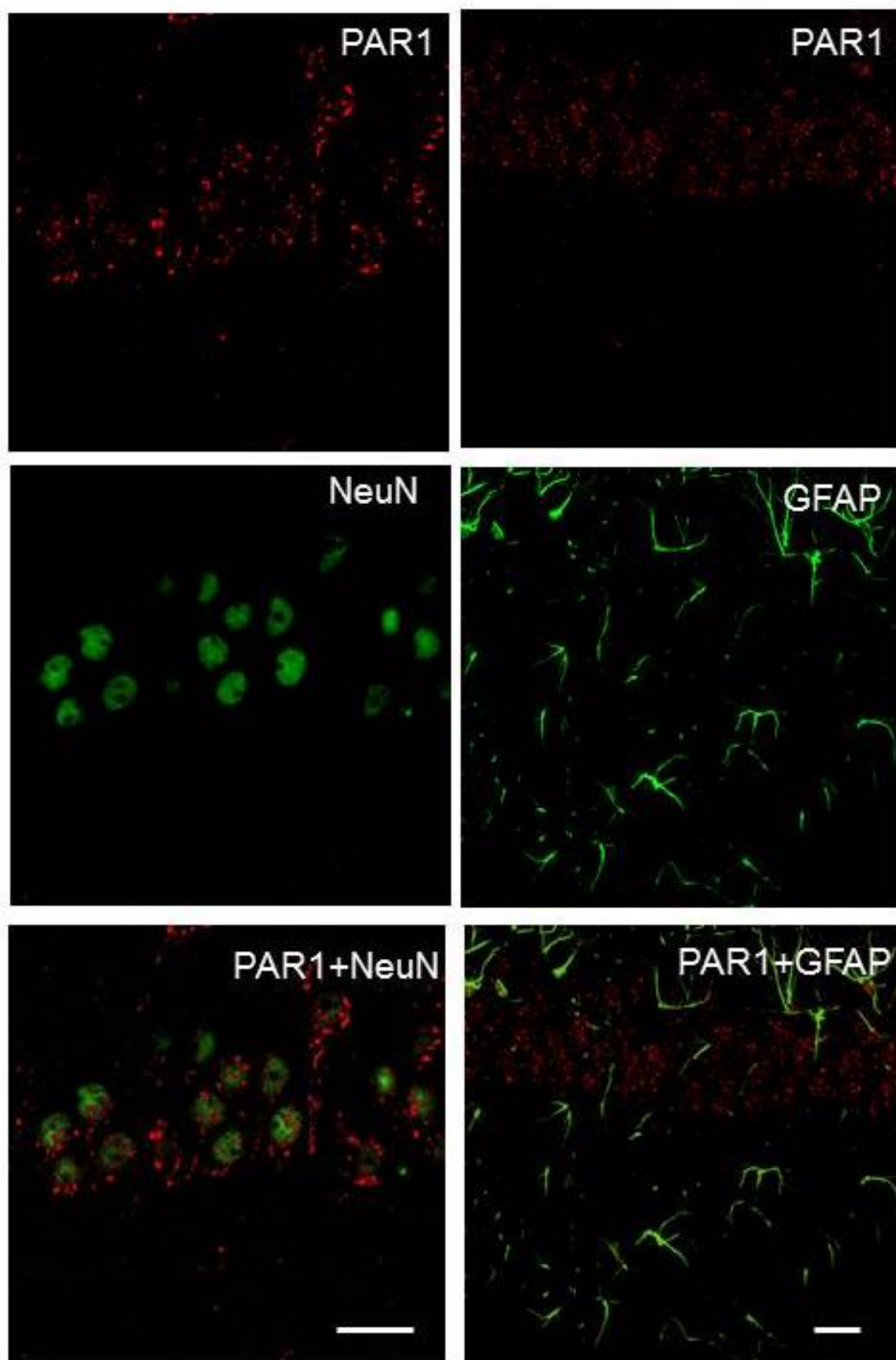


Рис. 7.1. Локалізація ПАР1 в зоні СА1 гіпокампа. Конфокальне

зображення клітин гіпокампа подвійно забарвлених анти-ПАР1 поліклональними антитілами (червоний) та анти-NeuN моноклональними антитілами (зелений) в контрольній групі показує, що переважна більшість ПАР1-імунопозитивних клітин в зоні СА1 пов'язані з нейронами. Клітини, які експресують специфічний маркер астроцитів GFAP (зелений) практично не експресують ПАР1 (червоний). Масштаб 100 мкм.

також було виявлено експресію ПАР1 в пірамідній зоні СА1 гіпокампа (**Рис. 7.1**). Для з'ясування фенотипу ПАР1-позитивних клітин було проведено подвійне імуногістохімічне забарвлення з використанням астроцит-специфічних (анти-GFAP) або нейрон-специфічних (анти-NeuN) антитіл разом з анти-ПАР1 антитілами. Як показано на **Рис. 7.1**, забарвлення анти-ПАР1 антитілами є ко-локалізованим з NeuN, що свідчить про нейрональний фенотип клітин, що експресують ПАР1 ($n = 10$). ПАР1-GFAP подвійне забарвлення показало незначну сумісну локалізацію цих двох білків в СА1 зоні гіпокампа ($n = 10$, **Рис. 7.1**). Отже, в зоні СА1 гіпокампа переважна більшість ПАР1-імунопозитивних клітин в зоні СА1 є пірамідними клітинами.

7.2. Вплив інгібування ПАР1 на рівень тромбіну і ПАР1 та забарвлення тіоніном в зоні СА1 гіпокампа після епілептичного статусу

Тромбін

Імуногістохімічні дослідження на зрізах гіпокампа з використанням антитіл до тромбіну показали, що в зоні СА1 контрольної групи спостерігався незначний базовий рівень тромбіну (**Рис.7.2А1**). Для дослідження розподілу тромбіну в різних ділянках зони СА1 проводилася

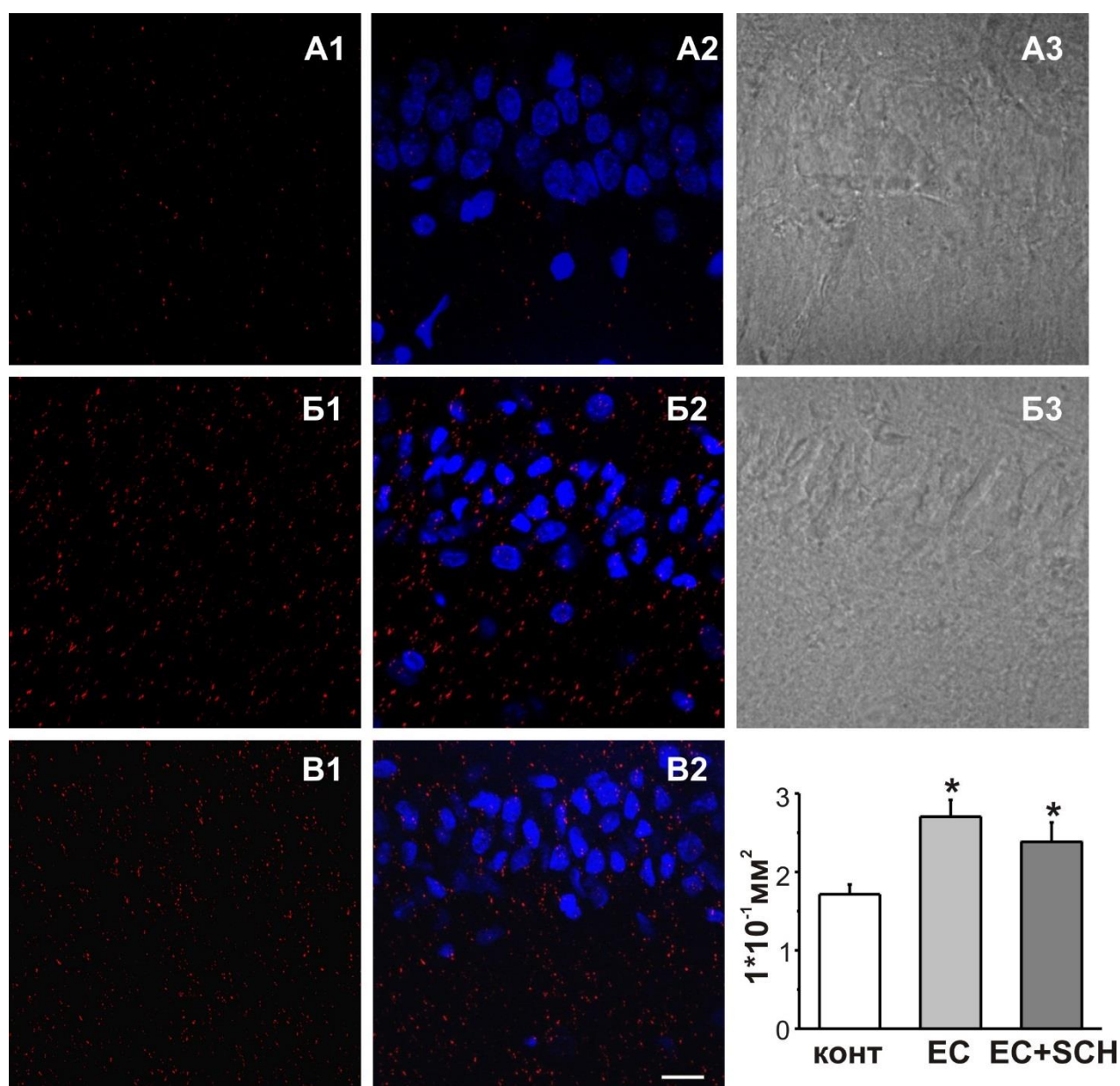


Рис. 7.2. Вплив інгібування ПАР1 на рівень тромбіну в СА1 зоні гіпокампа після ЕС. Забарвлення зрізів гіпокампа з використанням поліклональних антитіл до тромбіну (1), подвійного забарвлення з використанням DAPI та поліклональних антитіл до тромбіну (2) та візуалізація зони СА1 на фазово-контрастному мікроскопі (3, масштаб - 50 мкм). Сумарна діаграма змін імунореактивності тромбіну в досліджених групах: контроль (А), ЕС+розчинник (Б) та ЕС+SCH (В). Виявлено значне

*підвищення рівня тромбіну в зоні CA1 гіпокампа через 48 годин після ЕС. Введення SCH 79797 не призвело до зниження ЕС-індукованого підвищення рівня тромбіну. * $P < 0.05$ порівняно з контролем.*

візуалізація ядер нейронів з використанням DAPI забарвлення (**Рис. 7.2**). Розподіл тромбіну був однорідним в stratum pyramidale (SP), stratum radiatum (SR) і stratum oriens (SO) зонах .

В попередніх дослідженнях з використанням пілокарпінової моделі епілепсії та імуногістохімічного забарвлення імуноглобуліну G (IgG) було показано, що ЕС, спричинений ін'єкцією пілокарпіну, викликає значне пошкодження ГЕБ [389]. Максимальне підвищення IgG-імунореактивності в гіпокампі спостерігалось через 48 годин після ЕС. Виходячи з того, що пошкодження ГЕБ може призводити до підвищення рівня компонентів крові, в тому числі і тромбіну, у внутрішньоцеребральному середовищі, дослідження впливу ЕС на рівень тромбіну проводили на зрізах, виділених з мозку щурів через 48 годин після ЕС.

Аналіз даних показав, що рівень тромбіну в зоні CA1 гіпокампа був значно підвищений через 48 годин після припинення ЕС ($0,27 \pm 0,02$, $n = 30$, порівняно з контролем $0,17 \pm 0,01$, $n = 30$, $P = 0,0002$, **Рис. 7.2Б**). На **Рис. 7.2В** і відповідній діаграмі показано, що ін'єкції інгібітора PPAR1, SCH 79797 (25 мкг/кг), після припинення ЕС не впливали на збільшення рівня тромбіну в зоні CA1 гіпокампа (через 48 годин після ЕС: група ЕС + SCH: $0,24 \pm 0,02$, $n = 30$ порівняно з групою ЕС + розчинник: $0,27 \pm 0,02$, $n = 30$, $P = 0,3$).

ПАР1

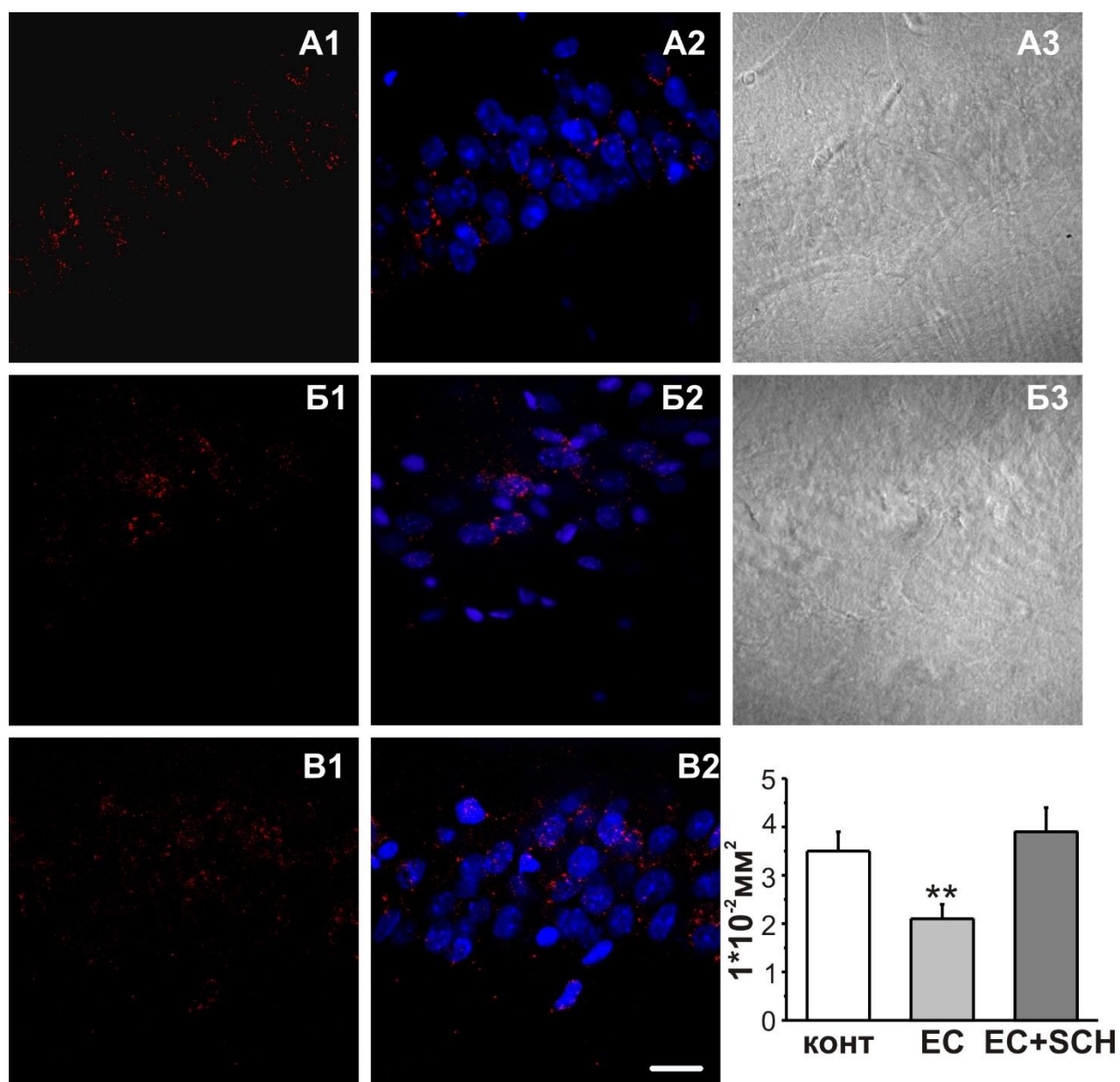


Рис. 7.3. Вплив епілептичного статусу та ін'єкцій SCH 79797, на рівень експресії ПАР1 в зоні СА1 гіпокампа. Забарвлення зрізів гіпокампа з використанням поліклональних антитіл до ПАР1 (1, масштаб - 50 мкм) (1), подвійного забарвлення з використанням DAPI та поліклональних антитіл до ПАР1 (2) та візуалізація зони СА1 на фазово-контрастному мікроскопі (3) в

контрольній групі (А), через 48 годин після ЕС в групах ЕС + розчинник (Б) та ЕС+SCH (В). Сумарна діаграма змін імунореактивності ПАР1 в досліджуваних групах показала, що ЕС призводить до значного зниження ПАР1 імунореактивності в дослідженій ділянці мозку. Введення SCH 79797 призводить до відновлення рівня ПАР1 в зоні СА1 зоні гіпокампа. $**P < 0,01$ порівняно з контролем.

Як було зазначено в **Розділі 1.3.4.** основним рецептором тромбіну в мозку є ПАР1. Тому нами було висунуто припущення, що підвищення рівня тромбіну спровоковане ЕС може призвести до змін у експресії ПАР1. В наступній серії експериментів досліджували вплив ЕС на рівень експресії ПАР1 в пірамідній зоні СА1 гіпокампа. Аналіз даних показав значну втрату ПАР1 імунореактивності через 48 годин після ЕС ($2,1 \pm 0,3$, $n = 20$, порівняно з контролем $3,5 \pm 0,4$, $n = 20$, $P = 0.004$, **Рис. 7.3**). Введення SCH 79797 призводило до відновлення рівня ПАР1 в дослідженій зоні гіпокампа (через 48 годин після ЕС: ЕС + SCH: $3,9 \pm 0,5$, $n = 20$, порівняно з контролем, $n = 20$, $P = 0.4$, **Рис. 7.3**).

ЕС-індукована загибель нейронів гіпокампа

Серед ймовірних причин зниження ПАР1 імунореактивності після ЕС, може бути спровокована ЕС втрата нервових клітин, що експресують ПАР1. Відомо, що ЕС, спровокований ін'єкцією пілокарпіну у дорослих тварин, призводить до значної втрати нейронів в різних ділянках мозку в тому числі і в гіпокампі [85].

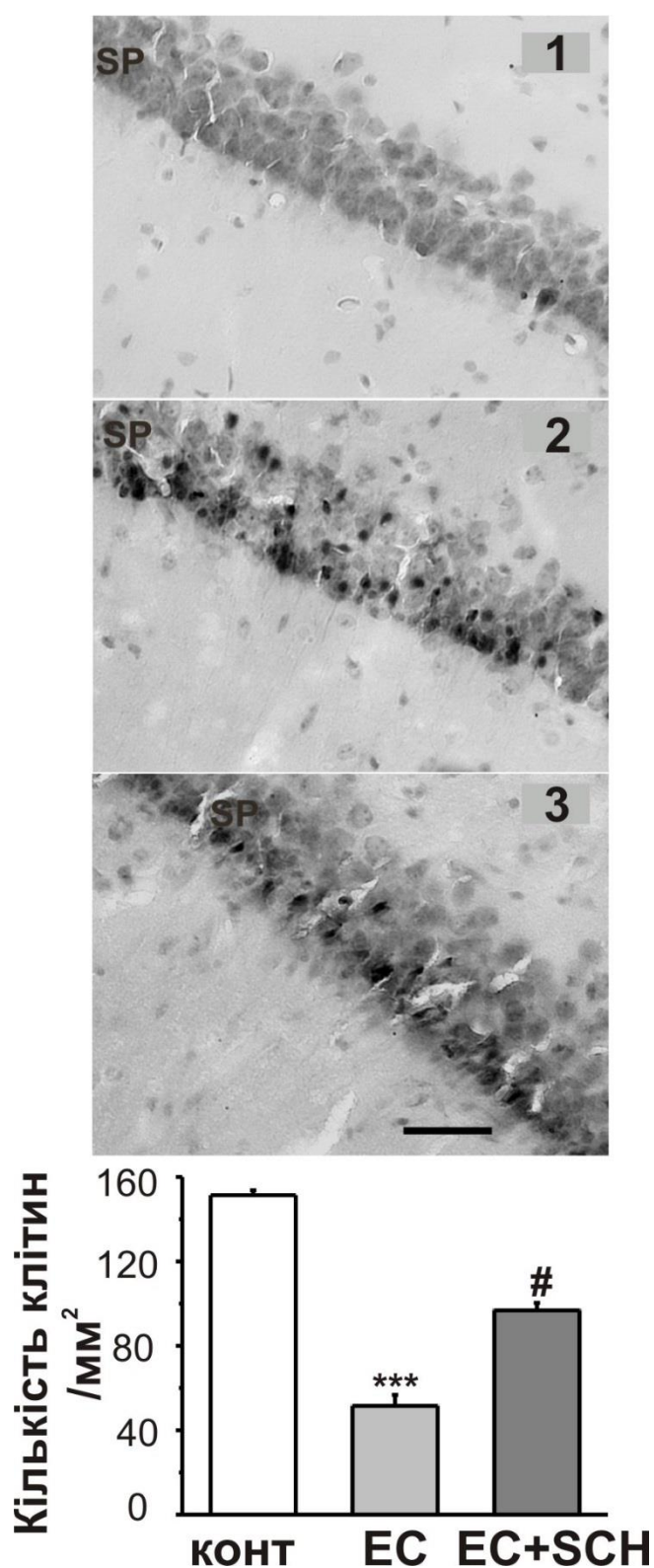


Рис. 7.4. Вплив інгібування ПАР1 на ЕС-індуковану загибель клітин в зоні CA1 гіпокампа. Забарвлення зрізів гіпокампа тіоніном (В, масштаб - 200

*мкМ) в контрольній групі (1), через 48 годин після ЕС в ЕС+розчинник (2) та ЕС+SCH (3) групах. Забарвлення зрізів з використанням тіоніну виявило значну втрату клітин зони СА1 гіпокампа через 48 годин після ЕС. Введення SCH 79797 призводило до зниження ЕС-індукованої загибелі клітин. *** $P < 0,001$ порівняно з контролем; # $P < 0,01$ порівняно з групою ЕС+розчинник.*

Дослідження впливу ЕС на пошкодження нейронів проводилося з використанням методу тіонінового забарвлення. На **Рис. 7.4** показано, що епілептичний статус спричиняв значну втрату клітин в СА1 пірамідній зоні гіпокампа (в групі ЕС + розчинник через 48 годин після ЕС ($51,5 \pm 5,2$, $n = 20$, порівняно з контролем $151,4 \pm 2,3$, $n = 20$, $P < 0,001$). У групі ЕС + SCH кількість клітин була значно більшою, ніж в групі ЕС + розчинник (через 48 год після ЕС $96,8 \pm 3,5$, $n = 20$, $P < 0,01$, **Рис. 7.4**).

7.3. Вплив інгібування ПАР1 на відновлення втраченої ваги та смертність тварин після епілептичного статусу

Різнноманітні клінічні спостереження на пацієнтах з діагнозом епілепсія та дані отримані на експериментальних моделях епілепсії показали, що впродовж перших двох тижнів після ЕС є певна вірогідність раптової смерті [390–392].

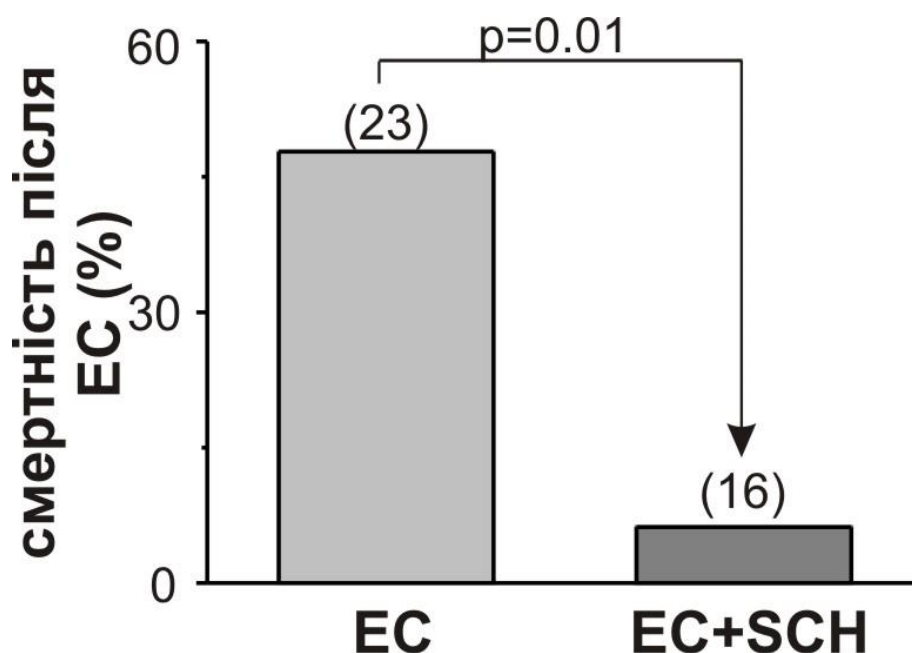


Рис. 7.5. Ефект інгібування ПАР1 на смертність тварин після ЕС. Ін'єкції антагоніста ПАР1 зменшують вірогідність смерті тварин після ЕС. Кількість тварин, використаних для аналізу вказана в дужках.

В наших досліджах для індукції ЕС використовували методику повторюваного введення низьких концентрацій пілокарпіну, що, як було показано в попередніх дослідженнях, зменшує вірогідність смерті тварин, спричиненої ЕС [324]. Тим не менш в наших досліджах смертність тварин після ЕС була досить високою (**Рис. 7.5**). Всім тваринам, які пережили ЕС, вводили інгібітор ПАР1 або розчинник протягом 10 діб після ЕС. У групі ЕС + розчинник, 11 з 23 тварин (47,8 %) загинули протягом перших двох тижнів після ЕС (в середньому на $5,4 \pm 0,7$ добу, діапазон 2-10 діб), у групі ЕС + SCH виживаність тварин після ЕС становила 15 з 16 тварин (93,8%). Отже, ін'єкції антагоніста ПАР1 після ЕС значно знижували вірогідність смерті тварин ($P = 0,01$, **Рис. 7.5**).

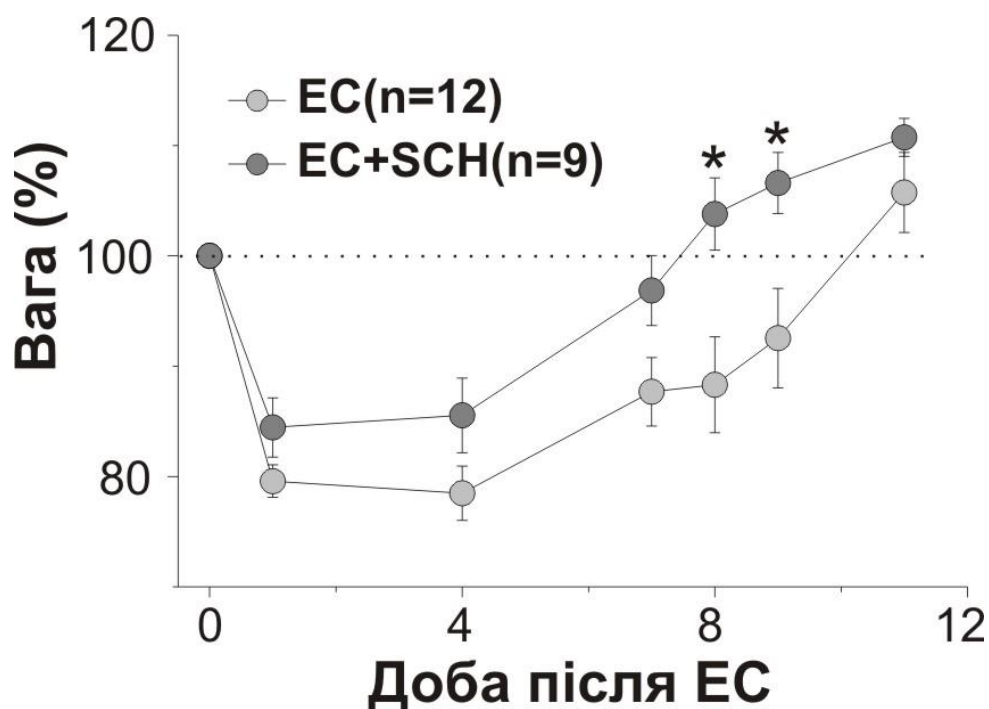


Рис. 7.6. Ефект інгібування ПАР1 на відновлення ваги у тварин після ЕС. Ін'єкції антагоніста ПАР1 значно прискорювали відновлення втраченої ваги у тварин після ЕС Кількість тварин, використаних для аналізу, вказана в дужках.

На третю добу після ЕС, 12 з 15 тварин (80 %) в групі ЕС + SCH та лише 6 з 11 тварин (55,5%) в групі ЕС + розчинник були здатні самостійно пити та їсти та поновлювали нормальну поведінку. Крім того, в ЕС + SCH групі спостерігалось значне прискорення відновлення втраченої ваги у тварин після ЕС (**Рис. 7.6**).

7.4. Вплив селективного антагоніста ПАР1 на епілептиформну активність та спонтанні епілептичні напади

В попередніх дослідженнях електрографічні напади та інтеріктальна активність (ІА) спостерігались в гіпокампі у тварин під час епілептогенезу, спровокованому ЕС [323, 330, 393–395]. Була встановлена позитивна кореляція між наявністю ІА впродовж латентного періоду та розвитком хронічної епілепсії [330, 394]. У наступній серії експериментів, проводили *in vivo* відведення позаклітинних потенціалів від СА1 пірамідної зони гіпокампа щурів в групах ЕС + розчинник та ЕС + SCH протягом двох тижнів після ЕС.

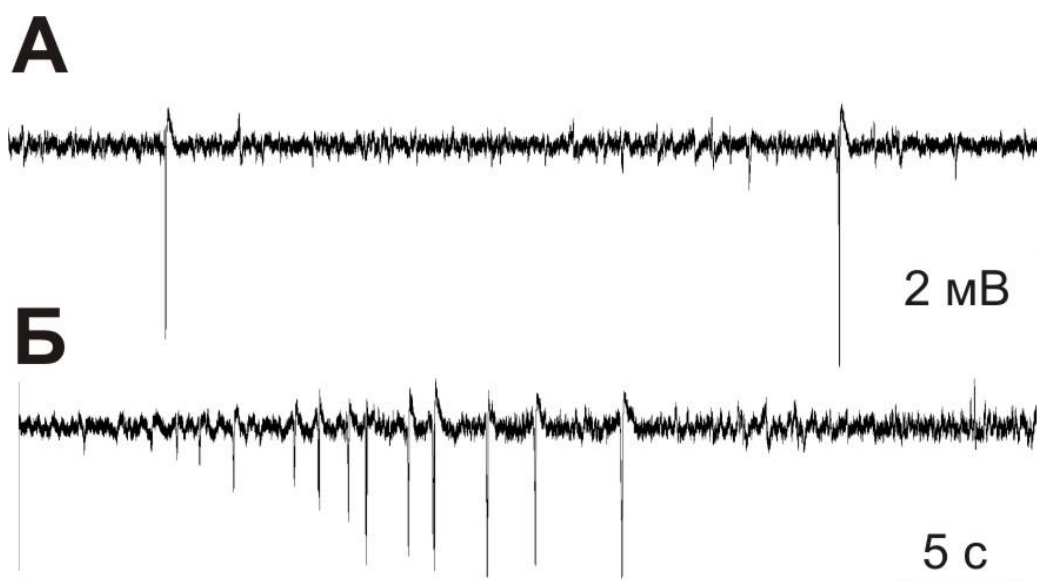


Рис. 7.7. Позаклітинні записи потенціалів в СА1 зоні дорсальної частини гіпокампа у щурів після ЕС. (А) Поодинокі інтеріктальні розряди, записані на другу добу після ЕС у щура групи ЕС + розчинник. (Б) Приклад кластера інтеріктальних розрядів, записаних на сьому добу після ЕС.

Аналіз *in vivo* електрофізіологічних досліджень показав, що у першу добу після ЕС, ІА була зареєстрована у всіх щурів ($n = 8$) в групі ЕС + розчинник та у 6 з 10 щурів у групі ЕС + SCH. Інтеріктальні розряди виникали нерегулярно або в кластерах різної тривалості. На **Рис. 7.7** зображені приклади поодиноких інтеріктальних розрядів і ІА кластеру, зареєстрованого в СА1 зоні гіпокампа щура групи ЕС + розчинник впродовж першого тижня після ЕС.

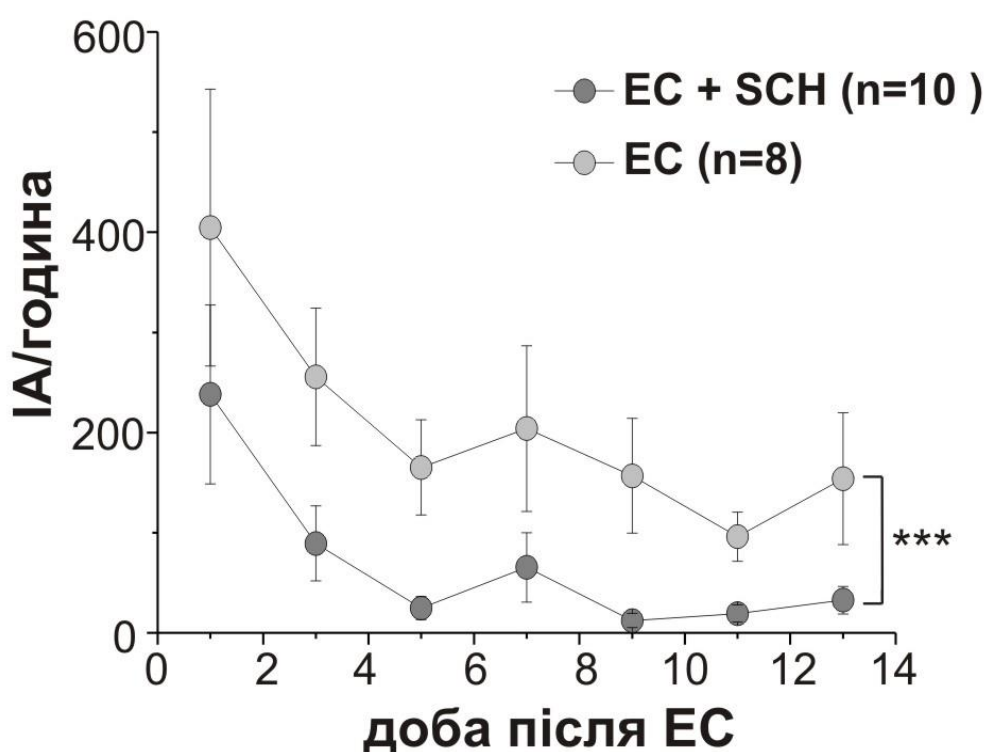


Рис. 7.8. Ін'єкції антагоніста ПАР1 призводили до значного пригнічення інтеріктальної активності в зоні СА1 гіпокампа впродовж перших двох тижнів після ЕС. Кількість тварин, використаних для аналізу, вказана в дужках. *** $P < 0,005$.

Аналіз щоденних реєстрацій позаклітинних потенціалів впродовж двох тижнів після ЕС показав поступове зниження частот інтеріктальних

розрядів протягом першого тижня після ЕС в обох досліджуваних групах (1 і 7-а доба після ЕС: ЕС + розчинник: від $404,6 \pm 138,4$ до $204 \pm 82,7$ інтеріктальних розрядів на годину ($n = 8$) та ЕС + SCH: від $238,0 \pm 89,1$ до $65,3 \pm 34,7$ інтеріктальних розрядів на годину ($n = 10$), що залишалися незмінними протягом другого тижня після ЕС. На **Рис. 7.8** показано, що введення антагоніста ПАР1 призводило до значного пригнічення частоти ІА протягом двох тижнів після ЕС ($P = 0,003$).

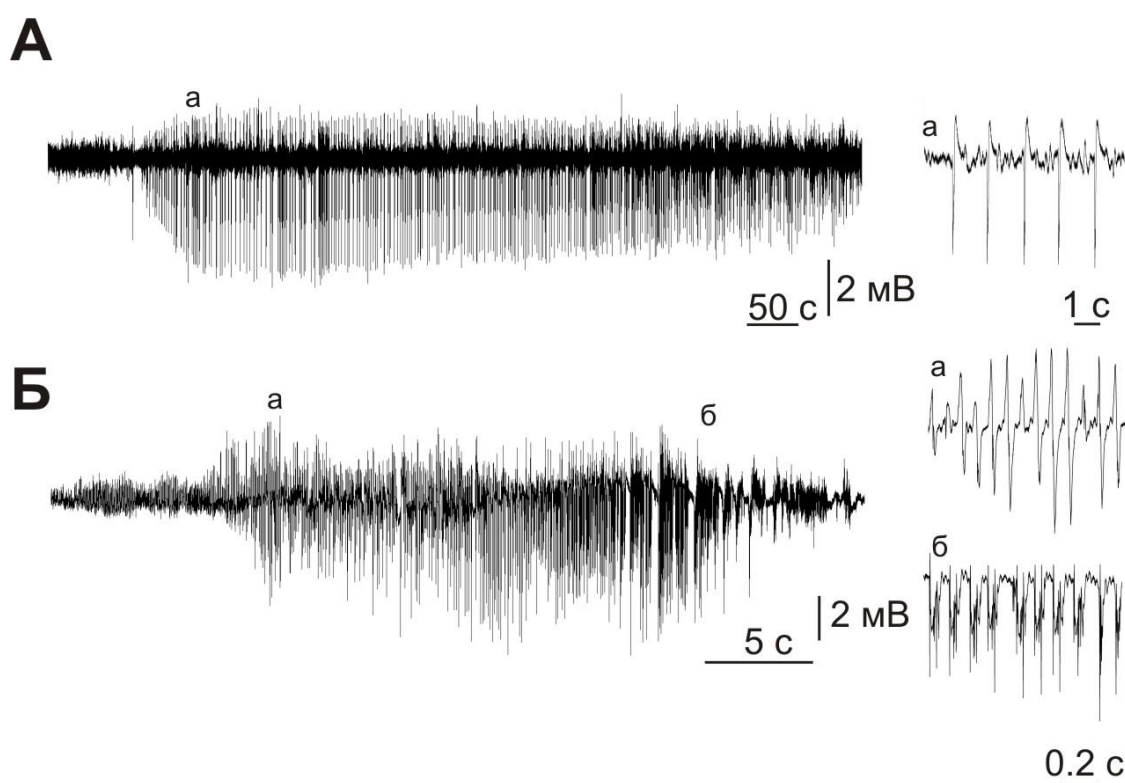


Рис. 7.9. Позаклітинна реєстрація електрографічних нападів в зоні CA1 дорсальної частини гіпокампа впродовж латентного періоду після ЕС. (А) Тривалі низькочастотні осциляції, відведені на восьму добу після ЕС у щура ЕС + SCH групи. (Б) Електрографічні напади, відведені на дев'яту добу після ЕС у щура групи ЕС + розчинник. Маніфестації тонічної (а) та клонічної (б) активності показано на подовженій шкалі часу (праворуч).

У реєстраціях позаклітинних потенціалів впродовж двох тижнів після ЕС спостерігали два типи електрографічних нападів (ЕН): тривалі низькочастотні осциляції (Тип І, максимальна частота 1-3 Гц, тривалість сотні секунд, **Рис. 7.9А**) та короткі високочастотні (Тип ІІ, максимальна частота більше 10 Гц) осциляції, що склались з фаз тонічної та клонічної активності (**Рис.7.9Б**). Обидва типи ЕН можна було спостерігати окремо або разом протягом однієї години запису позаклітинних потенціалів від однієї тварини.

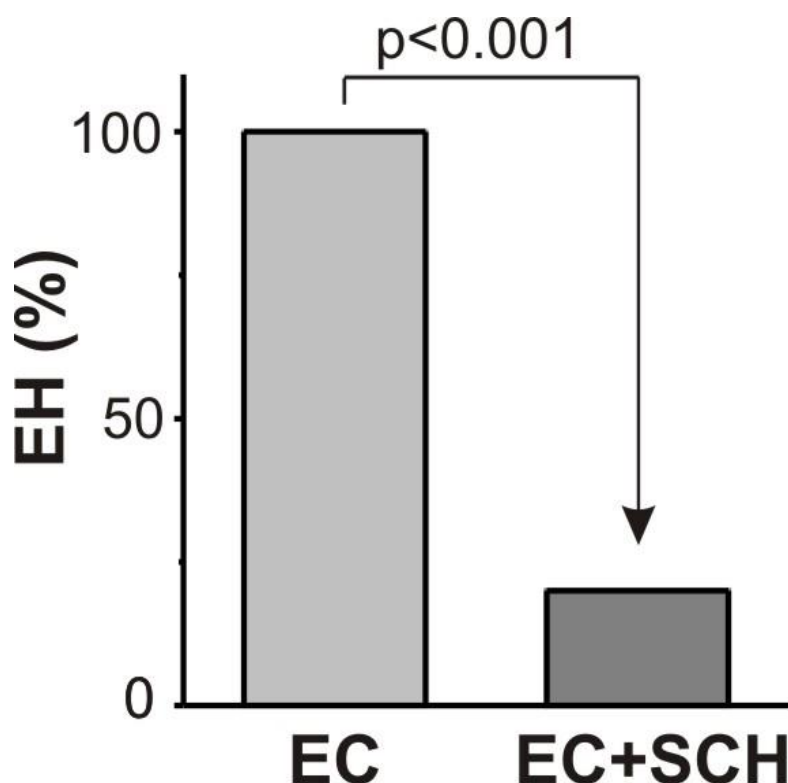


Рис. 7.10. Вплив ін'єкцій антагоніста ПАР1 на електрографічні напади після ЕС. Інгібування ПАР1 знижує вірогідність реєстрації ЕН під час латентного періоду після ЕС.

Протягом всього періоду електрофізіологічних досліджень ЕН типу І спостерігалися у всіх щурів групи ЕС + розчинник (початок $3,9 \pm 1,2$ доба після ЕС, $2,0 \pm 0,7$ події на щура, тривалість $459,8 \pm 69,7$ с, $n = 16$ подій) та тільки у

2 з 10 щурів групи EC + SCH (початок 4-а і 7-а доба після ЕС, $n = 4$ події, тривалість $608,5 \pm 234,8$ с). ЕН типу II спостерігали тільки в одного щура групи EC + розчинник, починаючи з 8-ої доби після ЕС ($n = 4$ події, тривалість $32,5 \pm 4,8$ с, максимальна частота $18,0 \pm 1,5$ с⁻¹). Жоден з щурів групи EC + SCH не мав нападів типу II протягом усього періоду електрофізіологічних досліджень. На **Рис. 7.10** показано, що інгібування ПАР1 призводило до значного зниження вірогідності виникнення ЕН в зоні СА1 гіпокампа впродовж перших тижнів після ЕС.

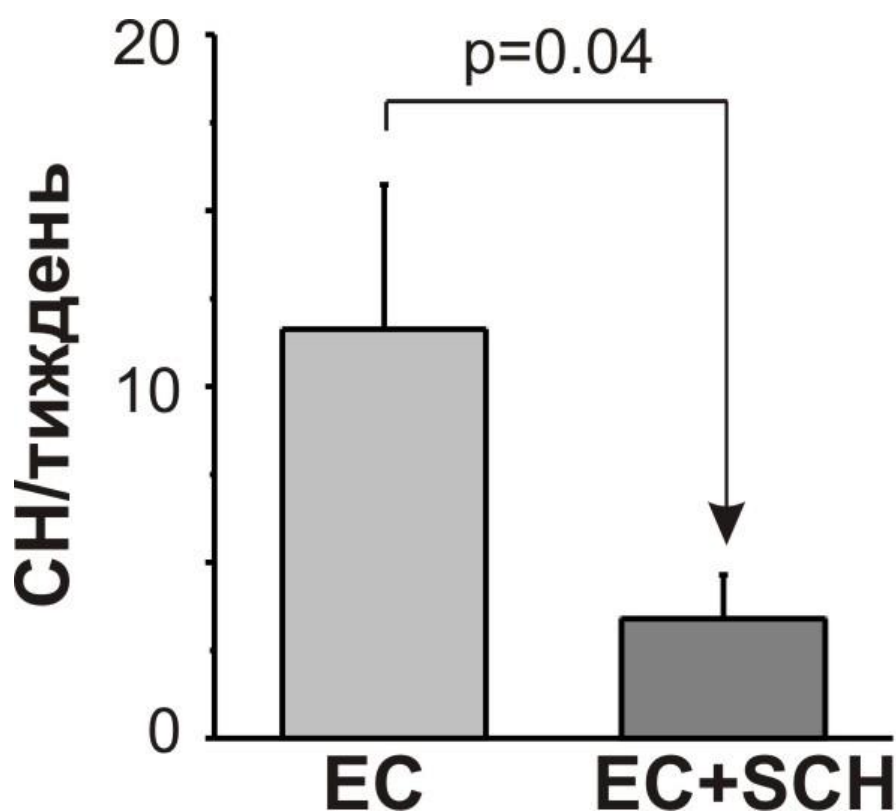


Рис. 7.11. Вплив ін'єкцій антагоніста ПАР1 на судомні напади на хронічній стадії літій-пілокарпінової моделі епілепсії. Сумарний графік показує ефект інгібування ПАР1 на частоту виникнення судомних нападів (СН) на хронічній стадії моделі.

Усі 8 щурів в групі ЕС + розчинник та 6 з 10 щурів у групі ЕС + SCH мали судомні напади протягом одного тижня відеомоніторингу (12 год/добу) проведеного через 3,0-3,5 місяців після ЕС (хронічний період літій-пілокарпінової моделі епілепсії). На **Рис. 7.11** показано, що інгібування ПАР1 призводило до значного пригнічення ймовірності спостереження судомних нападів під час хронічного періоду після ЕС (група ЕС + розчинник ($n = 8$) порівняно з групою ЕС + SCH ($n = 10$), $P = 0,04$).

Отже, підсумовуючи результати представлені в даному Розділі можна зробити наступні висновки:

- 1) епілептичний статус, спровокований ін'єкціями пілокарпіну у дорослих щурів, спричиняє:
 - а) високу смертність і захворюваність піддослідних тварин;
 - б) підвищення рівня тромбіну і зниження рівня ПАР1 в зоні СА1 гіпокампа;
 - в) загибель клітин гіпокампа;
 - г) призводить до розвитку хронічної епілепсії.
- 2) Ін'єкції селективного антагоніста ПАР1 впродовж перших десяти діб після ЕС призводять:
 - а) до значного зниження спричинених ЕС смертності і захворюваності тварин;
 - б) відновлення ПАР1-експресії в зоні СА1 гіпокампа до контрольного рівня на фоні відсутності ефекту ПАР1 антагоніста на збільшення рівня тромбіну в цій ділянці мозку після ЕС;
 - в) зниження ЕС-індукованої загибелі клітин в зоні СА1 гіпокампа;
- 4) пригнічення інтеріктальної та іктальної активності, яку реєстрували в СА1 зоні гіпокампа впродовж перших двох тижнів після ЕС;

5) зниження вірогідності виникнення судом на хронічній стадії літій-пілокарпінової моделі епілепсії.

Отримані дані показують, що тромбін і PAR1 приймають участь в епілептогенезі, спричиненому ЕС, в експериментальній моделі скроневої епілепсії і пригнічення активності PAR1 має нейропротекторний і антиепілептогенний ефекти, що вказує на те, що PAR1 може стати новою перспективною мішенню "антиепілептогенної" терапії.

РОЗДІЛ 8. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.

8.1. Вплив неонатальних повторюваних судомних нападів на синаптичну передачу в різних ділянках мозку

8.1.1. Гіпокамп.

Ранній постнатальний період розвитку мозку пов'язаний зі швидким процесом формування та дозрівання нервової мережі у зв'язку зі змінами, що відбуваються в синаптичних мережах. У нашому дослідженні показано, що частота та амплітуда спонтанних гальмівних, а також збуджувальних синаптичних струмів за контрольних умов значно збільшувалась в період раннього постнатального розвитку. Ці зміни загальної синаптичної провідності обумовлені такими процесами, як збільшення числа контактів між нейронами, кількості синапсів та розвитком синапсів [396–399]. В результаті проведених дослідів продемонстровано, що повторювані неонатальні судоми, викликані інгаляцією флуротилу, не впливали на загальну тенденцію змін у частоті сГПСС та змін у частоті та амплітуді сЗПСС принаймі впродовж перших двох тижнів після індукції судомних нападів. Аналіз амплітуд сГПСС виявив, значне пригнічення амплітуди сГПСС в дослідній групі порівняно з контролем.

Зменшення ефективності ГАМК-ергічної синаптичної передачі, спровоковане надмірною активністю нервових мереж, було описано з використанням різноманітних експериментальних моделей викликаного або хронічної епілепсії. Так було показано, що неонатальні судоми, викликані інгаляцією флуротилу, призводять до довготривалого зниження експресії $\alpha 1$ субодиниці ГАМК_A-рецепторів [134]. З використанням *in vitro* моделі викликаного ЕС було показано, що підвищена активність пірамідних нейронів гіпокампа в культурі нейронів призводила до збільшення кількості

інтерналізованих ГАМК_A-рецепторів [400]. ЕФА, спровокована зниженням іонів магнію в міжклітинному середовищі, призводила до хроничного зниження амплітуди мГПСС, зниження експресії $\beta 2/\beta 3$ субодиниць ГАМК_A-рецепторів і ендоцитозу ГАМК_A-рецепторів у культурі гіпокампа [401]. З іншого боку, пригнічення гальмівної синаптичної передачі може бути опосередковане порушенням різних процесів обміну речовин та, як наслідок, зниженням ГАМК_A-рецептор-опосередкованого гальмування. Так з використанням низькомагнієвої моделі ЕФА було показано, що зменшення постсинаптичного ГАМК_A-рецептор-залежного гальмування є АТФ-залежним процесом [402]. Також з використанням моделі нападів, викликаних гіпоксією в неонатальний період життя, було показано, що спровоковане судомними пригнічення гальмівної синаптичної передачі повністю відновлювалось після застосування інгібіторів кальцій-залежної фосфатази (кальциневрину) [403].

Слід зазначити, що епілептичні напади під час раннього постнатального розвитку не завжди призводять до зниження функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Так з використанням пілокарпінової моделі скроневої епілепсії на дорослих щурах було показано зниження експресії мРНК субодиниць ГАМК_A-рецептора в нейронах зубчастої звивини після ЕС [404]. Ці зміни в експресії генів спостерігалися протягом латентного періоду і корелювали зі значними змінами у функції ГАМК_A-рецептора. Однак, з використанням тієї ж моделі ЕС на молодих тваринах (віком 10 діб після народження) було показано двократне збільшення експресії $\alpha 1$ субодиниці ГАМК_A-рецепторів [124]. Також селективне підвищення гальмівної синаптичної передачі в гіпокампі без змін збуджувальної синаптичної передачі, спостерігалось у щурів після довготривалих епілептичних нападів, спровокованих гіпертермією в період раннього розвитку [405]. Ці дані свідчать, що в залежності від моделі ЕФА, тяжкості і тривалості нападів, віку тварин впливи епілептичних нападів на гальмівну синаптичну передачу в

гіпокампі можуть суттєво розрізнятися і призводити як до зниження, так і до підвищення функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі в цій ділянці мозку.

Попередні дослідження з використанням інтактного гіпокампа щурів показали, що ЕФА може призвести до позитивних зрушень потенціалу реверсії іонів Cl^- , в результаті чого можуть спостерігатися зміни у функції ГАМК-ергічної синаптичній передачі з гіперполяризуючої на деполяризуючу [406]. Аналогічні зміни функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі були виявлені на нейронах субікулума в зразках нервової тканини пацієнтів зі скроневою епілепсією [407]. Результати наших досліджень з використанням неінвазивного метода позаклітинного запису потенціалів дії і селективного агоніста ГАМК_A-рецептора, ізогувадину, показують, що розвиток гальмівної функції ГАМК-ергічних відповідей не розрізнявся між досліджуваними групами. Відсутність впливу неонатальних судом на розвиток функції гальмівної синаптичної передачі може бути пов'язаним з меншою інтенсивністю судом в ФТ-моделі в порівнянні з ЕС, викликаним аплікацією каїнової кислоти в експериментах на інтактном гіпокампі [93].

У нашому дослідженні кінетика спаду сЗПСС, опосередкованих активацією НМДА-рецепторів, значно скорочувалася впродовж другого та третього тижнів постнатального розвитку. Подібно нашим даним, зміни в кінетиці НМДА-рецептор-опосередкованих синаптичних струмів під час раннього постнатального розвитку були встановлені в різних ділянках головного мозку [354–356, 408]. Було показано, що в незрілих нейронах спад НМДА-опосередкованих збуджувальних постсинаптичних струмів значно повільніший, ніж в дорослих нейронах за рахунок значної експресії NR2B субодиниці порівняно з NR2A субодиницею, яка експресується в дорослих нейронах та забезпечує швидкий спад цих струмів [41]. В попередніх дослідках зменшення експресії субодиниці NR2A і збільшення експресії субодиниці NR2C в корі головного мозку і гіпокампі були виявлені у дорослих щурів з

історією повторюваних неонатальних нападів [134]. У нашому дослідженні ми не знайшли будь-яких істотних відмінностей у кінетичних характеристиках НМДА-опосередкованих сЗПСС між контрольною та дослідною групами у молодих щурів. Ці дані вказують на те, що викликані неонатальними повторюваними судомними нападами зміни у експресії субодиниць НМДА-рецепторів можуть охоплювати окремі популяції нервових клітин не залучені у наші дослідження або бути відтермінованими в часі.

Ще однією особливістю розвитку збуджувальної синаптичної передачі є зміни співвідношення АМПА- і НМДА-рецепторів в новоутворених глутаматних синапсах під час розвитку. Було показано, що значна частина глутаматних синапсів в різних ділянках незрілого мозку має лише функціональні НМДА-рецептори. Також було показано, що зміна глутаматергічної синаптичної передачі, опосередкованої активацією НМДА-рецепторів, на змішаний тип (тобто, опосередкований активацією АМПА- та НМДА-рецепторів) може відбуватися після довготривалої потенціації синаптичних відповідей [351, 352, 409, 410]. В дослідженнях розвитку співвідношення АМПА/НМДА сигналізації в нейронах гіпокампа в контрольній та ФТ групах ми не виявили різниці у співвідношенні частоти та амплітуди АМПА/НМДА сЗПСС на протязі другого та третього тижнів постнатального розвитку між досліджуваними групами. Роль нервової активності в дозріванні сигналізації глутаматергічних синапсів є дискусійним питанням. Існують експериментальні дані, що підтримують протилежні висновки. Наші дані вказують на те, що повторювані неонатальні судомні напади під час раннього розвитку не впливають на співвідношення АМПА/НМДА рецепторів, що підтверджує гіпотезу про незалежність розвитку глутаматергічної сигналізації від змін у збудливості нервових мереж [353, 411].

8.1.2. Соматосенсорна кора.

Клінічні дослідження вказують на те, що в ранній період постнатального розвитку епілептичні напади зазвичай відбуваються в неокортексі. Також встановлено, що різноманітні неврологічні ускладнення після судом у новонароджених найчастіше пов'язані з порушеннями нервових процесів у корі головного мозку. Але наслідки неонатальних епілептичних нападів на функціонування нейронів кори охарактеризовані в сучасних дослідженнях лише фрагментарно. В Розділі 4 наведено детальний аналіз довготривалого ефекту неонатальних судом на нервову активність ССК.

Встановлено, що повторні судомні напади, індуковані в ранньому віці, призводять до:

- I) хронічного зниження порога судомної активності в ССК;
- II) зниження амплітуди спонтанних гальмівних струмів та частоти мініатюрних гальмівних струмів в пірамідних нейронах шарів 2/3;
- III) збільшення частоти і амплітуди спонтанних та частоти мініатюрних збуджувальних струмів;
- IV) призводять до хронічного підвищення довготривалої синаптичної пластичності в синапсах між шарами 4 та 2/3 ССК.

Судомні напади, викликані у піддослідних тварин в період раннього онтогенезу, не призводили до розвитку хронічної епілепсії, але спричиняли хронічне зниження порогу індукованої ЕФА. Так, з використанням свіжоізолюваних зрізів кори щурів з неонатальними судомними нападами у ранньому віці і щурів контрольної групи, а також експериментальної *in vitro* моделі ЕФА, викликаній додаванням в позаклітинний розчин блокаторів гальмівної синаптичної передачі, габазіну або бікукуліну, було показано, що на відміну від зрізів мозку контрольної групи тварин, в переважній більшості зрізів піддослідних тварин, що мали неонатальні судоми, аплікація блокаторів

гальмівної синаптичної передачі призводила до ЕФА в ССК. Підвищення чутливості до дії проепілептичних агентів, порівняно з контрольною групою, спостерігалось через 20 діб після індукції неонатальних судом, а також у дорослому віці. Вірогідність індукції ЕФА, викликаной габазіном, зменшувалася з віком, але різниця ймовірності її появи у відповідь на додавання блокаторів гальмівної синаптичної передачі в ФТ та контрольній групі збільшувалася. Ми не знайшли суттєвих відмінностей в характеристиках ЕФА, поширенні або участі різних типів нейронів у генерації інтеріктально-подібних розрядів у неокортексі між досліджуваними групами. Ці результати вказують на те, що неонатальні напади не впливають на основні механізми генерації та підтримання епілептичних нападів в ССК.

Хронічне підвищення чутливості ССК до дії фармакологічних агентів в ФТ-групі порівняно з контрольною групою, може бути пояснено змінами в балансі збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі, спровокованими неонатальними нападами. Встановлено, що епілептичні напади призводять до хронічних порушень синаптичної гальмівної передачі. Показано значне зниження амплітуди спонтанної гальмівної синаптичної сигналізації в нейронах ССК щурів ФТ-групи. Зміни гальмівної синаптичної передачі в нейронах ССК відбувалися у тому ж напрямку, що й в СА3 пірамідних клітинах гіпокампа. Як і в експериментах на нейронах гіпокампа ми не знайшли істотних відмінностей в інших вимірюваних параметрах спонтанної гальмівної синаптичної передачі в нейронах ССК, що дає можливість припустити, що в змінах ГАМК-ергічної сигналізації після викликаних ФТ судомних нападів у гіпокампі та соматосенсорній корі головного мозку задіяні схожі механізми.

У дослідженні на нейронах ССК ми не знайшли змін у частоті та кінетичних характеристиках сГПСС, але амплітуда цих струмів була значно зменшена. Ефективність синаптичних зв'язків між двома нейронами

характеризується: I) кількістю синаптичних сайтів, II) ймовірністю вивільнення медіатора, і III) середнім розміром постсинаптичної відповіді, яка залежить від кількості та чутливості постсинаптичних рецепторів [412, 413]. В експериментах з блокуванням потенціал-керованого натрієвого струму ми не знайшли різниці в амплітуді мГПСС, що вказує на відсутність ефекту неонатальних судом на постсинаптичну мембрану. Частота мГПСС в ФТ-групі була статистично достовірно нижчою ніж в контрольній групі, що може бути пояснено зміною ймовірності вивільнення ГАМК в нейронах неокортекса. Іншим можливим поясненням зниження частоти мГПСС в нейронах ССК щурів ФТ-групи може бути зменшення числа синаптичних контактів між нейронами.

На відміну від наших досліджень на гіпокампі, неонатальні судоми викликали значні зміни в амплітуді та частоті спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів в нейронах ССК головного мозку щурів. Додавання блокатора НМДА-рецепторів, D-APV, не призводило до змін у амплітудах сЗПСС у контрольній групі. Нещодавні дослідження показали, що в умовах потенціалу спокою НМДА-компонент ЗПСС складає приблизно 20 % від сумарного струму в пірамідних клітинах четвертого шару кори головного мозку [414]. Відсутність ефекту D-APV на амплітуду збуджувального синаптичного сигналу можна пояснити тим, що в наших дослідженнях потенціал мембрани підтримувався на рівні -80 мВ та зовнішньоклітинне середовище мало у складі 1,3 мМ магнію, тобто НМДА-компонент збуджувальних постсинаптичних струмів знаходився на рівні базового шуму. Додавання блокатора НМДА-рецепторів, D-APV, значно знижувало частоту збуджувального сигналу в клітинах кори головного мозку щурів. Аналогічний ефект антагоніста НМДА-рецепторів спостерігався при реєстрації глутаматергічної спонтанної синаптичної передачі в нейронах другого шару енторінальної кори щурів [415]. Автори пояснювали ефект блокатора НМДА-

рецепторів на частоту сЗПСС наявністю пресинаптичних НМДА-рецепторів. Експресія підтипу NR1 та NR2B пресинаптичних НМДА-рецепторів була описана в попередніх дослідженнях [205]. Вважається, що пресинаптичні НМДА-рецептори є посередниками частотнозалежного полегшення трансмісії глутамату, ймовірно, за рахунок збільшення внутрішньоклітинних концентрацій кальцію у пресинаптичній терміналі. Іншим поясненням ефекту D-APV на частоту збуджувального синаптичного сигналу може бути блокування НМДА-ергічної синаптичної передачі в мережі, що призводить до зниження частоти незалежної від активації НМДА-рецепторів збуджувальної синаптичної передачі [416].

Як зазначалось вище, неонатальні судомні напади викликали довготривале збільшення амплітуди і частоти сЗПСС в нейронах ССК головного мозку щурів. Цей феномен не може бути пояснено збільшенням кількості глутаматергічних постсинаптичних рецепторів тому, що амплітуда мЗПСС не була змінена в ФТ групі порівняно з контролем. Збільшення частоти мЗПСС в нейронах ССК головного мозку щурів з історією неонатальних нападів, швидше за все, віддзеркалює пресинаптичні зміни глутаматергічної синаптичної передачі. Додавання D-APV в позаклітинний розчин призводило до зменшення амплітуди і частоти сЗПСС та частоти мЗПСС в нейронах дослідної групи до рівня, що спостерігався в контрольній групі (**Рис. 4.15-17**), що вказує на внесок НМДА-рецепторів у різницю в характеристиках ЗПСС між досліджуваними групами. Наші дані узгоджуються з спостереженнями др. Ян та ін. [208] на нейронах енторіальної кори щурів з епілепсією, спровокованою ЕС. Було показано, що додавання антагоніста NR2B субодиниці НМДА-рецепторів, RO 25-6981, в позаклітинний розчин призводило до зниження частоти сЗПСС в контрольній групі в меншій мірі, ніж в «пілокарпіновій» групі. Для пояснення цього феномену авторами була висунута гіпотеза, що, хоча функція пресинаптичних НМДА-рецепторів, що

експресують NR2B субодиницю, зменшується у дорослих тварин за нормальних умов, в епілептичній тканині спостерігається збільшення числа пресинаптичних НМДА-рецепторів, що призводить до хронічного, НМДА-залежного збільшення частоти сЗПСС в епілептичній тканині. Наші дослідження підтверджують це припущення.

У нашому дослідженні амплітуда ВПСП в другому шарі ССК, викликана подразненням четвертого шару, не розрізнялася між досліджуваними групами, що вказує на те, що неонатальні напади не впливають на синаптичну передачу в цьому вертикальному шляху неокортекса. Епілептичні напади, індуковані ФТ в неонатальний період, не впливали на депресію ВПСП, що спостерігалася впродовж високочастотної стимуляції, та на максимальну посттетанічну потенціацію ВПСП. Експерименти з блокатором НМДА рецепторів, D-APV, показали, що НМДА-рецептори залучені у фазу індукції довготривалої потенціації в досліджених синапсах [417]. Відсутність впливу неонатальних нападів на максимальну посттетанічну потенціацію ВПСП знаходиться у згоді з дослідженнями описаними вище, де було показано, що амплітуда мініатюрної НМДА-залежної компоненти збуджувальних постсинаптичних струмів (як індикатор постсинаптичної зміни) не була змінена у другому шарі ССК ФТ-групи порівняно з контролем.

Впродовж високочастотної стимуляції активація НМДА-рецепторів призводить до збільшення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Внаслідок цього активуються різні внутрішньоклітинні кальцій-залежні вторинні месенджери, які мають вирішальне значення у підтриманні потенціації постсинаптичної відповіді [418, 419]. Попередні дослідження з використанням кіндлінгової моделі епілепсії показали, що епілептичні напади можуть призводити до зниження вірогідності виникнення довготривалої потенціації у відповідь на високочастотну стимуляцію, а також до змін у

характеристиках посттетанічної потенціації ВПСР [420, 421]. Проте хронічне зниження порогу збудження нервової системи не завжди пов'язане з втратою або погіршенням спроможності синапсів до потенціації, яка швидше залежить від клітинних механізмів, що лежать в основі збільшення активності нейронів. Так було показано, що у тварин з генетичною схильністю до судом спостерігалось підвищення довготривалої потенціації синаптичних відповідей [422]. Відомо, що неонатальні напади, викликані інгаляцією ФТ, призводять до значного зниження цього типу синаптичної пластичності в гіпокампі [423]. В нашому дослідженні довготривала потенціація була значно підвищена в ССК щурів ФТ-групи, що вказує на вибіркового характер впливів неонатальних судом на різні ділянки мозку. Той факт, що повторювані судом, індуковані у новонароджених щурів, по-різному впливають на НМДА-опосередковану збуджувальну синаптичну передачу в ССК і гіпокампі щурів підтримує це припущення [318, 320].

Отже, проведені дослідження наслідків повторюваних судомних нападів на нервову активність ССК головного мозку щурів показали хронічні порушення функції синаптичної передачі в цій ділянці мозку. Продемонстровано, що неонатальні напади в ранньому віці призводять до хронічних змін балансу збудження/гальмування в корі головного мозку, що збільшує вірогідність рецидивного розвитку судом. Хронічне зниження порогу судомної активності в ССК головного мозку щурів ФТ- групи підтверджує це припущення. Зміни синаптичної пластичності наведені в даній роботі можуть впливати на обробку сенсорної інформації у пацієнтів з історією судом у період раннього розвитку і призводити до ряду негативних наслідків, а саме до порушень сенсорних процесів у пацієнтів з історією неонатальних судом.

8.1.3. Медіальна зона префронтальної кори.

Дослідження впливів повторюваних судомних нападів в період раннього розвитку на синаптичну передачу в мПФК головного мозку щурів показали, що неонатальні судомні напади призводять до хронічних змін гальмівної синаптичної передачі пірамідних нейронів п'ятого шару та змін короткотривалої синаптичної пластичності в синапсах мПФК.

Як і в попередніх дослідках на нейронах гіпокампа та ССК в нейронах п'ятого шару мПФК спостерігалось суттєве зниження функції гальмівної синаптичної передачі внаслідок неонатальних судом. Частота мГПСС в нейронах п'ятого шару мПФК дослідної групи була значно меншою ніж в контрольній групі, без змін в амплітуді та кінетичних характеристиках мГПСС, що вказує на пресинаптичний характер ефекту неонатальних судом на гальмівні синапси в досліджених нейронах та може бути пояснено зміною ймовірності вивільнення медіатора ГАМК в синапсах нейронів мПФК та/або зменшенням числа синаптичних контактів між нейронами. Відсутність різниці між характеристиками мЗПСС в нейронах п'ятого шару мПФК та ВПСП в синапсах між нейронами шарів 2/3 та 4 та в межах шару 5 мПФК щурів ФТ та контрольної груп вказує на те, що повторювані судоми в період раннього розвитку не впливають на функцію збуджуючої синаптичної передачі в досліджених синапсах мПФК. Відомо, що під час роботи оперативної пам'яті спостерігається характерна електрична імпульсна активність нейронів п'ятого шару мПФК, що свідчить про залучення цих нейронів у кодування короткочасної пам'яті [424]. Хронічні зміни в функціонуванні синаптичної передачі в цих нейронах, викликані неонатальними нападами, можуть бути клітинним підґрунтям негативних наслідків повторюваних судомних нападів під час раннього розвитку на поведінкові реакції.

Короткотривала пластичність (КТП) вважається важливим механізмом модифікації синаптичних та системних функцій та являє собою швидку, двонаправлену та зворотню модуляцію синаптичної інтенсивності [425]. Існує думка, що цей вид пластичності є важливим у багатьох функціях мозку, включаючи процеси прийняття рішень. Численні дослідження КТП із використанням комп'ютерного моделювання вказують на те, що зміни у КТП передбачають зміни в поведінці. Більш того, важливість КТП підтверджується у дослідженнях на різних моделях патології нервової системи, включаючи епілепсію, де зміни у КТП співвідносились із когнітивними та поведінковими порушеннями [426, 427]. Припускається, що функціональна роль короткотривалих видів пластичності полягає у забезпеченні обробки тимчасової інформації в діапазоні від десятків мілісекунд до кількох хвилин. Короткотривалі види пластичності та повільні синаптичні явища надають можливість нейронам вибірково реагувати на особливості тимчасових стимулів, шляхом, залежної від часу, зміни стану нервової мережі [376].

В нашому дослідженні на зрізах мозку щурів ФТ та контрольної груп були протестовані різноманітні форми КТП, а саме: 1) пластичність, викликана парною стимуляцією; 2) пластичність, викликана короткотривалою тетанічною стимуляцією; 3) синаптична пластичність впродовж високочастотної стимуляції. Показано, що неонатальні напади призводять до суттєвих змін у пластичності впродовж тетанічної стимуляції та короткотривалої потенціації синаптичних відповідей, викликаній високочастотною стимуляцією, і не впливають на пластичність, викликану парною стимуляцією.

У наших дослідженнях пластичність, викликана парною стимуляцією, не розрізнялась між досліджуваними групами. Цей вид пластичності, аналогічно до посттетанічної потенціації залежить від клітинних процесів, які відбуваються у пресинаптичній терміналі, проте

механізми цих двох видів пластичності суттєво розрізняються. Вважається, що пластичність, викликана парною стимуляцією, опосередкована дією кальцію, що залишається у пресинаптичному сайті після першого стимулу і спричиняє короткотривале підвищення ймовірності вивільнення нейромедіатора у відповідь на повторну стимуляцію [376]. Тетанічна стимуляція також призводить до накопичення кальцію в пресинаптичній терміналі, але на відміну від парної стимуляції, тетанічна стимуляція викликає тривале підвищення постсинаптичної відповіді (кілька хвилин). Було показано, що часовий хід посттетанічної потенціації триває довше, ніж зниження концентрації кальцію до базового рівня у пресинаптичній терміналі, що вказує на залучення інших механізмів в індукцію цього явища, таких як, наприклад, активація пресинаптичних ферментів протеїнкінази C і Ca^{2+} / кальмодулін-залежної протеїнкінази II [428]. Ми припускаємо, що розбіжність в механізмах індукції синаптичної пластичності, викликаної парною стимуляцією, та пластичності, спричиненої високочастотною стимуляцією, є підґрунтям різниці в ефекті неонатальних судом на ці дві форми КТП.

Цікаво, що підвищення посттетанічних синаптичних відповідей в ФТ-групі порівняно з контролем залежало від базової активності нервової мережі. В наших дослідженнях підвищення базової нервової активності призводило до зниження потенціації ВПСР в обох досліджених синаптичних мережах, як в контрольній, так і ФТ-групі, що відповідає раніше отриманим даним на цих синапсах [429]. Відомо, що різноманітні нейромодулятори, що потрапляють у внутрішньомозкове середовище внаслідок підвищення нервової активності, можуть справляти істотний вплив на ефективність синаптичних відповідей. Так показано, що локальні ін'єкції дофаміну у прилегле ядро призводили до пригнічення низькочастотних синаптичних відповідей, і не впливали на високочастотні входи до цієї ділянки мозку [430]. Модуючі впливи дофаміну на синаптичну пластичність в нейронах ПФК також є залежними від

базової активності нейронних мереж [429]. Також встановлені інші нейромодулятори синаптичної пластичності в ПФК, такі як нейротрофіни, ацетилхолін, серотонін, та інші [431–433]. Враховуючи, велику кількість потенційних модулаторів, а також генералізовану природу ФТ-індукованих епілептичних нападів, здається малоймовірним, що тільки один з цих кандидатів-модулаторів може сприяти хронічному збільшенню ПТП в дослідженій ділянці мозку. Скоріше за все, комбінація різних модулюючих впливів призводить до змін у посттетанічеськой пластичності, описаних в нашій роботі.

Для індукції пластичності впродовж високочастотної стимуляції та посттетанічної потенціації в синапсах між нейронами шарів 2/3 та 5 мПФК та в межах шару 5 використовувався протокол високочастотної стимуляції в гамма діапазоні для імітації фізіологічно відповідної частоти осциляцій, що спостерігаються в мПФК під час фази затримки оперативної пам'яті. Широко поширена думка, що синхронізація популяцій нейронів в гамма діапазоні, що спостерігається на ЕЕГ у проміжок часу між презентацією «референсного» об'єкту і поведінковою реакцією є необхідною умовою для збереження інформації і вибору відповідної поведінкової реакції [424]. В наших дослідженнях неонатальні напади призводили до хронічних змін синаптичної відповіді впродовж високочастотної стимуляції в синапсах 2/3 → 5 та посттетанічної потенціації в синапсах 2/3 → 5 та 5 → 5 мПФК, що може вказувати на те, що подібні зміни можуть проявитися в природних умовах у відповідь на ендогенну нервову активність в діапазоні гамма частот. Описані зміни КТП можуть зумовлювати модифікації в обробці інформації та "онлайн" модуляцію відповідей нейронних ланцюгів, і бути передумовою поведінкових і когнітивних порушень [434–436] описаних у пацієнтів з історією повторюваних судом у ранньому віці, а також можуть лежати в основі змін поведінкової гнучкості [138] і ПФК-залежного компонента оперативної

пам'яті [138, 139] описаних з використанням ФТ моделі неонатальних судомних нападів раніше.

8.2. Вплив безсудомної епілептиформної активності, спричиненої ін'єкціями бікукуліну в префронтальну кору в період раннього розвитку, на синаптичну пластичність та поведінкові феномени.

У досліджах з використанням ФТ моделі неонатальних судом показано, що судомні напади в період раннього розвитку призводять до суттєвих змін короткотривалої пластичності в синапсах мПФК. Як було зазначено раніше, нейрони п'ятого шару мПФК отримують велику кількість проекцій з різних відділів ЦНС. Для дослідження питання чи є викликані судомною (генералізованою) ЕФА, зміни результатом змінених проекцій до мПФК, або змін у локальній мережевій активності в цій ділянці мозку була розроблена модель локалізованої в ПФК повторюваної ЕФА в період раннього розвитку.

Моделювання локальних повторюваної безсудомної ЕФА в період раннього розвитку в наших досліджах проводилося із застосуванням мікроін'єкцій бікукуліну, антагоніста ГАМК_A-рецепторів, в ПФК молодих щурів. З використанням цієї моделі показано що, зміни синаптичної пластичності відбуваються у тому ж напрямку, що і зміни продемонстровані з використанням моделі судомних нападів, викликаних ФТ. Збільшення пост тетанічної потенціації синаптичних відповідей в БК- групі в порівнянні з контрольною групою тварин було значним в мПФК обох півкуль, як іпсі-, так і контрлатерально до ін'єкції бікукуліну, що вказує на те, що хронічні зміни синаптичної пластичності, викликані високочастотною стимуляцією в мПФК є спровокованими ЕФА, а не обумовленими ін'єкцією бікукуліну.

Подібно до досліджень на ФТ-моделі, ми не спостерігали змін в амплітуді ВПСР, зареєстрованих в синапсах $2/3 \rightarrow 5$ та $5 \rightarrow 5$ мПФК в БК-

моделі, але на відміну від попередніх даних, отриманих в нашій лабораторії з використанням неонатальних судом викликаних ФТ, ми не спостерігали гістологічних змін в мПФК у тварин з історією безсудомної ЕФА, викликаній ін'єкціями БК [138].

Ефект локальної ЕФА на синаптичну пластичність, був більш вибіркоvim ніж ефект судомних нападів у ФТ-моделі: спостерігалось підвищення посттетанічної потенціації без змін пластичності впродовж тетанічної стимуляції та парної стимуляції. Як зазначалося в попередньому розділі, механізми індукції різних форм КТП значною мірою мають пресинаптичне походження, проте кожна форма КТП залежить від різних комбінацій пресинаптичних факторів. Той факт, що судомні напади призвели до змін посттетанічної потенціації і пластичності впродовж тетанічної стимуляції, без змін найкоротшої форми пластичності – фасилітації у відповідь на парну стимуляцію, а локальна ЕФА під час раннього розвитку спричинила зміни тільки найдовшої форми КТП - посттетанічної потенціації, припускає, що молекулярно-клітинні механізми, залучені в індукцію більш тривалих та складних форм синаптичної пластичності є більш сприйнятливими до нервових уражень.

З використанням моделі локальної повторюваної ЕФА в період раннього розвитку, викликаній ін'єкцією бікукуліну в мПФК, ми також досліджували вплив безсудомної активності на різноманітні поведінкові феномени: локомоторну активність, тривожність, вмотивованість, поведінкову гнучкість, оперативну пам'ять, увагу та соціальну поведінку.

В попередніх роботах показано, що тварини з історією неонатальних судомних нападів, викликаних інгаляцією ФТ, мають дефіцит у вирішенні тесту на поведінкову гнучкість в порівнянні з контролем [138]. З використанням моделі безсудомної ЕФА, викликаній локальною ін'єкцією бікукуліну в ПФК, ми не знайшли істотної міжгрупової різниці у поведінці

піддослідних тварин при виконанні цього тесту. Розбіжність між даними отриманими в представленій роботі і раніше опублікованими даними на ФТ моделі можуть бути обумовленими характером перенесених епілептичних нападів: у випадку ФТ моделі – генералізованих, а БК моделі – локальних, парціальних нападів; та обсягом, спричинених ними патофізіологічних змін у функції ПФК. Для перевірки цієї гіпотези у майбутньому необхідно використання інших підходів для вивчення впливів ЕФА в період раннього розвитку на механізми залучені у формування поведінкової гнучкості.

Під час виконання поведінкових тестів представлених в наших дослідженнях у тварин БК- групи спостерігався значний дефіцит уваги та соціальної поведінки без змін ПФК-залежного компонента оперативної пам'яті. Одним з можливих пояснень таких селективних змін може бути той факт, що ЕФА в дослідях на БК-моделі були парціальними, тобто охоплювали лише ПФК. Враховуючи той факт, що основними структурами залученими у механізми формування оперативної пам'яті є гіпокамп і ПФК [437], можна припустити, що неушкоджений гіпокамп в БК- моделі може компенсувати дефіцити функції ПФК. Контролюючим центром таких поведінкових реакцій, як увага й соціальна поведінка, вважається ПФК. Отже можна припустити, що ці форми поведінки є більш уразливими до ушкоджень ПФК. Збільшення кількості помилок при виконанні ЗНВП-тесту, як показник дефіциту уваги, використовувався у попередніх дослідях різних лабораторій [385, 386]. В цих дослідженнях була продемонстрована важлива роль холінергічної системи, норадреналінових, дофамінових і 5-НТ проекцій у контролі уваги. В наших дослідженнях найбільшу кількість помилок тварини БК-групи робили при виконанні початкової фази тесту, що свідчить про те, що, як тільки тварина активно брала участь у виконанні завдання, вона виконувала його до кінця. Така поведінка щурів під час виконання ЗНВП-тесту вказує більш на дефіцит уваги, ніж на дефіцит планування або мотивації. Зниження уваги у тварин з

історією безсудомної ЕФА під час раннього розвитку в наших дослідах підтверджується і візуальними спостереженнями: під час виконання тесту тварини БК-групи легше відволікалися, ніж контрольні тварини, незважаючи на тьмяне освітлення та звукоізоляцією експериментальної камери.

Одним з можливих інтерпретацій збільшення кількості помилок при виконанні ЗНВП-тесту може бути збільшення локомоторної активності, збудливості та/або тривожності тварин БК-групи. Для дослідження цієї гіпотези в наших експериментах використовували тест «відкрита арена». Під час виконання тесту «відкрита арена» ми не знайшли істотних відмінностей ні в загальній дистанції пройденої щурами, як показнику рівня локомоторної активності, ні в тривалості часу проведеного щурами в центральних квадрантах арени відносно часу проведеного на периметрі, як показнику тривожності, між щурами контрольної та БК-групи. На брак змін у активності тварин з історією локальної ЕФА під час раннього розвитку вказує і відсутність різниці у кількості перетинів центральної камери під час виконання тесту «перегородка» між досліджуваними групами. Ці дані вказують на те, що локальна безсудомна ЕФА під час раннього розвитку не впливає на локомоторну активність та тривожність щурів. Цікаво, що синдром дефіциту уваги (СДУГ) із переважанням неуважності найчастіше асоціюється з епілепсією і ЕФА, ніж СДУГ з переважанням гіперактивності й імпульсивності та комбінованим типом (СДУГ з гіперактивністю і неуважністю) [435, 438].

Іншим можливим поясненням помилок при виконанні ЗНВП-тесту може бути зміна мотивації у щурів БК-групи [439], проте обидві групи тварин були позбавлені їжі в однаковій мірі, а їх вага не розрізнялася під час виконання тесту.

В наших дослідженнях безсудомна ЕФА під час раннього розвитку призводила до значного дефіциту соціальної поведінки тварин під час

виконання тесту «перегородка». Хоча обидві групи досліджених тварини проводили більше часу поряд з новим щуром ніж об'єктом: відносний час, проведений поряд з щуром, порівняно з часом, проведеним з об'єктом, був значно меншим у щурів БК-групи ніж у контрольних щурів. Дефіцит соціального спілкування і взаємодії є основною особливістю розладів аутистичного спектру [440]. Зв'язок між епілептичними нападами та аутизмом добре відомий. Так приблизно одна третина людей з аутизмом мають встановлений діагноз епілепсії [440]. Діти з аутизмом та інтелектуальною інвалідністю, швидше за все, мають судоми, також приблизно одна третина дітей з діагнозом епілепсія мають розлади аутистичного спектру [440]. На сьогоднішній день неясно, викликають епілептичні судоми симптоми аутизму або аутизм і судоми мають однакові першопричини. Недавнє дослідження з використанням ФТ-моделі показало, що щури з історією повторюваних неонатальних судом мали дефіцит соціальної поведінки [441]. В своїй роботі Луго та колеги показали, що на відміну від контрольних тварин, миші ФТ-групи не віддавали перевагу взаємодії з незнайомою мишею над знайомою. В сукупності з даними наших дослідів, ці спостереження вказують на те, що ЕФА, викликана у щурів в ранній період розвитку, може призводити до значного дефіциту соціальної поведінки в подальшому житті.

Отже, з використанням нової моделі ЕФА, викликаній ін'єкцією БК в ПФК, наші дослідження показують, що повторювана ЕФА, локалізована в ПФК в ранній період розвитку, викликає хронічні дефіцити поведінкових реакцій та зміни синаптичної ефективності на рівні нервових мереж в мПФК. Як вже було зазначено вище, поведінкові розлади описані у тварин БК-групи співвідносяться з розладами у дітей з безсудомною ЕФА, що робить розроблену модель ефективним інструментом для подальших досліджень впливу локальної неонатальної ЕФА на функцію ЦНС. Оскільки розроблена модель відтворює ПФК-залежні поведінкові дефіцити, які часто

спостерігаються у пацієнтів з епілептичними синдромами, запропонована модель також може бути використана для з'ясування клітинних механізмів, що лежать в основі порушень уваги і соціальної поведінки. Подальше дослідження механізмів, що лежать в основі дисфункцій, описаних в наших дослідженнях, може призвести до нових терапевтичних підходів, спрямованих на поліпшення якості життя пацієнтів з історією безсудомної ЕФА в дитинстві та пов'язаних з нею супутніх психічних захворювань.

8.3. Роль протеазаактивованих рецепторів 1 в епілептогенезі, спровокованому епілептичним статусом

8.3.1. Ефекти блокування PAR1 на гістопатологічні зміни в зоні CA1 гіпокампа, спричинені епілептичним статусом

Значне збільшення рівня тромбіну в зоні CA1 гіпокампа спостерігалось через 48 годин після ЕС. Збільшення рівня тромбіну корелювало зі зниженням імунореактивності PAR1 в пірамідній зоні CA1 гіпокампа. Зниження імунореактивності PAR1 після ЕС може бути обумовленим різними причинами: 1) підвищенням активності PAR1, внаслідок підвищення рівня тромбіну в позаклітинному середовищі (відомо, що при активації PAR1 швидко інтерналізується в клітину та деградує [442]), 2) зниженням експресії PAR1 в нервових клітинах, 3) загибеллю нервових клітин, спричиненою ЕС. Вплив пошкоджень ЦНС різного генезу на динаміку рівня тромбіну та/або PAR1 був продемонстрований в багатьох дослідках. Так коротко- та довгострокове збільшення рівня тромбіну та активація PAR1 спостерігалися після гіпоксичноішемічних пошкоджень головного мозку, черепномозкових травм, запальних процесів, що спостерігалися в ЦНС [281, 290, 294, 331, 443]. Також відомо, що всі ці патологічні стани можуть

спровокувати розвиток хронічної епілепсії в подальшому житті. Однією з спільних рис цих патологій є порушення цілісності ГЕБ, яке, навіть за умов відсутності кровотечі, може спричинити надходження високомолекулярних білків крові, таких як альбумін або глобуліни, у мозок. В попередніх дослідках на експериментальній моделі скроневої епілепсії значне порушення ГЕБ спостерігалось протягом перших кількох діб після ЕС, спровокованого внутрішньочеревинною ін'єкцією пілокарпіну [389]. Також значний рівень імуноглобулінів IgG спостерігався у мозковій тканині, щонайменше, через 60 діб після ЕС, що вказує на хронічний характер порушення функції ГЕБ у пілокарпіновій моделі скроневої епілепсії [389]. Ці дані разом з дослідженнями на тваринах, де ЕС був спровокований ін'єкцією каїнової кислоти або електричною стимуляцією, а також клінічні дослідження у пацієнтів з епілепсією вказують на те, що дисфункція ГЕБ є загальною патологією, що спостерігається після ЕС [270, 439]. Іншим джерелом збільшення тромбіну після пошкодження головного мозку може бути підвищення перетворення тромбіну з протромбіну у головного мозку [281, 445, 446]. У своєму дослідженні Вайнштейн та його колеги показали, що РНК протромбіну було виявлено у товщі пірамідного шару CA1 [283]. У нашому дослідженні рівномірне збільшення рівня тромбіну в зоні CA1 спостерігали після ЕС, що може свідчити про те, що основним джерелом збільшення рівня тромбіну у внутрішньомозковому середовищі є його потрапляння з крові внаслідок порушення функції ГЕБ.

Як зазначалось раніше, літій-пілокарпінова модель є класичною моделлю скроневої епілепсії зі склерозом гіпокампа. В наших дослідках спостерігалася значна загибель нейронів пірамідної зони CA1 через 48 годин після ЕС. Повторювані ін'єкції блокатора PAR1 призводили до суттєвого зниження спровокованої ЕС загибелі клітин. Роль тромбіну в якості важливого модулятора життєздатності клітин була встановлена для центральних та

периферичних нейронів на різноманітних *in vivo* та *in vitro* моделях патології ЦНС [291, 447–451]. Відомо, що тромбін в низьких концентраціях має нейропротекторну дію, і, навпаки, великий рівень тромбіну спричиняє нейродегенерацію [452]. Цікаво, що в умовах стресу тромбін може викликати загибель клітин навіть у низьких концентраціях [453, 454]. Механізм дії тромбіну в нервовій тканині значною мірою опосередкований протеолітичною активацією основного рецептора тромбіну в головному мозку, PAR1. Попередні дослідження на моделях травми головного мозку та гіпоксично-ішемічних уражень, показують, що за умов відсутності PAR1 у нокаутних тварин або фармакологічної блокади PAR1 спостерігається підвищення стійкості нервових клітин до впливу несприятливих чинників [290, 292, 294, 331]. Наскільки нам відомо, наше дослідження є першим, що показує нейропротекторну роль пригнічення PAR1 після епілептичного нападу.

8.3.2. Вплив інгібування PAR1 на виживаність тварин після епілептичного статусу

У нашому дослідженні значний рівень відтермінованої смертності (47,8 %) спостерігався протягом перших двох тижнів після ЕС, що відповідає даним, представленим у людей [390] і тварин [391, 455]. Повторювані ін'єкції інгібітора PAR1 впродовж перших 10 діб після ЕС призводили до значного підвищення рівня виживаності тварин (93,8 %). Аналогічні результати були отримані у недавніх дослідженнях, де делеція гену циклооксигенази-2 (COX-2) нейронів, інгібування простагландинових рецепторів EP2 і використання препаратів з протизапальними ефектами призводили до зниження відтермінованої смертності після ЕС [391, 455–457]. Ці дані вказують на залучення запальних процесів в механізми відтермінованої смертності після ЕС. Відомо, що PAR1 грають значну роль у

розвитку запальних процесів [458]. Також показано, що тромбін інтенсифікує експресію COX-2 і вивільнення простагландину E2, причому це опосередковується активацією PAR1 [459]. З урахуванням цих даних можна припустити, що ефект інгібування PAR1 щодо відтермінованої смертності тварин після ЕС можна щонайменше частково пояснити інгібуванням індукції та розвитку запалення.

8.3.3. Ефект антагоніста PAR1 на епілептиформну активність та спонтанні судоми після епілептичного статусу

Період між ЕС і появою першого спонтанного поведінкового нападу називають "латентним періодом". Проте, недавні дослідження з використанням безперервного ЕЕГ-моніторингу показали, що інтеріктальна активність і електрографічні напади можуть бути легко виявлені впродовж цього періоду [330, 394]. Також була встановлена кореляція між наявністю інтеріктальної активності невдовзі після ЕС і розвитком хронічної епілепсії [460]. Виходячи з цих спостережень, було висунуто припущення, що інтеріктальна активність, зареєстрована в період епілептогенезу може бути прогностичним маркером розвитку спонтанних епілептичних нападів у подальшому житті. В наших дослідженнях інтеріктальна активність і електрографічні напади були виявлені невдовзі після ЕС у всіх тварин в групі ЕС + розчинник. Поява електрографічної ЕФА добре корелювала з розвитком спонтанних поведінкових судом на хронічній стадії моделі. У групі ЕС + SCH спостерігалось значне зниження ймовірності запису ЕФА під час латентного періоду. Також, ми спостерігали значне зниження ймовірності виникнення поведінкових епілептичних нападів в цій групі в хронічній період після ЕС. Ці дані вказують на те, що PAR1 відіграють значну роль в епілептогенезі,

спровокованому ЕС, в літій-пілокарпіновій моделі скроневої епілепсії. Хоча наші дослідження імітують дослідження, що проводяться у пацієнтів з епілепсією, в яких ЕЕГ і спостереження за поведінкою осіб, що проходили антиепілептичне або антиепілептогенне лікування, проводиться з перервами, метод моніторингу, який використовувався в цьому дослідженні, ймовірно, виявляє лише частину нападів, що виникали у тварин. Також підхід, який використовувався для оцінки нападів під час хронічної стадії, не дозволяє аналізувати безсудомну форму ЕФА. Тому використання безперервного відео-ЕЕГ моніторингу, а також додаткові дослідження на інших моделях ЕС необхідні для подальшого з'ясування внеску PAR1 у розвиток спонтанних нападів після ЕС [461].

8.3.4. Ймовірні механізми впливів PAR1-опосередкованої сигналізації на епілептогенез

PAR1, найпоширеніші рецептори тромбіну в головному мозку, залучені у низьку молекулярних сигнальних шляхів, важливих для розвитку хронічної епілепсії. Витік тромбіну та іншого активатора PAR1 плазміну у внутрішньомозкове середовище внаслідок порушення цілісності ГЕБ під час ЕС може призвести до гострого та локального пошкодження, проте може впливати на хронічні процеси, такі як порушення обміну речовин, дисфункцію астроцитів, запалення, довготривалі зміни цілісності ГЕБ й активності нервової мережі (**Рис.8.1**)[17].

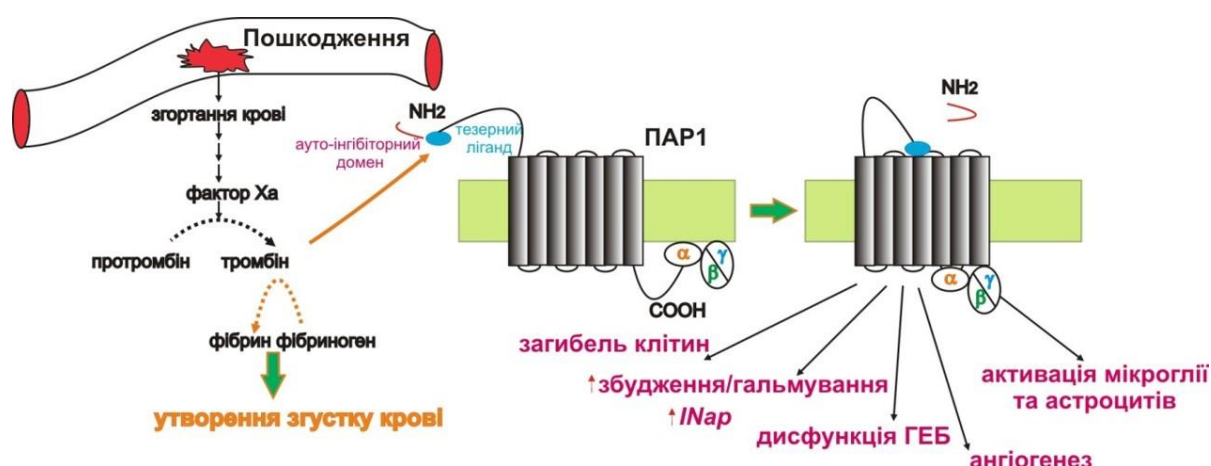


Рис. 8.1. Механізми впливів ПАР1-опосередкованої сигналізації при пошкодженні мозку

В нашій попередній роботі було показано, що активація ПАР1 може посилювати і навіть викликати напади через збільшення деполяризації мембрани шляхом активації постійних натрієвих струмів через активацію протеїн кінази С [18]. Також встановлено, що тромбін через активацію ПАР1 може викликати генерацію епілептичних нападів шляхом зменшення гальмівного і посилення збуджувального тону в нейронах гіпокампа [387]. Було показано, що ПАР1 активація під час транзійтної фокальної ішемії спричиняла загибель нейронів за рахунок посилення сигналізації через НМДА-рецептори [462]. Також встановлено, що активація ПАР1 призводила до збільшення концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} в нейронах, а також в глії [463], що може викликати нейродегенерацію. Результати численних досліджень показали, що активація ПАР1 ініціює сигнальні каскади Rhoa/Rho-кінази, протеїнкінази В і мітоген-активованої протеїнкінази (МАРК), у тому числі ERK1/2, С-Jun N-кінцевої кінази, p38, і p42/44 МАРК в нервових і гліальних клітинах в умовах *in vitro* та *in vivo* [278, 279]. Враховуючи, що активація цих шляхів спостерігалася у мозку пацієнтів з резистентною

формою епілепсії [464] і на різних моделях експериментального пошкодження головного мозку [465–470], ПАР1 активація в латентний період після ЕС, може стати спусковим гачком для цих сигнальних каскадів, принаймні впродовж раннього епілептогенезу. Зрештою, як було зазначено вище ПАР1 є важливими регуляторами запальних шляхів. Відомо, що пошкодження мозку різної етіології, що можуть спровокувати епілептогенез, часто супроводжуються запальними процесами [471]. Також клінічні спостереження і дані фундаментальних досліджень вказують на те, що запалення само по собі може викликати епілептогенні процеси [258]. Тому можна припустити, що активація ПАР1 невдовзі після ЕС може запускати ретроградну прозапальну сигналізацію, яка може сприяти молекулярним, структурним і синаптичним змінам, що характеризують епілептогенез [443, 458, 472, 473].

Отже, у нашому дослідженні вперше продемонстровано збільшення рівня тромбіну й зниження експресії ПАР1 невдовзі після ЕС. Інгібування ПАР1 призводило до зниження:

- i) смертності тварин;
- ii) загибелі нервових клітин, спровокованої ЕС;
- iii) ймовірності виникнення інтеріктальної і іктальної ЕФА і спонтанних судомних нападів.

Отримані дані значно розширюють наші уявленні про патологічні процеси залучені в епілептогенез, спровокований епілептичним статусом, та про участь тромбіну і ПАР1 в цих процесах. Як було зазначено вище, патологічне підвищення рівня тромбіну в мозку спостерігається після різноманітних пошкоджень мозку асоційованих із ризиком розвитку набутної епілепсії в подальшому житті. І хоча з'ясування клітинних механізмів залучених у отримані ефекти блокування ПАР1-залежної сигналізації потребує майбутніх більш детальних досліджень, ми припускаємо, що ПАР1

може стати привабливою мішенню для лікування набутої епілепсії після ушкоджень мозку різної етіології, пов'язаних з порушенням функції ГЕБ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведено детальний аналіз морфологічних та електрофізіологічних змін у головному мозку щурів та змін поведінкових феноменів у цих тварин, спричинених епілептиформною активністю (ЕФА). Встановлені деякі загальні закономірності і механізми пластичних змін синаптичної передачі, спровокованих дією ЕФА в період раннього розвитку; виявлені особливості модуляції збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі, показані тривалі зміни збудливості нервових мереж і синаптичної пластичності у щурів з наявністю ЕФА в неонатальний період. Досліджено вплив ЕФА, локалізованої в префронтальній корі (ПФК), на різні форми поведінки дорослих щурів. Вперше досліджено роль тромбіну і його молекулярних рецепторів (протеазаактивованих рецепторів типу 1 – PAR1), в епілептогенезі, спровокованому епілептичним статусом; встановлено ефекти інгібування цих рецепторів. За матеріалами дисертаційної роботи зроблено наступні висновки:

1) Неонатальні рекурентні судомні напади, спровоковані інгаляцією флуротилу, призводять до істотного зниження амплітуд гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС) у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа щурів; при цьому частота і кінетичні характеристики спонтанних ГПСС істотно не змінюються;

2) Рекурентні епілептичні напади, спровоковані в неонатальний період, не впливають на жоден з досліджуваних параметрів збуджувальних постсинаптичних струмів (ЗПСС) у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа, а саме амплітуду і частоту спонтанних ЗПСС, відношення амплітуд і частот АМПА- і НМДА-опосередкованих компонентів цих струмів та кінетику цих компонентів;

3) Неонатальні судомні напади не призводять до розвитку типової хронічної епілепсії, але зумовлюють хронічне зниження порогу виникнення ЕФА в соматосенсорній корі (ССК) дорослих щурів;

4) Епілептичні напади, спровоковані інгаляцією флуротилу в неонатальний період, призводять до значного зниження амплітуди спонтанних ГПСС і частоти відповідних мініатюрних струмів в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК, без змін амплітуди останніх струмів, що вказує на пресинаптичний характер змін гальмівної синаптичної передачі в цій зоні кори;

5) Неонатальні рекурентні епілептичні напади зумовлюють значні зміни амплітуди і частоти спонтанних ЗПСС в пірамідних нейронах шарів 2/3 ССК щурів. Збільшення частоти мініатюрних ЗПСС в цих нейронах, швидше за все, свідчить про пресинаптичну природу змін збуджувальної синаптичної передачі. Експерименти з аплікацією блокатора НМДА-рецепторів вказують на істотний внесок цих рецепторів у порушення функції збуджувальної синаптичної передачі в нейронах ССК щурів з історією неонатальних судомних нападів;

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

7) Неонатальні судомні напади зумовлюють хронічні зміни гальмівної синаптичної передачі в пірамідних нейронах шару 5 медіальної зони ПФК (мПФК). Спостерігається значне зниження частоти мініатюрних ГПСС в цих нейронах у тварин з наявністю епілептичних судом в неонатальний період (без змін амплітуди та кінетичних характеристик

мініатюрних ГПСС), що вказує на пресинаптичну природу впливу згаданого фактору на гальмівні синапси в досліджених нейронах. Повторювані судомні напади в період раннього розвитку не впливають на збуджувальну синаптичну передачу в досліджених нейронах мПФК;

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

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

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

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

12) Ін'єкції селективного антагоніста PAR1 впродовж перших десяти діб після індукції епілептичного статусу призводять до значного зниження смертності і захворюваності тварин, нормалізації експресії PAR1 в зоні CA1 гіпокампа, зменшення рівня загибелі клітин в цій зоні, пригнічення інтеріктальної та іктальної ЕФА в даній зоні гіпокампа впродовж перших двох тижнів після епілептичного статусу, а також зниження вірогідності розвитку спонтанних судомних нападів. Отримані дані дозволяють стверджувати, що зрушення в системі тромбін - PAR1 істотно задіяні в епілептогенез, зумовлений формуванням епілептичного статусу. Пригнічення активності PAR1 забезпечує нейропротекторний і антиепілептогенний ефекти, що вказує на те, що PAR1 може стати новою перспективною мішенню "антиепілептогенної" терапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Noebels J. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th edition / J. Noebels, M. Avoli, M. Rogawski, R. Olsen, A. Delgado-Escueta . - Oxford: Oxford Medical, 2012. - 1264p.
2. Hauser W. A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. / W. A. Hauser // *Epilepsia* - 1994. - 35, №2. - C.1–6.
3. Sidhu R. Pediatric Seizures / R. Sidhu, K. Velayudam, G. Barnes // *Pediatr. Rev.* - 2013. - 34, №8. - C.333–342.
4. Ronen G. M. Long-term prognosis in children with neonatal seizures: A population-based study / G. M. Ronen, D. Buckley, S. Penney, D. L. Streiner // *Neurology* - 2007. - 69. - C.1816–1822.
5. Wei S. Comorbidity of childhood epilepsy / S. Wei, W. Lee // *J Formos Med Assoc.* - 2015. - 114, №11. - C.1031–1038.
6. Sogawa Y. Cognitive outcomes in Children who present with a first unprovoked seizure / Y. Sogawa, D. Masur, C. O. Dell, S. L. Moshe, S. Shinnar // *Epilepsia* - 2011. - 51, №12. - C.2432–2439.
7. Bhise V. V. Baseline cognition, behavior, and motor skills in children with new-onset, idiopathic epilepsy. / V. V Bhise, G. D. Burack, D. E. Mandelbaum // *Dev. Med. Child Neurol.* - 2010. - 52, №1. - C.22–26.
8. Holmes G. L. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. / G. L. Holmes, J. L. Gairsa, N. Chevassus-Au-Louis, Y. Ben-Ari // *Ann. Neurol.* - 1998. - 44, №6. - C.845–857.
9. Lado F. A. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. / F. A. Lado, E. C. Laureta, S. L. Moshé // *Epileptic Disord.* - 2002. - 4, №2. - C.83–97.
10. Marsh R. Neuroimaging studies of normal brain development and their relevance for understanding childhood neuropsychiatric disorders. / R. Marsh, A. J. Gerber, B. S. Peterson // *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* - 2008.

- 47, №11. - C.1233–1251.
11. MacAllister W. S. Neuropsychological deficits in childhood epilepsy syndromes. / W. S. MacAllister, S. G. Schaffer // *Neuropsychol. Rev.* - 2007. - 17, №4. - C.427–444.
 12. Mares P. Models of epileptic seizures in immature rats / P. Mares // *Physiol. Res.* - 2012. - 61, №1. - C.103–108.
 13. Goldberg E. M. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. / E. M. Goldberg, D. a Coulter // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2013. - 14, №5. - C.337–349.
 14. Schoknecht K. The blood-brain barrier-gatekeeper to neuronal homeostasis: clinical implications in the setting of stroke. / K. Schoknecht, Y. David, U. Heinemann // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2015. - 38. - C.35–42.
 15. Gorter J. A. Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. / J. A. Gorter, E. A. van Vliet, E. Aronica // *Epilepsy Behav.* - 2015. - 49. - C.13–16.
 16. van Vliet E. A. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. / E. A. van Vliet, E. Aronica, J. A. Gorter // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2015. - 38. - C.26–34.
 17. Xi G. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? / G. Xi, G. Reiser, R. F. Keep // *J. Neurochem.* - 2003. - 84, №1. - C.3–9.
 18. Isaeva E. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. / E. Isaeva, A. Hernan, D. Isaev, G. L. Holmes // *Ann. Neurol.* - 2012. - 72, №2. - C.192–198.
 19. Turgeon V. L. Thrombin: a neuronal cell modulator. / V. L. Turgeon, N. Salman, L. J. Houenou // *Thromb. Res.* - 2000. - 99, №5. - C.417–427.
 20. Дьяченко Л. Поширеність епілепсії в Україні / Л. Дьяченко, О. Сергієнко, І. Степанова, О. Петриченко, Н. Кравченко, Ю. Офіцерова // *Український*

- вісник психоневрології - 2014. - 22, №4. - С.29–32.
21. Hauser W. A. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. / W. A. Hauser, J. F. Annegers, L. T. Kurland // *Epilepsia* - 1993. - 34, №3. - С.453–458.
 22. Isaeva E. V. Effects of isoflurane on hippocampal seizures at immature rats in vivo. / E. V Isaeva // *Fiziol. Zh.* - 2008. - 54, №5. - С.40–45.
 23. Isaeva E. V. Mechanism of antiseizure effect of isoflurane in the immature rat hippocampus. / E. V Isaeva // *Fiziol. Zh.* - 2009. - 55, №1. - С.57–60.
 24. Isaeva E. Effect of neuraminidase treatment on persistent epileptiform activity in the rat hippocampus. / E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova, G. Skibo, G. L. Holmes, D. Isaev // *Pharmacol. Rep.* - 2011. - 63, №3. - С.840–844.
 25. Hauser W. A. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. / W. A. Hauser, J. F. Annegers, L. T. Kurland // *Epilepsia* - 1996. - 34, №3. - С.453–468.
 26. Knickmeyer R. C. A structural MRI study of human brain development from birth to 2 years. / R. C. Knickmeyer, R. C. Knickmeyer, S. Gouttard, S. Gouttard, C. Kang, C. Kang, D. Evans, D. Evans, K. Wilber, K. Wilber, J. K. Smith, J. K. Smith, R. M. Hamer, R. M. Hamer, W. Lin, W. Lin, G. Gerig, G. Gerig, J. H. Gilmore, J. H. Gilmore // *J. Neurosci.* - 2008. - 28, №47. - С.12176–12182.
 27. Dekaban A. S. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. / A. S. Dekaban // *Ann. Neurol.* - 1978. - 4, №4. - С.345–356.
 28. Khazipov R. Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. / R. Khazipov, M. Esclapez, O. Caillard, C. Bernard, I. Khalilov, R. Tyzio, J. Hirsch, V. Dzhalala, B. Berger, Y. Ben-Ari // *J. Neurosci.* - 2001. - 21, №24. - С.9770–9781.
 29. Connors B. W. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro.

- / B. W. Connors, M. J. Gutnick, D. A. Prince // J. Neurophysiol. - 1982. - 48. - C.1302–1320.
30. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. / Y. Ben-Ari // Nat. Rev. Neurosci. - 2002. - 3, №9. - C.728–739.
 31. Gogtay N. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. / N. Gogtay, N. Gogtay, J. N. Giedd, J. N. Giedd, L. Lusk, L. Lusk, K. M. Hayashi, K. M. Hayashi, D. Greenstein, D. Greenstein, a C. Vaituzis, a C. Vaituzis, T. F. Nugent, T. F. Nugent, D. H. Herman, D. H. Herman, L. S. Clasen, L. S. Clasen, A. W. Toga, A. W. Toga, J. L. Rapoport, J. L. Rapoport, P. M. Thompson, P. M. Thompson // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2004. - 101, №21. - C.8174–8179.
 32. Giedd J. N. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. / J. N. Giedd, J. Blumenthal, N. O. Jeffries, F. X. Castellanos, H. Liu, A. Zijdenbos, T. Paus, A. C. Evans, J. L. Rapoport // Nat. Neurosci. - 1999. - 2, №10. - C.861–863.
 33. Paus T. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. / T. Paus, A. Zijdenbos, K. Worsley, D. L. Collins, J. Blumenthal, J. N. Giedd, J. L. Rapoport, A. C. Evans // Science - 1999. - 283, №5409. - C.1908–1911.
 34. Giedd J. N. Anatomical brain magnetic resonance imaging of typically developing children and adolescents. / J. N. Giedd, F. M. Lalonde, M. J. Celano, S. L. White, G. L. Wallace, N. R. Lee, R. K. Lenroot // J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry - 2009. - 48, №5. - C.465–470.
 35. Shaw P. Intellectual ability and cortical development in children and adolescents. / P. Shaw, D. Greenstein, J. Lerch, L. Clasen, R. Lenroot, N. Gogtay, A. Evans, J. Rapoport, J. Giedd // Nature - 2006. - 440, №7084. - C.676–679.
 36. Tremblay E. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the

- rat. I. Clinical, electrographic and metabolic observations. / E. Tremblay, L. Nitecka, M. L. Berger, Y. Ben-Ari // *Neuroscience* - 1984. - 13, №4. - C.1051–1072.
37. Moshé S. L. The effects of age on the kindling phenomenon. / S. L. Moshé // *Dev. Psychobiol.* - 1981. - 14, №1. - C.75–81.
 38. Jensen F. E. Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. / F. E. Jensen, C. D. Applegate, D. Holtzman, T. R. Belin, J. L. Burchfiel // *Ann. Neurol.* - 1991. - 29, №6. - C.629–637.
 39. Swann J. W. Penicillin-induced epileptogenesis in immature rat CA3 hippocampal pyramidal cells. / J. W. Swann, R. J. Brady // *Brain Res.* - 1984. - 314, №2. - C.243–254.
 40. Dzhala V. I. Transition from interictal to ictal activity in limbic networks in vitro. / V. I. Dzhala, K. J. Staley // *J. Neurosci.* - 2003. - 23, №21. - C.7873–7880.
 41. Flint A. C. NR2A subunit expression shortens NMDA receptor synaptic currents in developing neocortex. / A. C. Flint, U. S. Maisch, J. H. Weishaupt, A. R. Kriegstein, H. Monyer // *J. Neurosci.* - 1997. - 17, №7. - C.2469–2476.
 42. Legido A. Neurologic outcome after electroencephalographically proven neonatal seizures. / A. Legido, R. R. Clancy, P. H. Berman // *Pediatrics* - 1991. - 88, №3. - C.583–596.
 43. Scher M. S. Electrographic seizures in preterm and full-term neonates: clinical correlates, associated brain lesions, and risk for neurologic sequelae. / M. S. Scher, K. Aso, M. E. Beggarly, M. Y. Hamid, D. A. Steppe, M. J. Painter // *Pediatrics* - 1993. - 91, №1. - C.128–134.
 44. Brunquell P. J. Prediction of outcome based on clinical seizure type in newborn infants / P. J. Brunquell, C. M. Glennon, F. J. DiMario, T. Lerer, L. Eisenfeld // *J. Pediatr.* - 2002. - 140, №6. - C.707–712.
 45. Burton K. Co-morbidity of epilepsy in Tanzanian children: a community-

- based case-control study. / K. Burton, J. Rogathe, R. G. Whittaker, K. Mankad, E. Hunter, M. J. Burton, J. Todd, B. G. R. Neville, R. Walker, C. R. J. C. Newton // *Seizure* - 2012. - 21, №3. - C.169–174.
46. Rutter M. L. Psycho-social disorders in childhood, and their outcome in adult life. / M. L. Rutter // *J. R. Coll. Physicians Lond.* - 1970. - 4, №3. - C.211–218.
 47. Russ S. A. A national profile of childhood epilepsy and seizure disorder. / S. A. Russ, K. Larson, N. Halfon // *Pediatrics* - 2012. - 129, №2. - C.256–264.
 48. Davies S. A population survey of mental health problems in children with epilepsy. / S. Davies, I. Heyman, R. Goodman // *Dev. Med. Child Neurol.* - 2003. - 45, №5. - C.292–295.
 49. Oostrom K. J. Three to four years after diagnosis: cognition and behaviour in children with “epilepsy only”. A prospective, controlled study. / K. J. Oostrom, H. van Teeseling, A. Smeets-Schouten, A. C. B. Peters, A. Jennekens-Schinkel // *Brain* - 2005. - 128, №7. - C.1546–1555.
 50. Hermann B. P. Brain development in children with new onset epilepsy: A prospective controlled cohort investigation / B. P. Hermann, K. Dabbs, T. Becker, J. E. Jones, A. Myers Y Gutierrez, G. Wendt, M. A. Koehn, R. Sheth, M. Seidenberg // *Epilepsia* - 2010. - 51, №10. - C.2038–2046.
 51. Marín-Padilla M. Perinatal brain damage, cortical reorganization (acquired cortical dysplasias), and epilepsy. / M. Marín-Padilla // *Adv. Neurol.* - 2000. - 84. - C.153–172.
 52. Marín-Padilla M. Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage. III: Gray matter lesions of the neocortex / M. Marín-Padilla // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* - 1999. - 58, №5. - C.407–429.
 53. Marín-Padilla M. Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage. II: White matter lesions of the neocortex / M. Marín-Padilla // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* - 1997. - 56, №3. - C.219–235.
 54. Vannucci R. C. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. / R. C.

- Vannucci, S. J. Vannucci // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1997. - 835. - C.234–249.
55. van de Looij Y. Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain / Y. van de Looij, V. Ginet, A. Chatagner, A. Toulotte, E. Somm, P. S. Hüppi, S. V. Sizonenko // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* - 2014. - 1, №12. - C.955–967.
 56. Sheldon R. A. Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. / R. A. Sheldon, C. Sedik, D. M. Ferriero // *Brain Res.* - 1998. - 810, №1-2. - C.114–122.
 57. Rice J. E. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. / J. E. Rice, R. C. Vannucci, J. B. Brierley // *Ann. Neurol.* - 1981. - 9, №2. - C.131–141.
 58. Jensen F. E. NBQX blocks acute and late epileptogenic effects of perinatal hypoxia. / F. E. Jensen, H. Blume, S. Alvarado, I. Firkusny, C. Geary // *Epilepsia* - 1995. - 36, №10. - C.966–972.
 59. Jensen F. E. Acute and chronic increases in excitability in rat hippocampal slices after perinatal hypoxia *In vivo*. / F. E. Jensen, C. Wang, C. E. Stafstrom, Z. Liu, C. Geary, M. C. Stevens // *J. Neurophysiol.* - 1998. - 79, №1. - C.73–81.
 60. Jensen F. Profound, reversible energy loss in the hypoxic immature rat brain. / F. Jensen, M. Tsuji, M. Offutt, I. Firkusny, D. Holtzman // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1993. - 73, №1. - C.99–105.
 61. Sanchez R. M. Decreased glutamate receptor 2 expression and enhanced epileptogenesis in immature rat hippocampus after perinatal hypoxia-induced seizures. / R. M. Sanchez, S. Koh, C. Rio, C. Wang, E. D. Lamperti, D. Sharma, G. Corfas, F. E. Jensen // *J. Neurosci.* - 2001. - 21, №20. - C.8154–8163.
 62. Zhou C. Hypoxia-Induced Neonatal Seizures Diminish Silent Synapses and Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Neurons / C. Zhou, J. J.

- Lippman Bell, H. Sun, F. E. Jensen // *J. Neurosci.* - 2011. - 31, №50. - C.18211–18222.
63. Yang S.-N. Impaired SynGAP expression and long-term spatial learning and memory in hippocampal CA1 area from rats previously exposed to perinatal hypoxia-induced insults: beneficial effects of A68930. / S.-N. Yang, C.-B. Huang, C.-H. Yang, M.-C. Lai, W.-F. Chen, C.-L. Wang, C.-L. Wu, L.-T. Huang // *Neurosci. Lett.* - 2004. - 371, №1. - C.73–78.
 64. Jensen F. E. The putative essential nutrient pyrroloquinoline quinone is neuroprotective in a rodent model of hypoxic/ischemic brain injury. / F. E. Jensen, G. J. Gardner, A. P. Williams, P. M. Gallop, E. Aizenman, P. A. Rosenberg // *Neuroscience* - 1994. - 62, №2. - C.399–406.
 65. Williams P. A. Epilepsy and synaptic reorganization in a perinatal rat model of hypoxia-ischemia. / P. A. Williams, P. Dou, F. E. Dudek // *Epilepsia* - 2004. - 45, №10. - C.1210–1218.
 66. French J. a. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. / J. a French, P. D. Williamson, V. M. Thadani, T. M. Darcey, R. H. Mattson, S. S. Spencer, D. D. Spencer // *Ann. Neurol.* - 1993. - 34, №6. - C.774–780.
 67. Lewis D. V. Do prolonged febrile seizures produce medial temporal sclerosis? Hypotheses, MRI evidence and unanswered questions. / D. V Lewis, D. P. Barboriak, J. R. MacFall, J. M. Provenzale, T. V Mitchell, K. E. VanLandingham // *Prog. Brain Res.* - 2002. - 135. - C.263–278.
 68. Fernández G. Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. 1998. / G. Fernández, O. Effenberger, B. Vinz, O. Steinlein, C. E. Elger, W. Döhring, H. J. Heinze // *Neurology* - 2001. - 57, №11. - C.13–21.
 69. Dube C. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. / C. Dube, K. Chen, M. Eghbal-Ahmadi,

- K. Brunson, I. Soltesz, T. Z. Baram // *Ann. Neurol.* - 2000. - 47, №3. - C.336–344.
70. Toth Z. Seizure-induced neuronal injury: vulnerability to febrile seizures in an immature rat model. / Z. Toth, X. X. Yan, S. Haftoglou, C. E. Ribak, T. Z. Baram // *J. Neurosci.* - 1998. - 18, №11. - C.4285–4294.
 71. Scantlebury M. H. Febrile seizures in the predisposed brain: a new model of temporal lobe epilepsy. / M. H. Scantlebury, S. A. Gibbs, B. Foadjo, P. Lema, C. Psarropoulou, L. Carmant // *Ann. Neurol.* - 2005. - 58, №1. - C.41–49.
 72. Bender R. A. Mossy fiber plasticity and enhanced hippocampal excitability, without hippocampal cell loss or altered neurogenesis, in an animal model of prolonged febrile seizures / R. A. Bender, C. Dubé, R. Gonzalez-Vega, E. W. Mina, T. Z. Baram // *Hippocampus* - 2003. - 13, №3. - C.399–412.
 73. Bender R. A. Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. / R. A. Bender, C. Dubé, T. Z. Baram // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2004. - 548. - C.213–225.
 74. Bender R. A. Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus / R. A. Bender, A. Brewster, B. Santoro, A. Ludwig, F. Hofmann, M. Biel, T. Z. Baram // *Neuroscience* - 2001. - 106, №4. - C.689–698.
 75. Raspall-Chaure M. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review / M. Raspall-Chaure, R. F. Chin, B. G. Neville, R. C. Scott // *Lancet Neurol.* - 2006. - 5, №9. - C.769–779.
 76. Kelsey J. E. Perforant path stimulation in rats produces seizures, loss of hippocampal neurons, and a deficit in spatial mapping which are reduced by prior MK-801. / J. E. Kelsey, K. L. Sanderson, C. A. Frye // *Behav. Brain Res.* - 2000. - 107, №1-2. - C.59–69.
 77. Sloviter R. S. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of

- interneurons in experimental epilepsy. / R. S. Sloviter // *Science* - 1987. - 235, №4784. - C.73–76.
78. Sloviter R. S. “Epileptic” brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies / R. S. Sloviter // *Brain Res. Bull.* - 1983. - 10, №5. - C.675–697.
 79. Lothman E. W. Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus / E. W. Lothman, E. H. Bertram, J. Kapur, J. L. Stringer // *Epilepsy Res.* - 1990. - 6, №2. - C.110–118.
 80. McIntyre D. C. Status epilepticus following stimulation of a kindled hippocampal focus in intact and commissurotomized rats. / D. C. McIntyre, K. A. Stokes, N. Edson // *Exp. Neurol.* - 1986. - 94, №3. - C.554–570.
 81. Cross D. J. Synaptic reorganization in subiculum and CA3 after early-life status epilepticus in the kainic acid rat model / D. J. Cross, J. E. Cavazos // *Epilepsy Res.* - 2007. - 73, №2. - C.156–165.
 82. Lévesque M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy / M. Lévesque, M. Avoli // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2013. - 37, №10. - C.2887–2899.
 83. Covolan L. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. / L. Covolan, L. E. Mello // *Epilepsy Res.* - 2000. - 39, №2. - C.133–152.
 84. Vermoesen K. The control of kainic acid-induced status epilepticus / K. Vermoesen, I. Smolders, A. Massie, Y. Michotte, R. Clinckers // *Epilepsy Res.* - 2010. - 90, №1-2. - C.164–166.
 85. Curia G. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / G. Curia, D. Longo, G. Biagini, R. S. G. Jones, M. Avoli // *J. Neurosci. Methods* - 2008. - 172. - C.143–157.
 86. Morrisett R. A. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats.

- / R. A. Morrisett, R. S. Jope, O. C. Snead // *Exp. Neurol.* - 1987. - 97, №1. - C.193–200.
87. Jope R. S. Neurochemical consequences of status epilepticus induced in rats by coadministration of lithium and pilocarpine. / R. S. Jope, R. A. Morrisett // *Exp. Neurol.* - 1986. - 93, №2. - C.404–414.
 88. Todorovic M. S. Characterization of status epilepticus induced by two organophosphates in rats / M. S. Todorovic, M. L. Cowan, C. A. Balint, C. Sun, J. Kapur // *Epilepsy Res.* - 2012. - 101, №3. - C.268–276.
 89. Sperber E. F. Age-related differences in seizure susceptibility to flurothyl. / E. F. Sperber, S. L. Moshé // *Brain Res.* - 1988. - 467, №2. - C.295–297.
 90. Quilichini P. P. Persistent epileptiform activity induced by low Mg²⁺ in intact immature brain structures / P. P. Quilichini, D. Diabira, C. Chiron, H. Gozlan // - 2002. - 16. - C.850–860.
 91. Isaeva E. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus / E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova, G. Skibo, G. L. Holmes, D. Isaev // *Eur. J. Neurosci.* - 2010. - 32, №11. - C.1889–1896.
 92. Avoli M. Extracellular free potassium and calcium during synchronous activity induced by 4-aminopyridine in the juvenile rat hippocampus. / M. Avoli, J. Louvel, I. Kurcewicz, R. Pumain, M. Barbarosie // *J. Physiol.* - 1996. - 493, №3. - C.707–717.
 93. Khazipov R. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. / R. Khazipov, I. Khalilov, R. Tyzio, E. Morozova, Y. Ben-Ari, G. L. Holmes // *Eur. J. Neurosci.* - 2004. - 19, №3. - C.590–600.
 94. Traynelis S. F. Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. / S. F. Traynelis, R. Dingledine // *J. Neurophysiol.* - 1988. - 59, №1. - C.259–276.

95. Isaev D. Anticonvulsant action of GABA in the high potassium-low magnesium model of ictogenesis in the neonatal rat hippocampus in vivo and in vitro. / D. Isaev, E. Isaeva, R. Khazipov, G. L. Holmes // J. Neurophysiol. - 2005. - 94, №4. - C.2987–2992.
96. Campbell B. G. Characterization of penicillin- and bicuculine-induced epileptiform discharges during development of striate cortex in rabbits / B. G. Campbell, L. H. Ostrach, J. W. Crabtree, K. L. Chow // Dev. Brain Res. - 1984. - 15, №1. - C.125–128.
97. Savrasova A. V. The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus. / A. V Savrasova, I. V Lushnikova, E. V Isaeva, G. G. Skibo, D. S. Isaev, P. G. Kostyuk // Fiziol. Zh. - 2010. - 56, №4. - C.14–18.
98. Sombati S. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture. / S. Sombati, R. J. Delorenzo // J. Neurophysiol. - 1995. - 73, №4. - C.1706–1711.
99. Haut S. R. Susceptibility of immature and adult brains to seizure effects. / S. R. Haut, J. Velísková, S. L. Moshé // Lancet. Neurol. - 2004. - 3, №10. - C.608–617.
100. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. / Y. Ben-Ari // Neuroscience - 1985. - 14, №2. - C.375–403.
101. Represa A. From seizures to neo-synaptogenesis: intrinsic and extrinsic determinants of mossy fiber sprouting in the adult hippocampus. / A. Represa, J. Niquet, H. Pollard, M. Khrestchatisky, Y. Ben-Ari // Hippocampus - 1994. - 4, №3. - C.270–274.
102. Sutula T. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. / T. Sutula, X. X. He, J. Cavazos, G. Scott // Science - 1988. - 239, №4844. - C.1147–1150.

103. Esclapez M. Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. / M. Esclapez, J. C. Hirsch, Y. Ben-Ari, C. Bernard // J. Comp. Neurol. - 1999. - 408, №4. - C.449–460.
104. Epsztein J. Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. / J. Epsztein, A. Represa, I. Jorquera, Y. Ben-Ari, V. Crépel // J. Neurosci. - 2005. - 25, №36. - C.8229–8239.
105. Rice A. C. Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. / A. C. Rice, C. L. Floyd, B. G. Lyeth, R. J. Hamm, R. J. DeLorenzo // Epilepsia - 1998. - 39, №11. - C.1148–1157.
106. Stafstrom C. E. Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. / C. E. Stafstrom, A. Chronopoulos, S. Thurber, J. L. Thompson, G. L. Holmes // Epilepsia - 1993. - 34, №3. - C.420–432.
107. Berger M. L. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. III. Postnatal development of kainic acid binding sites in the limbic system. / M. L. Berger, E. Tremblay, L. Nitecka, Y. Ben-Ari // Neuroscience - 1984. - 13, №4. - C.1095–1104.
108. Sankar R. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. / R. Sankar, D. H. Shin, H. Liu, A. Mazarati, A. Pereira de Vasconcelos, C. G. Wasterlain // J. Neurosci. - 1998. - 18, №20. - C.8382–8393.
109. Nitecka L. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae. / L. Nitecka, E. Tremblay, G. Charton, J. P. Bouillot, M. L. Berger, Y. Ben-Ari // Neuroscience - 1984. - 13, №4. - C.1073–1094.
110. Sperber E. F. Resistance of the immature hippocampus to seizure-induced

- synaptic reorganization. / E. F. Sperber, K. Z. Haas, P. K. Stanton, S. L. Moshé // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1991. - 60, №1. - C.88–93.
111. Yang Y. Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development. / Y. Yang, P. Tandon, Z. Liu, M. R. Sarkisian, C. E. Stafstrom, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1998. - 107, №2. - C.169–177.
 112. Kubová H. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. / H. Kubová, R. Druga, K. Lukasiuk, L. Suchomelová, R. Haugvicová, I. Jirmanová, A. Pitkänen // *J. Neurosci.* - 2001. - 21, №10. - C.3593–3599.
 113. Cherubini E. Anoxia produces smaller changes in synaptic transmission, membrane potential, and input resistance in immature rat hippocampus. / E. Cherubini, Y. Ben-Ari, K. Krnjević // *J. Neurophysiol.* - 1989. - 62, №4. - C.882–895.
 114. Bickler P. E. Developmental changes in intracellular calcium regulation in rat cerebral cortex during hypoxia. / P. E. Bickler, S. M. Gallego, B. M. Hansen // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 1993. - 13, №5. - C.811–819.
 115. Liu Z. Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. / Z. Liu, C. E. Stafstrom, M. Sarkisian, P. Tandon, Y. Yang, A. Hori, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1996. - 97, №2. - C.178–184.
 116. Marks J. D. Vulnerability of CA1 neurons to glutamate is developmentally regulated. / J. D. Marks, J. E. Friedman, G. G. Haddad // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1996. - 97, №2. - C.194–206.
 117. Tandon P. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in seizures during development. / P. Tandon, Y. Yang, K. Das, G. L. Holmes, C. E. Stafstrom // *Neuroscience* - 1999. - 91, №1. - C.293–303.
 118. Rizzi M. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. / M. Rizzi, C.

- Perego, M. Aliprandi, C. Richichi, T. Ravizza, D. Colella, J. Velísková, S. L. Moshé, M. G. De Simoni, A. Vezzani // *Neurobiol. Dis.* - 2003. - 14, №3. - C.494–503.
119. Sankar R. GABA metabolism during status epilepticus in the developing rat brain. / R. Sankar, D. H. Shin, C. G. Wasterlain // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1997. - 98, №1. - C.60–64.
 120. Patel M. Age dependence of seizure-induced oxidative stress. / M. Patel, Q. Y. Li // *Neuroscience* - 2003. - 118, №2. - C.431–437.
 121. Sullivan P. G. Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. / P. G. Sullivan, C. Dubé, K. Dorenbos, O. Steward, T. Z. Baram // *Ann. Neurol.* - 2003. - 53, №6. - C.711–717.
 122. Stafstrom C. E. Kainic acid seizures in the developing brain: status epilepticus and spontaneous recurrent seizures. / C. E. Stafstrom, J. L. Thompson, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1992. - 65, №2. - C.227–236.
 123. Zhang G. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. / G. Zhang, Y. S. H. Raol, F.-C. Hsu, A. R. Brooks-Kayal // *J. Neurochem.* - 2004. - 88, №1. - C.91–101.
 124. Zhang G. Effects of status epilepticus on hippocampal GABAA receptors are age-dependent. / G. Zhang, Y. H. Raol, F.-C. C. Hsu, D. A. Coulter, A. R. Brooks-Kayal // *Neuroscience* - 2004. - 125, №2. - C.299–303.
 125. Brooks-Kayal A. R. Human neuronal gamma-aminobutyric acid(A) receptors: coordinated subunit mRNA expression and functional correlates in individual dentate granule cells. / A. R. Brooks-Kayal, M. D. Shumate, H. Jin, D. D. Lin, T. Y. Rikhter, K. L. Holloway, D. A. Coulter // *J. Neurosci.* - 1999. - 19, №19. - C.8312–8318.
 126. Coulter D. A. Chronic epileptogenic cellular alterations in the limbic system after status epilepticus. / D. A. Coulter // *Epilepsia* - 1999. - 40. - C.23–33.

127. Miller S. P. Seizure-associated brain injury in term newborns with perinatal asphyxia. / S. P. Miller, J. Weiss, A. Barnwell, D. M. Ferriero, B. Latal-Hajnal, A. Ferrer-Rogers, N. Newton, J. C. Partridge, D. V Glidden, D. B. Vigneron, A. J. Barkovich // *Neurology* - 2002. - 58, №4. - C.542–548.
128. Liu Z. Consequences of recurrent seizures during early brain development. / Z. Liu, Y. Yang, D. C. Silveira, M. R. Sarkisian, P. Tandon, L. T. Huang, C. E. Stafstrom, G. L. Holmes // *Neuroscience* - 1999. - 92, №4. - C.1443–1454.
129. Holmes G. L. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. / G. L. Holmes, M. Sarkisian, Y. Ben-Ari, N. Chevassus-Au-Louis // *J. Comp. Neurol.* - 1999. - 404, №4. - C.537–553.
130. Chang Y.-C. Febrile seizures impair memory and cAMP response-element binding protein activation. / Y.-C. Chang, A.-M. Huang, Y.-M. Kuo, S.-T. Wang, Y.-Y. Chang, C.-C. Huang // *Ann. Neurol.* - 2003. - 54, №6. - C.706–718.
131. Neill J. C. Recurrent seizures in immature rats: effect on auditory and visual discrimination. / J. C. Neill, Z. Liu, M. Sarkisian, P. Tandon, Y. Yang, C. E. Stafstrom, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1996. - 95, №2. - C.283–292.
132. McCabe B. K. Reduced neurogenesis after neonatal seizures. / B. K. McCabe, D. C. Silveira, M. R. Cilio, B. H. Cha, X. Liu, Y. Sogawa, G. L. Holmes // *J. Neurosci.* - 2001. - 21, №6. - C.2094–2103.
133. Riviello P. Lack of cell loss following recurrent neonatal seizures. / P. Riviello, I. de Rogalski Landrot, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 2002. - 135, №1-2. - C.101–104.
134. Ni H. Long-term effects of neonatal seizures on subsequent N-methyl-D-aspartate receptor-1 and gamma-aminobutyric acid receptor A-alpha 1 receptor expression in hippocampus of the Wistar rat. / H. Ni, Y.-W. Jiang, T. Bo, J.-M. Wang, H. Pan, X.-R. Wu // *Neurosci. Lett.* - 2004. - 368, №3. -

C.254–257.

135. Sogawa Y. Timing of cognitive deficits following neonatal seizures: relationship to histological changes in the hippocampus. / Y. Sogawa, M. Monokoshi, D. C. Silveira, B. H. Cha, M. R. Cilio, B. K. McCabe, X. Liu, Y. Hu, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 2001. - 131, №1-2. - C.73–83.
136. Huang L. Long-term effects of neonatal seizures: a behavioral, electrophysiological, and histological study. / L. Huang, M. R. Cilio, D. C. Silveira, B. K. McCabe, Y. Sogawa, C. E. Stafstrom, G. L. Holmes // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1999. - 118, №1-2. - C.99–107.
137. Karnam H. B. Early life seizures cause long-standing impairment of the hippocampal map. / H. B. Karnam, J.-L. Zhou, L.-T. Huang, Q. Zhao, T. Shatskikh, G. L. Holmes // *Exp. Neurol.* - 2009. - 217, №2. - C.378–387.
138. Kleen J. K. Early-life seizures produce lasting alterations in the structure and function of the prefrontal cortex. / J. K. Kleen, A. Sesqué, E. X. Wu, F. A. Miller, A. E. Hernan, G. L. Holmes, R. C. Scott // *Epilepsy Behav.* - 2011. - 22, №2. - C.214–219.
139. Kleen J. K. Enhanced oscillatory activity in the hippocampal-prefrontal network is related to short-term memory function after early-life seizures. / J. K. Kleen, E. X. Wu, G. L. Holmes, R. C. Scott, P.-P. Lenck-Santini // *J. Neurosci.* - 2011. - 31, №43. - C.15397–15406.
140. Banerjee P. N. The descriptive epidemiology of epilepsy-A review / P. N. Banerjee, D. Filippi, W. Allen Hauser // *Epilepsy Res.* - 2009. - 85. - C.31–45.
141. Haltiner A. M. Risk of seizure recurrence after the first late posttraumatic seizure / A. M. Haltiner, N. R. Temkin, S. S. Dikmen // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* - 1997. - 78. - C.835–840.
142. Curia G. Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? / G. Curia, C. Lucchi, J. Vinet, F. Gualtieri, C.

- Marinelli, a Torsello, L. Costantino, G. Biagini // *Curr. Med. Chem.* - 2014. - 21, №6. - C.663–688.
143. El-Hassar L. Hyperexcitability of the CA1 hippocampal region during epileptogenesis / L. El-Hassar, M. Esclapez, C. Bernard // *Epilepsia* - 2007. - 48, №SUPPL. 5. - C.131–139.
 144. Williams P. A. Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status epilepticus. / P. A. Williams, A. M. White, S. Clark, D. J. Ferraro, W. Swiercz, K. J. Staley, F. E. Dudek // *J. Neurosci.* - 2009. - 29. - C.2103–2112.
 145. Temkin N. R. Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: Meta-analysis of controlled trials / N. R. Temkin // *Epilepsia* - 2001. - 42. - C.515–524.
 146. Garga N. Posttraumatic Epilepsy: A Major Problem in Desperate Need of Major Advances / N. Garga, D. H. Lowenstein // *Epilepsy Curr.* - 2006. - 6. - C.1–5.
 147. Hauser W. A. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. / W. A. Hauser, J. F. Annegers, W. A. Rocca // *Mayo Clin. Proc.* - 1996. - 71. - C.576–586.
 148. VanLandingham K. E. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions / K. E. VanLandingham, E. R. Heinz, J. E. Cavazos, D. V. Lewis // *Ann. Neurol.* - 1998. - 43. - C.413–426.
 149. Téllez-Zenteno J. F. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy / J. F. Téllez-Zenteno, L. Hernández-Ronquillo // *Epilepsy Res. Treat.* - 2012. - 2012. - C.1–5.
 150. Arellano J. I. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. / J. I. Arellano, A. Muñoz, I. Ballesteros-Yáñez, R. G. Sola, J. DeFelipe // *Brain* - 2004. - 127, №Pt 1. - C.45–64.

151. Wieser H.-G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. / H.-G. Wieser // *Epilepsia* - 2004. - 45, №6. - C.695–714.
152. Tavakoli M. Cognitive impairments in patients with intractable temporal lobe epilepsy. / M. Tavakoli, M. Barekatain, H. T. N. Doust, H. Molavi, R. K. Nouri, A. Moradi, J. Mehvari, M. Zare // *J. Res. Med. Sci.* - 2011. - 16, №11. - C.1466–1472.
153. Rice A. C. Status Epilepticus Causes Long-Term NMDA Receptor-Dependent Behavioral Changes and Cognitive Deficits / A. C. Rice, C. L. Floyd, B. G. Lyeth, R. J. Hamm, R. J. DeLorenzo // *Epilepsia* - 1998. - 39, №11. - C.1148–1157.
154. Morimoto K. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. / K. Morimoto, M. Fahnstock, R. J. Racine // *Prog. Neurobiol.* - 2004. - 73, №1. - C.1–60.
155. Wieser H.-G. G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. / H.-G. G. Wieser, Epilepsy ILAE Commission on Neurosurgery // *Epilepsia* - 2004. - 45, №6. - C.695–714.
156. Yilmazer-Hanke D. M. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. / D. M. Yilmazer-Hanke, H. K. Wolf, J. Schramm, C. E. Elger, O. D. Wiestler, I. Blümcke // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* - 2000. - 59, №10. - C.907–920.
157. Bernasconi N. Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: A volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region / N. Bernasconi, A. Bernasconi, Z. Caramanos, S. B. Antel, F. Andermann, D. L. Arnold // *Brain* - 2003. - 126. - C.462–469.
158. Dreifuss S. Volumetric measurements of subcortical nuclei in patients with temporal lobe epilepsy. / S. Dreifuss, F. J. Vingerhoets, F. Lazeyras, S. G.

- Andino, L. Spinelli, J. Delavelle, M. Seeck // *Neurology* - 2001. - 57. - C.1636–1641.
159. DeCarli C. Extratemporal atrophy in patients with complex partial seizures of left temporal origin / C. DeCarli, J. Hatta, S. Fazilat, S. Fazilat, W. D. Gaillard, W. H. Theodore // *Ann. Neurol.* - 1998. - 43. - C.41–45.
 160. Wieser H.-G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. / H.-G. Wieser // *Epilepsia* - 2004. - 45, №6. - C.695–714.
 161. O'Dell C. M. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. / C. M. O'Dell, A. Das, G. Wallace, S. K. Ray, N. L. Banik // *J. Neurosci. Res.* - 2012. - 90, №5. - C.913–924.
 162. McNamara J. O. Kindling model of epilepsy. / J. O. McNamara // *Adv. Neurol.* - 1986. - 44. - C.303–318.
 163. McNamara J. O. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. / J. O. McNamara // *Ann. Neurol.* - 1984. - 16. - C.72–76.
 164. Bengzon J. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. / J. Bengzon, Z. Kokaia, E. Elmer, A. Nanobashvili, M. Kokaia, O. Lindvall // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1997. - 94, №19. - C.10432–10437.
 165. Bumanglag A. V. Minimal latency to hippocampal epileptogenesis and clinical epilepsy after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in awake rats / A. V. Bumanglag, R. S. Sloviter // *J. Comp. Neurol.* - 2008. - 510. - C.561–580.
 166. Kienzler F. Hippocampal injury, atrophy, synaptic reorganization, and epileptogenesis after perforant pathway stimulation-induced status epilepticus in the mouse / F. Kienzler, B. A. Norwood, R. S. Sloviter // *J. Comp. Neurol.* - 2009. - 515. - C.181–196.

167. Rao M. S. Hippocampal neurodegeneration, spontaneous seizures, and mossy fiber sprouting in the F344 rat model of temporal lobe epilepsy / M. S. Rao, B. Hattiangady, D. S. Reddy, A. K. Shetty // *J. Neurosci. Res.* - 2006. - 83. - C.1088–1105.
168. Mello L. E. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. / L. E. Mello, L. Covolan // *Epilepsy Res.* - 1996. - 26, №1. - C.123–129.
169. Yang T. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: Uncontrolled inflammation drives disease progression? / T. Yang, D. Zhou, H. Stefan // *J. Neurol. Sci.* - 2010. - 296. - C.1–6.
170. Gouder N. Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. / N. Gouder, L. Scheurer, J.-M. Fritschy, D. Boison // *J. Neurosci.* - 2004. - 24. - C.692–701.
171. Lee T. S. Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy / T. S. Lee, T. Eid, S. Mane, J. H. Kim, D. D. Spencer, O. P. Ottersen, N. C. de Lanerolle // *Acta Neuropathol.* - 2004. - 108. - C.493–502.
172. Eid T. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K⁺ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. / T. Eid, T.-S. W. Lee, M. J. Thomas, M. Amiry-Moghaddam, L. P. Bjørnsen, D. D. Spencer, P. Agre, O. P. Ottersen, N. C. de Lanerolle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2005. - 102. - C.1193–1198.
173. Aronica E. Upregulation of adenosine kinase in astrocytes in experimental and human temporal lobe epilepsy / E. Aronica, E. Zurolo, A. Iyer, M. De Groot, J. Anink, C. Carbonell, E. A. Van Vliet, J. C. Baayen, D. Boison, J. A. Gorter // *Epilepsia* - 2011. - 52. - C.1645–1655.
174. Strohschein S. Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus. / S. Strohschein, K. Hüttmann, S.

- Gabriel, D. K. Binder, U. Heinemann, C. Steinhäuser // *Glia* - 2011. - 59, №6. - C.973–980.
175. Kovács R. Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: role of astroglia. / R. Kovács, U. Heinemann, C. Steinhäuser // *Epilepsia* - 2012. - 53 Suppl 6. - C.53–59.
 176. Gorter J. A. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons / J. A. Gorter, E. A. Van Vliet, E. Aronica, F. H. Lopes da Silva // *Eur. J. Neurosci.* - 2001. - 13, №4. - C.657–669.
 177. Jankowsky J. L. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. / J. L. Jankowsky, P. H. Patterson // *Prog. Neurobiol.* - 2001. - 63. - C.125–149.
 178. Pitkänen A. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy / A. Pitkänen, T. P. Sutula // *Lancet Neurol.* - 2002. - 1. - C.173–181.
 179. Bae E.-K. Neuropathologic and clinical features of human medial temporal lobe epilepsy. / E.-K. Bae, K.-H. Jung, K. Chu, S.-T. Lee, J.-H. Kim, K.-I. Park, M. Kim, C.-K. Chung, S. K. Lee, J.-K. Roh // *J. Clin. Neurol.* - 2010. - 6. - C.73–80.
 180. Sharma A. K. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. / A. K. Sharma, R. Y. Reams, W. H. Jordan, M. A. Miller, H. L. Thacker, P. W. Snyder // *Toxicol. Pathol.* - 2007. - 35. - C.984–999.
 181. Ben-Ari Y. Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: there is a before and an after. / Y. Ben-Ari, F. E. Dudek // *Epilepsy Curr.* - 2010. - 10. - C.118–125.
 182. Temple S. Stem cells in the adult mammalian central nervous system. / S. Temple, A. Alvarez-Buylla // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 1999. - 9. - C.135–141.

183. Parent J. M. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke / J. M. Parent, Z. S. Vexler, C. Gong, N. Derugin, D. M. Ferriero // *Ann. Neurol.* - 2002. - 52. - C.802–813.
184. Eriksson P. S. Neurogenesis in the adult human hippocampus. / P. S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson, F. H. Gage // *Nat. Med.* - 1998. - 4. - C.1313–1317.
185. Thom M. Cell proliferation and granule cell dispersion in human hippocampal sclerosis / M. Thom, L. Martinian, G. Williams, K. Stoeber, S. M. Sisodiya // *J Neuropathol Exp Neurol* - 2005. - 64. - C.194–201.
186. Crespel A. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy / A. Crespel, V. Rigau, P. Coubes, M. C. Rousset, F. De Bock, H. Okano, M. Baldy-Moulinier, J. Bockaert, M. Lerner-Natoli // *Neurobiol. Dis.* - 2005. - 19. - C.436–450.
187. Blümcke I. Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy / I. Blümcke, J. C. Schewe, S. Normann, O. Brüstle, J. Schramm, C. E. Elger, O. D. Wiestler // *Hippocampus* - 2001. - 11. - C.311–321.
188. Madsen T. M. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy / T. M. Madsen, A. Treschow, J. Bengzon, T. G. Bolwig, O. Lindvall, A. Tingström // *Biol. Psychiatry* - 2000. - 47. - C.1043–1049.
189. Parent J. M. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. / J. M. Parent, T. W. Yu, R. T. Leibowitz, D. H. Geschwind, R. S. Sloviter, D. H. Lowenstein // *J. Neurosci.* - 1997. - 17, №10. - C.3727–3738.
190. Gray W. P. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. / W. P. Gray, L. E. Sundstrom // *Brain Res.* - 1998. - 790. - C.52–59.
191. Scharfman H. E. Granule-Like Neurons at the Hilar / CA3 Border after Status

- Epilepticus and Their Synchrony with Area CA3 Pyramidal Cells : Functional Implications of Seizure-Induced Neurogenesis / H. E. Scharfman, J. H. Goodman, A. L. Sollas // - 2000. - 20, №15. - C.6144–6158.
192. Pierce J. P. Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. / J. P. Pierce, J. Melton, M. Punsoni, D. P. McCloskey, H. E. Scharfman // Exp. Neurol. - 2005. - 196, №2. - C.316–331.
 193. Clapham D. E. Calcium signaling / D. E. Clapham // Cell - 1995. - 80, №2. - C.259–268.
 194. Berridge M. J. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. / M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2003. - 4, №7. - C.517–529.
 195. Gutierrez-merino C. Cytosolic Calcium Homeostasis in Neurons — Control Systems , Modulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species , and Space and Time Fluctuations / C. Gutierrez-merino, D. Marques-da-silva, S. Fortalezas, A. K. Samhan-arias // Neurochemistry - 2014. - book, №Dr. Thomas Heinbockel (Ed.). - C.1–52.
 196. Isaeva E. V. Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. / E. V Isaeva, V. M. Shkryl, N. Shirokova // J. Physiol. - 2005. - 565, №Pt 3. - C.855–872.
 197. Isaeva E. V. Metabolic regulation of Ca²⁺ release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres. / E. V Isaeva, N. Shirokova // J. Physiol. - 2003. - 547, №Pt 2. - C.453–462.
 198. Giorgi C. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. / C. Giorgi, A. Romagnoli, P. Pinton, R. Rizzuto // Curr. Mol. Med. - 2008. - 8, №2. - C.119–130.
 199. Demarex N. Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. / N. Demarex, C. Distelhorst // Science - 2003. - 300, №5616. - C.65–67.

200. Boison D. Adenosine dysfunction in epilepsy / D. Boison // *Glia* - 2012. - 60, №8. - C.1234–1243.
201. Bliss T. V. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. / T. V Bliss, G. L. Collingridge // *Nature* - 1993. - 361. - C.31–39.
202. Choi D. W. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. / D. W. Choi, S. M. Rothman // *Annu. Rev. Neurosci.* - 1990. - 13. - C.171–182.
203. Mody I. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. / I. Mody, J. F. MacDonald // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1995. - 16. - C.356–359.
204. Dingledine R. Excitatory amino acid receptors in epilepsy / R. Dingledine, C. J. McBain, J. O. McNamara // *Trends Pharmacol Sci* - 1990. - 11. - C.334–338.
205. Woodhall G. NR2B-containing NMDA autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. / G. Woodhall, D. I. Evans, M. O. Cunningham, R. S. Jones // *J. Neurophysiol.* - 2001. - 86. - C.1644–1651.
206. Petralia R. S. Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations / R. S. Petralia, Y. X. Wang, F. Hua, Z. Yi, A. Zhou, L. Ge, F. A. Stephenson, R. J. Wenthold // *Neuroscience* - 2010. - 167. - C.68–87.
207. Tovar K. R. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses / K. R. Tovar, G. L. Westbrook // *Neuron* - 2002. - 34. - C.255–264.
208. Yang J. Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. / J. Yang, G. L. Woodhall, R. S. G. Jones // *J. Neurosci.* - 2006. - 26, №2. - C.406–410.
209. Huo J. Z. Increase in tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor following the induction of status epilepticus / J. Z. Huo, C. M. Dykstra, J. W.

- Gurd // *Neurosci. Lett.* - 2006. - 401. - C.266–270.
210. Moussa R. C. Seizure activity results in increased tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor in the hippocampus. / R. C. Moussa, C. J. Ikeda-Douglas, V. Thakur, N. W. Milgram, J. W. Gurd // *Brain Res. Mol. Brain Res.* - 2001. - 95, №1-2. - C.36–47.
 211. Niimura M. Changes in phosphorylation of the NMDA receptor in the rat hippocampus induced by status epilepticus. / M. Niimura, R. Moussa, N. Bissoon, C. Ikeda-Douglas, N. W. Milgram, J. W. Gurd // *J. Neurochem.* - 2005. - 92, №6. - C.1377–1385.
 212. Wyneken U. Epilepsy-induced changes in signaling systems of human and rat postsynaptic densities / U. Wyneken, J. J. Marengo, S. Villanueva, D. Soto, R. Sandoval, E. D. Gundelfinger, F. Orrego // *Epilepsia* - 2003. - 44. - C.243–246.
 213. Mathern G. W. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy / G. W. Mathern, J. K. Pretorius, J. P. Leite, H. I. Kornblum, D. Mendoza, A. Lozada, E. H. Bertram // *Epilepsy Res.* - 1998. - 32. - C.154–171.
 214. Frasca A. Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity. / A. Frasca, M. Aalbers, F. Frigerio, F. Fiordaliso, M. Salio, M. Gobbi, A. Cagnotto, F. Gardoni, G. S. Battaglia, G. Hoogland, M. Di Luca, A. Vezzani // *Neurobiol. Dis.* - 2011. - 43, №2. - C.507–515.
 215. Chamberlain S. E. L. Pre- and post-synaptic functions of kainate receptors at glutamate and GABA synapses in the rat entorhinal cortex / S. E. L. Chamberlain, D. E. Jane, R. S. G. Jones // *Hippocampus* - 2012. - 22. - C.555–576.
 216. Li J. M. Aberrant glutamate receptor 5 expression in temporal lobe epilepsy lesions / J. M. Li, Y. J. Zeng, F. Peng, L. Li, T. H. Yang, Z. Hong, D. Lei, Z.

- Chen, D. Zhou // *Brain Res.* - 2010. - 1311. - C.166–174.
217. Marchetti C. South African plants used in traditional medicine to treat epilepsy have an antagonistic effect on NMDA receptor currents / C. Marchetti, P. Gavazzo, G. I. Stafford, J. Van Staden // *J. Ethnopharmacol.* - 2011. - 137. - C.382–388.
 218. Fritschy J. M. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. / J. M. Fritschy, T. Kiener, V. Bouillere, F. Loup // *Neurochem. Int.* - 1999. - 34. - C.435–445.
 219. Galanopoulou A. S. Developmental patterns in the regulation of chloride homeostasis and GABA(A) receptor signaling by seizures. / A. S. Galanopoulou // *Epilepsia* - 2007. - 48 Suppl 5. - C.14–18.
 220. Ben-Ari Y. The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. / Y. Ben-Ari, G. L. Holmes // *Curr. Opin. Neurol.* - 2005. - 18. - C.141–145.
 221. Li X. Long-term expressional changes of Na⁺-K⁺-Cl⁻ co-transporter 1 (NKCC1) and K⁺-Cl⁻ co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE) / X. Li, J. Zhou, Z. Chen, S. Chen, F. Zhu, L. Zhou // *Brain Res.* - 2008. - 1221. - C.141–146.
 222. Huberfeld G. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. / G. Huberfeld, L. Wittner, S. Clemenceau, M. Baulac, K. Kaila, R. Miles, C. Rivera // *J. Neurosci.* - 2007. - 27. - C.9866–9873.
 223. Palma E. Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. / E. Palma, M. Amici, F. Sobrero, G. Spinelli, S. Di Angelantonio, D. Ragozzino, A. Mascia, C. Scoppetta, V. Esposito, R. Miledi, F. Eusebi // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2006. - 103, №22. - C.8465–8468.

224. Okabe A. Changes in chloride homeostasis-regulating gene expressions in the rat hippocampus following amygdala kindling / A. Okabe, M. Yokokura, H. Toyoda, C. Shimizu-Okabe, K. Ohno, K. Sato, A. Fukuda // *Brain Res.* - 2003. - 990. - C.221–226.
225. Okabe A. Amygdala kindling induces upregulation of mRNA for NKCC1, a Na⁺, K⁺-2Cl⁻ cotransporter, in the rat piriform cortex / A. Okabe, K. Ohno, H. Toyoda, M. Yokokura, K. Sato, A. Fukuda // *Neurosci. Res.* - 2002. - 44. - C.225–229.
226. Brandt C. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. / C. Brandt, M. Nozadze, N. Heuchert, M. Rattka, W. Löscher // *J. Neurosci.* - 2010. - 30. - C.8602–8612.
227. Bozzi Y. The role of dopamine signaling in epileptogenesis / Y. Bozzi, E. Borrelli // *Front. Cell. Neurosci.* - 2013. - 7. - C.157.
228. Oliveira M. S. Altered expression and function of small-conductance (SK) Ca(2+)-activated K⁺ channels in pilocarpine-treated epileptic rats. / M. S. Oliveira, F. Skinner, M. F. Arshadmansab, I. Garcia, C. F. Mello, H.-G. Knaus, B. S. Ermolinsky, L. F. P. Otalora, E. R. Garrido-Sanabria // *Brain Res.* - 2010. - 1348. - C.187–199.
229. Васильєв Д. В., Ісаєва О. В., Федулова С. А. В. М. С. Пресинаптична модуляція блокаторами калієвих каналів гальмівної синаптичної передачі в нейронах гіпокампа щурів / В. М. С. Васильєв Д. В., Ісаєва О. В., Федулова С. А. // *Нейрофізіологія* - 1998. - 30, №4/5. - С.336–340.
230. Cooper D. C. Output-mode transitions are controlled by prolonged inactivation of sodium channels in pyramidal neurons of subiculum / D. C. Cooper, S. Chung, N. Spruston // *PLoS Biol.* - 2005. - 3. - C.1123–1129.
231. Vreugdenhil M. Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy. / M. Vreugdenhil, G. Hoogland, C. W.

- M. van Veelen, W. J. Wadman // *Eur. J. Neurosci.* - 2004. - 19, №10. - C.2769–2778.
232. Whitaker W. R. J. Changes in the mRNAs encoding voltage-gated sodium channel types II and III in human epileptic hippocampus / W. R. J. Whitaker, R. L. M. Faull, M. Dragunow, E. W. Mee, P. C. Emson, J. J. Clare // *Neuroscience* - 2001. - 106. - C.275–285.
 233. Klein J. P. Dysregulation of sodium channel expression in cortical neurons in a rodent model of absence epilepsy / J. P. Klein, D. S. Khera, H. Nersesyan, E. Y. Kimchi, S. G. Waxman, H. Blumenfeld // *Brain Res.* - 2004. - 1000. - C.102–109.
 234. Aronica E. Induction of neonatal sodium channel II and III alpha-isoform mRNAs in neurons and microglia after status epilepticus in the rat hippocampus. / E. Aronica, B. Yankaya, D. Troost, E. A. van Vliet, F. H. Lopes da Silva, J. A. Gorter // *Eur. J. Neurosci.* - 2001. - 13. - C.1261–1266.
 235. Candenas L. Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha and beta subunit mRNAs in human tissues. / L. Candenas, M. Seda, P. Noheda, H. Buschmann, C. G. Cintado, J. D. Martin, F. M. Pinto // *Eur. J. Pharmacol.* - 2006. - 541. - C.9–16.
 236. Hu W. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. / W. Hu, C. Tian, T. Li, M. Yang, H. Hou, Y. Shu // *Nat. Neurosci.* - 2009. - 12. - C.996–1002.
 237. Blumenfeld H. Role of hippocampal sodium channel Nav1.6 in kindling epileptogenesis / H. Blumenfeld, A. Lampert, J. P. Klein, J. Mission, M. C. Chen, M. Rivera, S. Dib-Hajj, A. R. Brennan, B. C. Hains, S. G. Waxman // *Epilepsia* - 2009. - 50. - C.44–55.
 238. Hargus N. J. Temporal lobe epilepsy induces intrinsic alterations in Na channel gating in layer II medial entorhinal cortex neurons / N. J. Hargus, E. C. Merrick, A. Nigam, C. L. Kalmar, A. R. Baheti, E. H. Bertram, M. K. Patel //

- Neurobiol. Dis. - 2011. - 41. - C.361–376.
239. Van Wart A. Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking nav1.6 sodium channels. / A. Van Wart, G. Matthews // J. Neurosci. - 2006. - 26. - C.7172–7180.
 240. Royeck M. Role of axonal NaV1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. / M. Royeck, M.-T. Horstmann, S. Remy, M. Reitze, Y. Yaari, H. Beck // J. Neurophysiol. - 2008. - 100. - C.2361–2380.
 241. Raman I. M. Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice / I. M. Raman, L. K. Sprunger, M. H. Meisler, B. P. Bean // Neuron - 1997. - 19. - C.881–891.
 242. Veeramah K. R. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP / K. R. Veeramah, J. E. O'Brien, M. H. Meisler, X. Cheng, S. D. Dib-Hajj, S. G. Waxman, D. Talwar, S. Girirajan, E. E. Eichler, L. L. Restifo, R. P. Erickson, M. F. Hammer // Am. J. Hum. Genet. - 2012. - 90. - C.502–510.
 243. Hargus N. J. Evidence for a role of Nav1.6 in facilitating increases in neuronal hyperexcitability during epileptogenesis. / N. J. Hargus, A. Nigam, E. H. Bertram, M. K. Patel // J. Neurophysiol. - 2013. - 110, №5. - C.1144–1157.
 244. Blumenfeld H. Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures / H. Blumenfeld // Epilepsia - 2005. - 46. - C.21–33.
 245. Talley E. M. Low-voltage-activated calcium channel subunit expression in a genetic model of absence epilepsy in the rat. / E. M. Talley, G. Solórzano, A. Depaulis, E. Perez-Reyes, D. A. Bayliss // Brain Res. Mol. Brain Res. - 2000. - 75. - C.159–165.
 246. Powell K. L. A Cav3.2 T-type calcium channel point mutation has splice-variant-specific effects on function and segregates with seizure expression in a polygenic rat model of absence epilepsy. / K. L. Powell, S. M. Cain, C. Ng,

- S. Sirdesai, L. S. David, M. Kyi, E. Garcia, J. R. Tyson, C. A. Reid, M. Bahlo, S. J. Foote, T. P. Snutch, T. J. O'Brien // *J. Neurosci.* - 2009. - 29, №2. - C.371–380.
247. Broicher T. Specific expression of low-voltage-activated calcium channel isoforms and splice variants in thalamic local circuit interneurons. / T. Broicher, T. Kanyshkova, P. Landgraf, V. Rankovic, P. Meuth, S. G. Meuth, H.-C. Pape, T. Budde // *Mol. Cell. Neurosci.* - 2007. - 36, №2. - C.132–145.
248. Hendriksen H. Changes in voltage-dependent calcium channel $\alpha 1$ -subunit mRNA levels in the kindling model of epileptogenesis. / H. Hendriksen, W. Kamphuis, F. H. Lopes da Silva // *Brain Res. Mol. Brain Res.* - 1997. - 50. - C.257–266.
249. Su H. Upregulation of a T-type Ca^{2+} channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. / H. Su, D. Sochivko, A. Becker, J. Chen, Y. Jiang, Y. Yaari, H. Beck // *J. Neurosci.* - 2002. - 22. - C.3645–3655.
250. Becker A. J. Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. / A. J. Becker, J. Pitsch, D. Sochivko, T. Opitz, M. Staniek, C.-C. Chen, K. P. Campbell, S. Schoch, Y. Yaari, H. Beck // *J. Neurosci.* - 2008. - 28. - C.13341–13353.
251. Faas G. C. Calcium currents in pyramidal CA1 neurons in vitro after kindling epileptogenesis in the hippocampus of the rat. / G. C. Faas, M. Vreugdenhil, W. J. Wadman // *Neuroscience* - 1996. - 75, №1. - C.57–67.
252. Rasmussen T. Focal seizures due to chronic localized encephalitis. / T. Rasmussen, J. Olszewski, D. Lloydsmith // *Neurology* - 1958. - 8, №6. - C.435–445.
253. Vincent A. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults / A. Vincent, C. G. Bien // *Lancet Neurol.* - 2008. - 7. - C.1074–1075.

254. Dalmau J. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies / J. Dalmau, A. J. Gleichman, E. G. Hughes, J. E. Rossi, X. Peng, M. Lai, S. K. Dessain, M. R. Rosenfeld, R. Balice-Gordon, D. R. Lynch // *Lancet Neurol.* - 2008. - 7. - C.1091–1098.
255. Bien C. G. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy / C. G. Bien, H. Urbach, J. Schramm, B. M. Soeder, A. J. Becker, R. Voltz, A. Vincent, C. E. Elger // *Neurology* - 2007. - 69. - C.1236–1244.
256. Vezzani A. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence, Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence / A. Vezzani, T. Granata // *Epilepsia* - 2005. - 46. - C.724–1743.
257. Choi J. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. / J. Choi, D. R. Nordli, T. D. Alden, A. DiPatri, L. Laux, K. Kelley, J. Rosenow, S. U. Schuele, V. Rajaram, S. Koh // *J. Neuroinflammation* - 2009. - 6. - C.38.
258. Vezzani A. The role of inflammation in epileptogenesis / A. Vezzani, A. Friedman, R. J. Dingledine // *Neuropharmacology* - 2013. - 69. - C.16–24.
259. Riazi K. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: Cytokines and brain excitability / K. Riazi, M. A. Galic, Q. J. Pittman // *Epilepsy Res.* - 2010. - 89. - C.34–42.
260. Dubé C. M. Fever, febrile seizures and epilepsy / C. M. Dubé, A. L. Brewster, C. Richichi, Q. Zha, T. Z. Baram // *Trends Neurosci.* - 2007. - 30. - C.490–496.
261. Van Vliet E. a. Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation. / E. a. Van Vliet, G. Forte, L. Holtman, J. C. G. den Burger, A. Sinjewel, H. E. de Vries, E. Aronica, J. a. Gorter // *Epilepsia* - 2012. - 53, №7. - C.1254–1263.
262. Jung K.-H. H. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures

- following pilocarpine-induced status epilepticus. / K.-H. H. Jung, K. Chu, S. T. S. K. S.-T. Lee, J. J.-M. M. Kim, D.-I. I. Sinn, J. J.-M. M. Kim, D.-K. K. Park, J.-J. J. Lee, S. U. Kim, M. Kim, S. T. S. K. S.-T. Lee, J.-K. K. Roh // *Neurobiol. Dis.* - 2006. - 23, №2. - C.237–246.
263. De Sarro G. Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice / G. De Sarro, E. Russo, G. Ferreri, B. Giuseppe, M. A. Flocco, E. D. Di Paola, A. De Sarro // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 2004. - 77. - C.761–766.
264. Samland H. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6 / H. Samland, S. Huitron-Resendiz, E. Masliah, J. Criado, S. J. Henriksen, I. L. Campbell // *J. Neurosci. Res.* - 2003. - 73. - C.176–187.
265. Albayrak S. Effect of transient focal ischemia on blood-brain barrier permeability in the rat: correlation to cell injury / S. Albayrak, Q. Zhao, B. K. Siesjö, M.-L. Smith // *Acta Neuropathol.* - 1997. - 94, №2. - C.158–163.
266. Chodobski A. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. / A. Chodobski, B. J. Zink, J. Szmydynger-Chodobska // *Transl. Stroke Res.* - 2011. - 2, №4. - C.492–516.
267. On N. H. Examination of blood-brain barrier (BBB) integrity in a mouse brain tumor model. / N. H. On, R. Mitchell, S. D. Savant, C. J. Bachmeier, G. M. Hatch, D. W. Miller // *J. Neurooncol.* - 2013. - 111, №2. - C.133–143.
268. Stolp H. B. Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. / H. B. Stolp, K. M. Dziegielewska // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* - 2009. - 35, №2. - C.132–146.
269. Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? / A. Friedman // *Epilepsia* - 2011. - 52 Suppl 8. - C.19–20.

270. Mihály A. Immunohistochemical localization of extravasated serum albumin in the hippocampus of human subjects with partial and generalized epilepsies and epileptiform convulsions. / A. Mihály, B. Bozóky // *Acta Neuropathol.* - 1984. - 65, №1. - C.25–34.
271. Oby E. The blood–brain barrier and epilepsy / E. Oby, D. Janigro // *Epilepsia* - 2006. - 47, №11. - C.1761–1774.
272. Lee K. R. Seizures induced by intracerebral injection of thrombin: a model of intracerebral hemorrhage. / K. R. Lee, I. Drury, E. Vitarbo, J. T. Hoff // *J. Neurosurg.* - 1997. - 87, №1. - C.73–78.
273. van Vliet E. a. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. / E. a van Vliet, S. da Costa Araújo, S. Redeker, R. van Schaik, E. Aronica, J. a Gorter // *Brain* - 2007. - 130, №Pt 2. - C.521–534.
274. Tomkins O. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex. / O. Tomkins, O. Friedman, S. Ivens, C. Reiffurth, S. Major, J. P. Dreier, U. Heinemann, A. Friedman // *Neurobiol. Dis.* - 2007. - 25, №2. - C.367–377.
275. Ivens S. TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis / S. Ivens, D. Kaufer, L. P. Flores, I. Bechmann, D. Zumsteg, O. Tomkins, E. Seiffert, U. Heinemann, A. Friedman // *Brain* - 2007. - 130. - C.535–547.
276. Oby E. The blood-brain barrier and epilepsy. / E. Oby, D. Janigro // *Epilepsia* - 2006. - 47, №11. - C.1761–1774.
277. Wunder A. Imaging blood-brain barrier dysfunction in animal disease models / A. Wunder, K. Schoknecht, D. B. Stanimirovic, O. Prager, Y. Chassidim // *Epilepsia* - 2012. - 53. - C.14–21.
278. Rohatgi T. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain. / T. Rohatgi, F. Sedehizade, K. G. Reymann, G. Reiser // *Neuroscientist*

- 2004. - 10, №6. - C.501–512.
279. Luo W. Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. / W. Luo, Y. Wang, G. Reiser // *Brain Res. Rev.* - 2007. - 56, №2. - C.331–345.
 280. Coughlin S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. / S. R. Coughlin // *Nature* - 2000. - 407, №6801. - C.258–264.
 281. Striggow F. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. / F. Striggow, M. Riek-Burchardt, a Kiesel, W. Schmidt, P. Henrich-Noack, J. Breder, M. Krug, K. G. Reymann, G. Reiser // *Eur. J. Neurosci.* - 2001. - 14, №4. - C.595–608.
 282. Niclou S. P. Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development and after nerve lesion. / S. P. Niclou, H. S. Suidan, A. Pavlik, R. Vejsada, D. Monard, F. Miescher-institut, C.- Basel // *Eur. J. Neurosci.* - 1998. - 10, №5. - C.1590–1607.
 283. Weinstein J. R. Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain: expression by mesencephalic dopaminergic neurons and codistribution with prothrombin mRNA. / J. R. Weinstein, S. J. Gold, D. D. Cunningham, C. M. Gall // *J. Neurosci.* - 1995. - 15, №4. - C.2906–2919.
 284. Ubl J. J. Co-existence of two types of $[Ca^{2+}]_i$ -inducing protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2) in rat astrocytes and C6 glioma cells. / J. J. Ubl, C. Vöhringer, G. Reiser // *Neuroscience* - 1998. - 86, №2. - C.597–609.
 285. Jiang Y. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance. / Y. Jiang, J. Wu, Y. Hua, R. F. Keep, J. Xiang, J. T. Hoff, G. Xi // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2002. - 22, №4. - C.404–410.
 286. Nishino A. May Contribute to the Pathophysiology of Central Nervous System Injury Thrombin / A. Nishino, M. Suzuki, H. Ohtani, O. Motohashi, K.

- Umezawa, H. Nagura // - 1993. - 10, №2. - C.167–179.
287. Festoff B. W. Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. / B. W. Festoff, I. V Smirnova, J. Ma, B. A. Citron // *Semin. Thromb. Hemost.* - 1996. - 22. - C.267–271.
 288. Pike C. J. Thrombin attenuates neuronal cell death and modulates astrocyte reactivity induced by beta-amyloid in vitro. / C. J. Pike, P. J. Vaughan, D. D. Cunningham, C. W. Cotman // *J. Neurochem.* - 1996. - 66. - C.1374–1382.
 289. Ishida Y. Upregulation of protease-activated receptor-1 in astrocytes in Parkinson disease: astrocyte-mediated neuroprotection through increased levels of glutathione peroxidase. / Y. Ishida, A. Nagai, S. Kobayashi, S. U. Kim // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* - 2006. - 65, №1. - C.66–77.
 290. Wang J. Role of protease-activated receptor-1 in brain injury after experimental global cerebral ischemia. / J. Wang, H. Jin, Y. Hua, R. F. Keep, G. Xi // *Stroke.* - 2012. - 43, №9. - C.2476–2482.
 291. Fujimoto S. Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. / S. Fujimoto, H. Katsuki, M. Ohnishi, M. Takagi, T. Kume, A. Akaike // *Neuroscience* - 2007. - 144, №2. - C.694–701.
 292. Junge C. E. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. / C. E. Junge, T. Sugawara, G. Mannaioni, S. Alagarsamy, P. J. Conn, D. J. Brat, P. H. Chan, S. F. Traynelis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2003. - 100, №22. - C.13019–13024.
 293. Olson E. E. PAR-1 deficiency protects against neuronal damage and neurologic deficits after unilateral cerebral hypoxia/ischemia. / E. E. Olson, P. Lyuboslavsky, S. F. Traynelis, R. J. McKeon // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* - 2004. - 24, №9. - C.964–971.
 294. Chen B. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal

- ischemia / B. Chen, B. Freidman, B. Freidman // J Neurosci. - 2012. - 32, №22. - C.7622–7631.
295. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Strasbourg, 18.03.1986. - C.48.
 296. Kolb B. Dissociation of the effects of lesions of the orbital or medial aspect of the prefrontal cortex of the rat with respect to activity. / B. Kolb // Behav. Biol. - 1974. - 10, №3. - C.329–343.
 297. Broersen L. M. The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms / L. M. Broersen, R. P. W. Heinsbroek, J. P. C. de Bruin, H. B. M. Uylings, B. Olivier // Brain Res. - 1995. - 674, №2. - C.221–229.
 298. Kolb B. Dissociation of the medial prefrontal, posterior parietal, and posterior temporal cortex for spatial navigation and recognition memory in the rat. / B. Kolb, K. Buhrmann, R. McDonald, R. J. Sutherland // Cereb. Cortex, №6. - C.664–680.
 299. De Bruin J. P. C. Role of the prefrontal cortex of the rat in learning and decision making: effects of transient inactivation / J. P. C. De Bruin, M. G. P. Feenstra, L. M. Broersen, M. Van Leeuwen, C. Arens, S. De Vries, R. N. J. M. a. Joosten // Prog. Brain Res. - 2000. - 126. - C.103–113.
 300. Kolb B. Social behavior of rats with chronic prefrontal lesions. / B. Kolb // J. Comp. Physiol. Psychol. - 1974. - 87, №3. - C.466–474.
 301. Schoenbaum G. Changes in functional connectivity in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during learning and reversal training. / G. Schoenbaum, a a Chiba, M. Gallagher // J. Neurosci. - 2000. - 20, №13. - C.5179–5189.
 302. Gabbott P. L. A. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers / P. L. A. Gabbott, T. A. Warner, P. R. L. Jays, P. Salway, S. J. Busby // J. Comp. Neurol. - 2005. - 492, №2. - C.145–

- 177.
303. Hoover W. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat / W. Hoover, R. Vertes // *Brain Struct. Funct.* - 2007. - 212. - C.149–179.
 304. Kuroda M. Synaptic relationships between axon terminals from the mediodorsal thalamic nucleus and γ -aminobutyric acidergic cortical cells in the prelimbic cortex of the rat / M. Kuroda, J. Yokofujita, S. Oda, J. L. Price // *J. Comp. Neurol.* - 2004. - 477, №2. - C.220–234.
 305. Kuroda M. Thalamocortical synapses between axons from the mediodorsal thalamic nucleus and pyramidal cells in the prelimbic cortex of the rat. / M. Kuroda, K. Murakami, K. Kishi, J. L. Price // *J. Comp. Neurol.* - 1995. - 356, №1. - C.143–151.
 306. Kritzer M. F. Intrinsic circuit organization of the major layers and sublayers of the dorsolateral prefrontal cortex in the rhesus monkey / M. F. Kritzer, P. S. Goldman-Rakic // *J. Comp. Neurol.* - 1995. - 359. - C.131–143.
 307. Pucak M. Patterns of intrinsic and associational circuitry in monkey prefrontal cortex / M. Pucak, J. Levitt // *J. Comp. Neurol.* - 1996. - 376. - C.614–630.
 308. Melchitzky D. S. Synaptic targets of pyramidal neurons providing intrinsic horizontal connections in monkey prefrontal cortex / D. S. Melchitzky, S. R. Sesack, M. L. Pucak, D. A. Lewis // *J. Comp. Neurol.* - 1998. - 390. - C.211–224.
 309. Sesack S. R. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin / S. R. Sesack, a. Y. Deutch, R. H. Roth, B. S. Bunney // *J. Comp. Neurol.* - 1989. - 290, №2. - C.213–242.
 310. Thomson A. M. Functional maps of neocortical local circuitry. / A. M. Thomson, C. Lamy // *Front. Neurosci.* - 2007. - 1. - C.19–42.
 311. Mercer A. Excitatory connections made by presynaptic cortico-cortical

- pyramidal cells in layer 6 of the neocortex / A. Mercer, D. C. West, O. T. Morris, S. Kirchhecker, J. E. Kerkhoff, A. M. Thomson // *Cereb. Cortex* - 2005. - 15. - C.1485–1496.
312. West D. C. Layer 6 cortico-thalamic pyramidal cells preferentially innervate interneurons and generate facilitating EPSPs / D. C. West, A. Mercer, S. Kirchhecker, O. T. Morris, A. M. Thomson // *Cereb. Cortex* - 2006. - 16. - C.200–211.
313. Hallman L. E. Dendritic morphology and axon collaterals of corticotectal, corticopontine, and callosal neurons in layer V of primary visual cortex of the hooded rat. / L. E. Hallman, B. R. Schofield, C. S. Lin // *J. Comp. Neurol.* - 1988. - 272. - C.149–160.
314. Kasper E. M. Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. I. Correlation among cell morphology, intrinsic electrophysiological properties, and axon targets / E. M. Kasper, A. U. Larkman, J. Lubke, C. Blakemore // *J. Comp. Neurol.* - 1994. - 339. - C.459–474.
315. Thomson A. M. Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. / A. M. Thomson, A. P. Bannister // *Neuroscience* - 1998. - 84, №3. - C.669–683.
316. Porter L. L. Synaptic connections of callosal projection neurons in the vibrissal region of mouse primary motor cortex: an electron microscopic/horseradish peroxidase study. / L. L. Porter, E. L. White // *J. Comp. Neurol.* - 1986. - 248, №4. - C.573–587.
317. Lund J. S. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: Golgi and immunocytochemical characteristics. / J. S. Lund, D. A. Lewis // *J. Comp. Neurol.* - 1993. - 328, №2. - C.282–312.
318. Isaeva E. Recurrent neonatal seizures result in long-term increases in neuronal network excitability in the rat neocortex / E. Isaeva, D. Isaev, A. Savrasova,

- R. Khazipov, G. L. Holmes // *Eur. J. Neurosci.* - 2010. - 31, №8. - C.1446–1455.
319. Hernan A. E. E. Altered short-term plasticity in the prefrontal cortex after early life seizures / A. E. E. Hernan, G. L. L. Holmes, D. Isaev, R. C. C. Scott, E. Isaeva // *Neurobiol. Dis.* - 2013. - 50, №1. - C.120–126.
 320. Isaeva E. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizures. / E. Isaeva, D. Isaev, R. Khazipov, G. L. Holmes // *Eur. J. Neurosci.* - 2006. - 23, №6. - C.1559–1566.
 321. Isaeva E. Long-term suppression of GABAergic activity by neonatal seizures in rat somatosensory cortex. / E. Isaeva, D. Isaev, R. Khazipov, G. L. Holmes // *Epilepsy Res.* - 2009. - 87, №2-3. - C.286–289.
 322. Hernan A. E. Focal epileptiform activity in the prefrontal cortex is associated with long-term attention and sociability deficits. / A. E. Hernan, A. Alexander, K. R. Jenks, J. Barry, P.-P. P. Lenck-Santini, E. Isaeva, G. L. Holmes, R. C. Scott // *Neurobiol. Dis.* - 2014. - 63. - C.25–34.
 323. Isaev D. Neuroaminidase reduces interictal spikes in a rat temporal lobe epilepsy model. / D. Isaev, Q. Zhao, J. K. Kleen, P. P. Lenck-Santini, D. Adstamongkonkul, E. Isaeva, G. L. Holmes // *Epilepsia* - 2011. - 52, №3. - C.12–15.
 324. Glien M. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. / M. Glien, C. Brandt, H. Potschka, H. Voigt, U. Ebert, W. Löscher // *Epilepsy Res.* - 2001. - 46, №2. - C.111–119.
 325. Clancy R. R. Occult neonatal seizures. / R. R. Clancy, A. Legido, D. Lewis // *Epilepsia* - 1988. - 29, №3. - C.256–261.
 326. Clancy R. R. The exact ictal and interictal duration of electroencephalographic neonatal seizures. / R. R. Clancy, A. Legido // *Epilepsia* - 1987. - 28, №5. - C.537–541.

327. Giorgi F. S. Effects of Status Epilepticus Early in Life on Susceptibility to Ischemic Injury in Adulthood / F. S. Giorgi, S. Malhotra, H. Hasson, J. Vel, D. M. Rosenbaum, S. L. Mosh // - 2005. - 46, №4. - C.490–498.
328. Avishai-Eliner S. Stressed-out, or in (utero)? / S. Avishai-Eliner, K. L. Brunson, C. A. Sandman, T. Z. Baram // Trends Neurosci. - 2002. - 25, №10. - C.518–524.
329. Racine R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. / R. J. Racine // Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. - 1972. - 32, №3. - C.281–294.
330. Salami P. Dynamics of interictal spikes and high-frequency oscillations during epileptogenesis in temporal lobe epilepsy. / P. Salami, M. Lévesque, R. Benini, C. Behr, J. Gotman, M. Avoli // Neurobiol. Dis. - 2014. - 67. - C.97–106.
331. Manaenko A. PAR-1 antagonist SCH79797 ameliorates apoptosis following surgical brain injury through inhibition of ASK1-JNK in rats. / A. Manaenko, X. Sun, C. H. Kim, J. Yan, Q. Ma, J. H. Zhang // Neurobiol. Dis. - 2013. - 50. - C.13–20.
332. Strande J. L. SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts. / J. L. Strande, A. Hsu, J. Su, X. Fu, G. J. Gross, J. E. Baker // Basic Res. Cardiol. - 2007. - 102, №4. - C.350–358.
333. Krogsgaard-Larsen P. Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds. / P. Krogsgaard-Larsen, G. A. Johnston // J. Neurochem. - 1978. - 30, №6. - C.1377–1382.
334. Isaeva E. Alteration of synaptic plasticity by neonatal seizures in rat somatosensory cortex / E. Isaeva, D. Isaev, G. L. Holmes // Epilepsy Res. - 2013. - 106, №1-2. - C.280–283.
335. Savotchenko A. Neuraminidase Inhibition Primes Short-term Depression and Suppresses Long-Term Potentiation of Synaptic Transmission in the Rat

- Hippocampus / A. Savotchenko, A. Romanov // Neural - 2015. - 908190. - C.1–23.
336. Fénelon K. Deficiency of Dgcr8, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. / K. Fénelon, J. Mukai, B. Xu, P.-K. Hsu, L. J. Drew, M. Karayiorgou, G. D. Fischbach, A. B. Macdermott, J. A. Gogos // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2011. - 108. - C.4447–4452.
 337. Diamond D. M. Characteristics of hippocampal primed burst potentiation in vitro and in the awake rat. / D. M. Diamond, T. V Dunwiddie, G. M. Rose // J. Neurosci. - 1988. - 8, №November. - C.4079–4088.
 338. Groc L. Spontaneous unitary synaptic activity in CA1 pyramidal neurons during early postnatal development: constant contribution of AMPA and NMDA receptors. / L. Groc, B. Gustafsson, E. Hanse // J. Neurosci. - 2002. - 22. - C.5552–5562.
 339. Mye C. I. O. The NMDA-to-AMPA ratio at synapses onto layer 2/3 pyramidal neurons is conserved across prefrontal and visual cortices. / C. I. O. Mye, K. Sugino, G. G. Turrigiano, S. B. Nelson // J. Neurophysiol. - 2003. - 90, №2. - C.771–779.
 340. Isaeva E. V. Anaesthetic and postanaesthetic effect of isoflurane on the multiple-unit activity of the immature rat hippocampus. / E. V Isaeva, D. S. Isaev // Fiziol. Zh. - 2011. - 57, №1. - C.17–20.
 341. Isaeva E. Anesthetic and postanesthetic effects of isoflurane on neuronal activity in the rat hippocampus / E. Isaeva, D. Isaev, G. L. Holmes // Neurophysiology - 2007. - 39, №4-5. - C.325–326.
 342. Isaev D. Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis / D. Isaev, I. Lushnikova, O. Lunko, O. Zapukhliak, O. Maximyuk, A. Romanov, G. G. G. Skibo, C. Tian, G. L. L. Holmes, E. Isaeva // Neurobiol. Dis. - 2015. - 78. - C.68–76.

343. Talnov A. N. Electrolyte therapy reduces spike-and-wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. / A. N. Talnov, E. Isaeva, A. V. Savotchenko, G. V. Dovgalets, J. G. Ochoa, G. L. Holmes, D. Isaev // *Epilepsy Behav.* - 2012. - 24, №4. - C.399–402.
344. Carola V. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice / V. Carola, F. D'Olimpio, E. Brunamonti, F. Mangia, P. Renzi // *Behav. Brain Res.* - 2002. - 134. - C.49–57.
345. Prut L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. / L. Prut, C. Belzung // *Eur. J. Pharmacol.* - 2003. - 463, №1-3. - C.3–33.
346. Freund T. F. Interneurons of the hippocampus. / T. F. Freund, G. Buzsáki // *Hippocampus* - 1996. - 6. - C.347–470.
347. Isaev D. Shunting and hyperpolarizing GABAergic inhibition in the high-potassium model of ictogenesis in the developing rat hippocampus / D. Isaev, E. Isaeva, R. Khazipov, G. L. Holmes // *Hippocampus* - 2007. - 17, №3. - C.210–219.
348. Rivera C. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. / C. Rivera, J. Voipio, J. A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma, K. Kaila // *Nature* - 1999. - 397. - C.251–255.
349. Ben-Ari Y. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. / Y. Ben-Ari, E. Cherubini, R. Corradetti, J. L. Gaiarsa // *J. Physiol.* - 1989. - 416. - C.303–325.
350. Isaac J. T. R. Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP / J. T. R. Isaac, R. A. Nicoll, R. C. Malenka // *Neuron* - 1995. - 15. - C.427–434.
351. Liao D. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced

- LTP in CA1 region of hippocampal slice. / D. Liao, N. A. Hessler, R. Malinow // *Nature* - 1995. - 375, №6530. - C.400–404.
352. Durand G. M. Long-term potentiation as a mechanism of functional synapse induction in the developing hippocampus / G. M. Durand, A. Konnerth // *J. Physiol. Paris* - 1996. - 90, №5-6. - C.313–315.
 353. Groc L. In vivo evidence for an activity-independent maturation of AMPA/NMDA signaling in the developing hippocampus / L. Groc, B. Gustafsson, E. Hanse // *Neuroscience* - 2003. - 121, №1. - C.65–72.
 354. Carmignoto G. Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. / G. Carmignoto, S. Vicini // *Science* - 1992. - 258, №5084. - C.1007–1011.
 355. Hestrin S. Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. / S. Hestrin // *Nature* - 1992. - 357, №6380. - C.686–689.
 356. Monyer H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors / H. Monyer, N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann, P. H. Seeburg // *Neuron* - 1994. - 12, №3. - C.529–540.
 357. Marianowski R. N-Methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2C are overexpressed in the inferior colliculus of audiogenic mice. / R. Marianowski, H. Pollard, J. Moreau, G. Després, Y. Ben Ari, P. Tran Ba Huy, R. Romand // *Neurosci. Lett.* - 1995. - 189, №3. - C.190–194.
 358. Bo T. Long-term effects of seizures in neonatal rats on spatial learning ability and N-methyl-D-aspartate receptor expression in the brain / T. Bo, Y. Jiang, H. Cao, J. Wang, X. Wu // *Brain Res Dev Brain Res* - 2004. - 152. - C.137–142.
 359. Ko T. S. EEG and clinical predictors of medically intractable childhood epilepsy / T. S. Ko, G. L. Holmes // *Clin. Neurophysiol.* - 1999. - 110, №7. - C.1245–1251.

360. Huttenlocher P. R. A follow-up study of intractable seizures in childhood. / P. R. Huttenlocher, R. J. Hapke // *Ann. Neurol.* - 1990. - 28, №5. - C.699–705.
361. Wells J. E. GABAergic inhibition suppresses paroxysmal network activity in the neonatal rodent hippocampus and neocortex. / J. E. Wells, J. T. Porter, A. Agmon // *J. Neurosci.* - 2000. - 20. - C.8822–8830.
362. Abdelmalik P. A. Increased seizure susceptibility of the hippocampus compared with the neocortex of the immature mouse brain in vitro. / P. A. Abdelmalik, W. M. Burnham, P. L. Carlen // *Epilepsia* - 2005. - 46, №3. - C.356–366.
363. Ісаєв Д.С., Ісаєва О.В., Саврасова А.В. Х. Г. . Вплив неонатальних епілептичних нападів на активність нейронів неокортекса / Х. Г. . Ісаєв Д.С., Ісаєва О.В., Саврасова А.В. // *Нейрофізіологія* - 2001. - 43, №3. - C.258–260.
364. Rheims S. Layer-specific generation and propagation of seizures in slices of developing neocortex: role of excitatory GABAergic synapses. / S. Rheims, A. Represa, Y. Ben-Ari, Y. Zilberter // *J. Neurophysiol.* - 2008. - 100. - C.620–628.
365. Castro-Alamancos M. A. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. / M. A. Castro-Alamancos, J. P. Donoghue, B. W. Connors // *J. Neurosci.* - 1995. - 15, №July. - C.5324–5333.
366. Wigström H. Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition / H. Wigström, B. Gustafsson // *Nature* - 1983. - 301, №5901. - C.603–604.
367. Varela J. A. A Quantitative Description of Short-Term Plasticity at Excitatory Synapses in Layer 2/3 of Rat Primary Visual Cortex / J. A. Varela, K. Sen, J. Gibson, J. Fost, L. F. Abbott, S. B. Nelson // *J. Neurosci.* - 1997. - 17, №20. - C.7926–7940.

368. Galarreta M. Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. / M. Galarreta, S. Hestrin // *Nat. Neurosci.* - 1998. - 1. - C.587–594.
369. Abbott L. F. Synaptic Depression and Cortical Gain Control / L. F. Abbott, J. A. Varela, K. Sen, S. B. Nelson // *Science* (80-.). - 1997. - 275, №5297. - C.221–224.
370. Toga A. W. Mapping brain maturation / A. W. Toga, P. M. Thompson, E. R. Sowell // *Trends Neurosci.* - 2006. - 29, №3. - C.148–159.
371. Paus T. Mapping brain maturation and cognitive development during adolescence. / T. Paus, T. Paus // *Trends Cogn. Sci.* - 2005. - 9, №2. - C.60–68.
372. Bunge S. A. Neurodevelopmental changes in working memory and cognitive control / S. A. Bunge, S. B. Wright // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 2007. - 17, №2. - C.243–250.
373. Jernigan T. L. Maturation of human cerebrum observed in vivo during adolescence. / T. L. Jernigan, D. A. Trauner, J. R. Hesselink, P. A. Tallal // *Brain* - 1991. - 114 (Pt 5. - C.2037–2049.
374. Fuster J. *The Prefrontal Cortex* / J. Fuster // - 2008. -
375. Kuroda M. An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. / M. Kuroda, J. Yokofujita, K. Murakami // *Prog. Neurobiol.* - 1998. - 54. - C.417–458.
376. Zucker R. S. Short-term synaptic plasticity / R. S. Zucker, W. G. Regehr // *Annu. Rev. Physiol.* - 2002. - 64. - C.355–405.
377. Hempel C. M. Multiple forms of short-term plasticity at excitatory synapses in rat medial prefrontal cortex. / C. M. Hempel, K. H. Hartman, X. J. Wang, G. G. Turrigiano, S. B. Nelson // *J. Neurophysiol.* - 2000. - 83. - C.3031–3041.
378. Schoch S. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. / S. Schoch, P. E. Castillo, T. Jo, K. Mukherjee, M.

- Geppert, Y. Wang, F. Schmitz, R. C. Malenka, T. C. Südhof // *Nature* - 2002. - 415. - C.321–326.
379. Sakane A. Rab3 GTPase-activating protein regulates synaptic transmission and plasticity through the inactivation of Rab3. / A. Sakane, S. Manabe, H. Ishizaki, M. Tanaka-Okamoto, E. Kiyokage, K. Toida, T. Yoshida, J. Miyoshi, H. Kamiya, Y. Takai, T. Sasaki // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2006. - 103. - C.10029–10034.
380. Ishizaki H. Role of rab GDP dissociation inhibitor alpha in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission. / H. Ishizaki, J. Miyoshi, H. Kamiya, A. Togawa, M. Tanaka, T. Sasaki, K. Endo, A. Mizoguchi, S. Ozawa, Y. Takai // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2000. - 97. - C.11587–11592.
381. Holmes G. L. Alterations in sociability and functional brain connectivity caused by early-life seizures are prevented by bumetanide. / G. L. Holmes, C. Tian, A. E. Hernan, S. Flynn, D. Camp, J. Barry // *Neurobiol. Dis.* - 2015. - 77. - C.204–219.
382. Gordon N. Acquired Aphasia in Childhood: the Landau-Kleffner Syndrome / N. Gordon // *Dev. Med. Child Neurol.* - 2010. - 32, №3. - C.270–274.
383. Gordon N. The Landau-Kleffner syndrome: Increased understanding / N. Gordon // *Brain Dev.* - 1997. - 19. - C.311–316.
384. Praline J. Outcome at Adulthood of the Continuous Spike-waves during Slow Sleep and Landau-Kleffner Syndromes / J. Praline, C. Hommet, M. A. Barthez, F. Brault, D. Perrier, G. Du Passage, B. Lucas, J. Bonnard, C. Billard, B. De Toffol, A. Autret // *Epilepsia* - 2003. - 44. - C.1434–1440.
385. Dalley J. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: Neural and neurochemical substrates / J. W. Dalley, R. N. Cardinal, T. W. Robbins // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2004. - 28. - C.771–784.
386. Risbrough V. Selective immunolesioning of the basal forebrain cholinergic neurons in rats: Effect on attention using the 5-choice serial reaction time task

- / V. Risbrough, B. Bontempi, F. Menzaghi // *Psychopharmacology (Berl)*. - 2002. - 164. - C.71–81.
387. Maggio N. Thrombin regulation of synaptic transmission: Implications for seizure onset / N. Maggio, C. Cavaliere, M. Papa, I. Blatt, J. Chapman, M. Segal // *Neurobiol. Dis.* - 2013. - 50. - C.171–178.
 388. Lakshmi Thirumangalakudi, Haripriya Vittal Rao and P. G. A. Involvement of PGE2 and PGDH but not COX-2 in thrombin- induced cortical neuron apoptosis / and P. G. A. Lakshmi Thirumangalakudi, Haripriya Vittal Rao // *Neurosci Lett.* - 2009. - 452, №2. - C.172–175.
 389. Nnode-Ekane X. E. Vascular changes in epilepsy: functional consequences and association with network plasticity in pilocarpine-induced experimental epilepsy. / X. E. Nnode-Ekane, N. Hayward, O. Gröhn, A. Pitkänen // *Neuroscience* - 2010. - 166, №1. - C.312–332.
 390. DeLorenzo R. J. Comparisons of the mortality and clinical presentations of status epilepticus in private practice community and university hospital settings in Richmond, Virginia. / R. J. DeLorenzo, B. Kirmani, L. S. Deshpande, V. Jakkampudi, A. R. Towne, E. Waterhouse, L. Garnett, V. Ramakrishnan // *Seizure* - 2009. - 18, №6. - C.405–411.
 391. Jiang J. Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. / J. Jiang, Y. Quan, T. Ganesh, W. a Pouliot, F. E. Dudek, R. Dingledine // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2013. - 110, №9. - C.3591–3596.
 392. Jamie R Levin, Geidy Serrano R. D. Reduction in delayed mortality and subtle improvement in retrograde memory performance in pilocarpine-treated mice with conditional neuronal deletion of cyclooxygenase-2 gene / R. D. Jamie R Levin, Geidy Serrano // *Epilepsia* - 2013. - 53, №8. - C.1411–1420.
 393. Staley K. J. Interictal spikes: harbingers or causes of epilepsy? / K. J. Staley, A. White, F. E. Dudek // *Neurosci. Lett.* - 2011. - 497, №3. - C.247–250.

394. Chauvière L. Changes in interictal spike features precede the onset of temporal lobe epilepsy. / L. Chauvière, T. Doublet, A. Ghestem, S. S. Siyoucef, F. Wendling, R. Huys, V. Jirsa, F. Bartolomei, C. Bernard // *Ann. Neurol.* - 2012. - 71, №6. - C.805–814.
395. Mazzuferi M. Rapid epileptogenesis in the mouse pilocarpine model: video-EEG, pharmacokinetic and histopathological characterization. / M. Mazzuferi, G. Kumar, C. Rospo, R. M. Kaminski // *Exp. Neurol.* - 2012. - 238, №2. - C.156–167.
396. López-Gallardo M. Spatial and temporal patterns of morphogenesis of hippocampal pyramidal cells: study in the early postnatal rat. / M. López-Gallardo, C. Prada // *Hippocampus* - 2001. - 11, №2. - C.118–131.
397. Takumi Y. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. / Y. Takumi, V. Ramírez-León, P. Laake, E. Rinvik, O. P. Ottersen // *Nat. Neurosci.* - 1999. - 2, №7. - C.618–624.
398. Steward O. Polyribosomes under developing spine synapses: growth specializations of dendrites at sites of synaptogenesis. / O. Steward, P. M. Falk // *J. Neurosci. Res.* - 1985. - 13, №1-2. - C.75–88.
399. Pokorny J. Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons / J. Pokorny, T. Yamamoto // *Brain Res. Bull.* - 1981. - 7, №2. - C.113–120.
400. Goodkin H. P. Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. / H. P. Goodkin, J.-L. Yeh, J. Kapur // *J. Neurosci.* - 2005. - 25. - C.5511–5520.
401. Blair R. E. Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABAA receptor endocytosis that contributes to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy. / R. E. Blair, S. Sombati, D. C. Lawrence, B. D. McCay, R. J. DeLorenzo // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2004. - 310. - C.871–880.

402. Whittington M. A. Erosion of inhibition contributes to the progression of low magnesium bursts in rat hippocampal slices. / M. A. Whittington, R. D. Traub, J. G. Jefferys // *J. Physiol.* - 1995. - 486 (Pt 3. - C.723–734.
403. Sanchez R. M. AMPA/kainate receptor-mediated downregulation of GABAergic synaptic transmission by calcineurin after seizures in the developing rat brain. / R. M. Sanchez, W. Dai, R. E. Levada, J. J. Lippman, F. E. Jensen // *J. Neurosci.* - 2005. - 25. - C.3442–3451.
404. Brooks-Kayal A. R. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. / A. R. Brooks-Kayal, M. D. Shumate, H. Jin, T. Y. Rikhter, D. A. Coulter // *Nat. Med.* - 1998. - 4. - C.1166–1172.
405. Chen K. Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. / K. Chen, T. Z. Baram, I. Soltesz // *Nat. Med.* - 1999. - 5. - C.888–894.
406. Khalilov I. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. / I. Khalilov, G. L. Holmes, Y. Ben-Ari // *Nat. Neurosci.* - 2003. - 6, №10. - C.1079–1085.
407. Cohen I. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro / I. Cohen, V. Navarro, S. Clemenceau, M. Baulac, R. Miles // *Science* (80-.). - 2002. - 298. - C.1418–1421.
408. Laurie D. J. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development / D. J. Laurie, W. Wisden, P. Seeburg // *J. Neurosci.* - 1992. - 12, №11. - C.4151–4172.
409. Isaac J. T. R. Silent synapses during development of thalamocortical inputs / J. T. R. Isaac, M. C. Crair, R. A. Nicoll, R. C. Malenka // *Neuron* - 1997. - 18, №2. - C.269–280.
410. Wu G. Maturation of a central glutamatergic synapse. / G. Wu, R. Malinow, H. T. Cline // *Science* - 1996. - 274, №5289. - C.972–976.

411. Friedman H. V. Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. / H. V Friedman, T. Bresler, C. C. Garner, N. E. Ziv // *Neuron* - 2000. - 27, №1. - C.57–69.
412. Walmsley B. Activity-dependent regulation of synaptic strength and neuronal excitability in central auditory pathways. / B. Walmsley, A. Berntson, R. N. Leao, R. E. W. Fyffe // *J. Physiol.* - 2006. - 572. - C.313–321.
413. Fedulova S. a. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons. / S. a Fedulova, D. V Vasilyev, E. V Isaeva, S. G. Romanyuk, N. S. Veselovsky // *Neuroscience* - 1999. - 92, №4. - C.1217–1230.
414. Espinosa F. NMDA receptor activation by spontaneous glutamatergic neurotransmission. / F. Espinosa, E. T. Kavalali // *J. Neurophysiol.* - 2009. - 101. - C.2290–2296.
415. Berretta N. Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex / N. Berretta, R. S. G. Jones // *Neuroscience* - 1996. - 75. - C.339–344.
416. Leinekugel X. Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. / X. Leinekugel, I. Medina, I. Khalilov, Y. Ben-Ari, R. Khazipov // *Neuron* - 1997. - 18, №2. - C.243–255.
417. Bender V. A. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. / V. A. Bender, K. J. Bender, D. J. Brasier, D. E. Feldman // *J. Neurosci.* - 2006. - 26. - C.4166–4177.
418. Matthies Jr. H. Differential effects of protein kinase inhibitors on pre-established long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vitro / H. Matthies Jr., T. Behnisch, H. Kase, H. Matthies, K. G. Reymann // *Neurosci Lett* - 1991. - 121. - C.259–262.
419. Malinow R. Persistent protein kinase activity underlying long-term

- potentiation. / R. Malinow, D. V Madison, R. W. Tsien // *Nature* - 1988. - 335. - C.820–824.
420. Hesse G. W. Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electroconvulsive seizures / G. W. Hesse, T. J. Teyler // *Nature* - 1976. - 264, №5586. - C.562–564.
421. Schubert M. Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus. / M. Schubert, H. Siegmund, H.-C. Pape, D. Albrecht // *Learn. Mem.* - 2005. - 12. - C.520–526.
422. Luthi A. Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation / A. Luthi, H. Van der Putten, F. M. Botteri, I. M. Mansuy, M. Meins, U. Frey, G. Sansig, C. Portet, M. Schmutz, M. Schroder, C. Nitsch, J. P. Laurent, D. Monard // *J Neurosci* - 1997. - 17. - C.4688–4699.
423. Zhou J. L. Impaired single cell firing and long-term potentiation parallels memory impairment following recurrent seizures / J. L. Zhou, T. N. Shatskikh, X. Liu, G. L. Holmes // *Eur. J. Neurosci.* - 2007. - 25, №12. - C.3667–3677.
424. Goldman-Rakic P. S. Cellular basis of working memory. / P. S. Goldman-Rakic // *Neuron* - 1995. - 14. - C.477–485.
425. Deng P. Y. The diverse functions of short-term plasticity components in synaptic computations / P. Y. Deng, V. a. Klyachko // *Commun. Integr. Biol.* - 2011. - 4, №5. - C.543–548.
426. Lynch M. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity / M. Lynch, U. Sayin, J. Bownds, S. Janumpalli, T. Sutula // *Eur. J. Neurosci.* - 2000. - 12, №7. - C.2252–2264.
427. Schimanski L. A. Selective modification of short-term hippocampal synaptic plasticity and impaired memory extinction in mice with a congenitally reduced hippocampal commissure. / L. A. Schimanski, D. Wahlsten, P. V Nguyen // *J. Neurosci.* - 2002. - 22, №18. - C.8277–8286.

428. Zucker R. S. Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity / R. S. Zucker // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 1999. - 9, №9. - C.305–313.
429. Young C. E. Dopamine D1-like receptor modulates layer- and frequency-specific short-term synaptic plasticity in rat prefrontal cortical neurons. / C. E. Young, C. R. Yang // *Eur. J. Neurosci.* - 2005. - 21, №12. - C.3310–3320.
430. DeFrance J. F. Dopamine action in the nucleus accumbens. / J. F. DeFrance, R. W. Sikes, R. B. Chronister // *J. Neurophysiol.* - 1985. - 54, №6. - C.1568–1577.
431. Gil Z. Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity / Z. Gil, B. W. Connors, Y. Amitai // *Neuron* - 1997. - 19, №3. - C.679–686.
432. Mansvelder H. D. Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits / H. D. Mansvelder, M. Mertz, L. W. Role // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2009. - 20, №4. - C.432–440.
433. Zhong P. Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. / P. Zhong, W. Liu, Z. Gu, Z. Yan // *J. Physiol.* - 2008. - 586, №Pt 18. - C.4465–4479.
434. Brooks-Kayal A. Epilepsy and autism spectrum disorders: Are there common developmental mechanisms? / A. Brooks-Kayal // *Brain Dev.* - 2010. - 32. - C.731–738.
435. Dunn D. W. ADHD and epilepsy in childhood. / D. W. Dunn, J. K. Austin, J. Harezlak, W. T. Ambrosius // *Dev. Med. Child Neurol.* - 2003. - 45, №1. - C.50–54.
436. Levin B. Childhood obsessive-compulsive disorder and cingulate epilepsy. / B. Levin, M. Duchowny // *Biol. Psychiatry* - 1991. - 30. - C.1049–1055.
437. Laroche S. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. / S. Laroche, S. Davis, T. M. Jay //

- Hippocampus - 2000. - 10. - C.438–446.
438. Hermann B. Epilepsy and cognition. / B. Hermann, M. Seidenberg // *Epilepsy Curr.* - 2007. - 7, №1. - C.1–6.
 439. Grottick A. J. Effect of subtype selective nicotinic compounds on attention as assessed by the five-choice serial reaction time task. / A. J. Grottick, G. A. Higgins // *Behav. Brain Res.* - 2000. - 117, №1-2. - C.197–208.
 440. Clarke D. F. The prevalence of autistic spectrum disorder in children surveyed in a tertiary care epilepsy clinic. / D. F. Clarke, W. Roberts, M. Daraksan, A. Dupuis, J. McCabe, H. Wood, O. C. Snead, S. K. Weiss // *Epilepsia* - 2005. - 46, №12. - C.1970–1977.
 441. Lugo J. N. Early-life seizures result in deficits in social behavior and learning / J. N. Lugo, J. W. Swann, A. E. Anderson // *Exp. Neurol.* - 2014. - 256. - C.74–80.
 442. Macfarlane S. R. Proteinase-activated receptors. / S. R. Macfarlane, M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter, R. Plevin // *Pharmacol. Rev.* - 2001. - 53, №2. - C.245–282.
 443. Chapman J. Thrombin in inflammatory brain diseases. / J. Chapman // *Autoimmun. Rev.* - 2006. - 5, №8. - C.528–531.
 444. Gulati A. On the mechanism of potentiation of apomorphine-induced stereotypy due to electroconvulsive shock. / A. Gulati, R. C. Srimal, K. N. Dhawan, B. N. Dhawan // *Neuropharmacology* - 1987. - 26, №12. - C.1733–1737.
 445. Dihanich M. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. / M. Dihanich, M. Kaser, E. Reinhard, D. Cunningham, D. Monard // *Neuron* - 1991. - 6, №4. - C.575–581.
 446. Riek-Burchardt M. Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. / M. Riek-Burchardt, F. Striggow, P. Henrich-Noack, G.

- Reiser, K. G. Reymann // *Neurosci. Lett.* - 2002. - 329, №2. - C.181–184.
447. Donovan F. M. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. / F. M. Donovan, C. J. Pike, C. W. Cotman, D. D. Cunningham // *J. Neurosci.* - 1997. - 17, №14. - C.5316–5326.
448. Thirumangalakudi L. Involvement of PGE2 and PGDH but not COX-2 in thrombin-induced cortical neuron apoptosis / L. Thirumangalakudi, H. V. Rao, P. Grammas // *Neurosci. Lett.* - 2009. - 452, №2. - C.172–175.
449. Choi S.-H. Thrombin-induced microglial activation produces degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. / S.-H. Choi, E. H. Joe, S. U. Kim, B. K. Jin // *J. Neurosci.* - 2003. - 23, №13. - C.5877–5886.
450. de Castro Ribeiro M. Thrombin in ischemic neuronal death. / M. de Castro Ribeiro, J. Badaut, M. Price, M. Meins, J. Bogousslavsky, D. Monard, L. Hirt // *Exp. Neurol.* - 2006. - 198, №1. - C.199–203.
451. Smirnova I. V. Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons. / I. V. Smirnova, S. X. Zhang, B. A. Citron, P. M. Arnold, B. W. Festoff // *J. Neurobiol.* - 1998. - 36, №1. - C.64–80.
452. Strigrow F. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. / F. Strigrow, M. Riek, J. Breder, P. Henrich-Noack, K. G. Reymann, G. Reiser // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2000. - 97, №5. - C.2264–2269.
453. Choi S.-H. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: role of microglial NADPH oxidase. / S.-H. Choi, D. Y. Lee, S. U. Kim, B. K. Jin // *J. Neurosci.* - 2005. - 25, №16. - C.4082–4090.
454. Weinstein J. R. Injury-related factors and conditions down-regulate the

- thrombin receptor (PAR-1) in a human neuronal cell line. / J. R. Weinstein, A. L. Lau, L. F. Brass, D. D. Cunningham // *J. Neurochem.* - 1998. - 71, №3. - C.1034–1050.
455. Levin J. R. Reduction in delayed mortality and subtle improvement in retrograde memory performance in pilocarpine-treated mice with conditional neuronal deletion of cyclooxygenase-2 gene. / J. R. Levin, G. Serrano, R. Dingledine // *Epilepsia* - 2012. - 53, №8. - C.1411–1420.
 456. Marchi N. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. / N. Marchi, T. Granata, E. Freri, E. Ciusani, F. Ragona, V. Puvenna, Q. Teng, A. Alexopolous, D. Janigro // *PLoS One* - 2011. - 6, №3. - C.e18200.
 457. Sierra-Marcos A. Statins are associated with decreased mortality risk after status epilepticus. / A. Sierra-Marcos, V. Alvarez, M. Faouzi, B. Burnand, A. O. Rossetti // *Eur. J. Neurol.* - 2015. - 22, №2. - C.402–405.
 458. Vergnolle N. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. / N. Vergnolle, J. L. Wallace, N. W. Bunnett, M. D. Hollenberg // *Trends Pharmacol. Sci.* - 2001. - 22, №3. - C.146–152.
 459. Lo H.-M. Thrombin induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 release via PAR1 activation and ERK1/2- and p38 MAPK-dependent pathway in murine macrophages. / H.-M. Lo, C.-L. Chen, Y.-J. Tsai, P.-H. Wu, W.-B. Wu // *J. Cell. Biochem.* - 2009. - 108, №5. - C.1143–1152.
 460. Staley K. J. Neuroscience Letters Interictal spikes : Harbingers or causes of epilepsy ? / K. J. Staley, A. White, F. E. Dudek // *Neurosci. Lett.* - 2011. - 497, №3. - C.247–250.
 461. Pitkänen A. Issues related to development of anti-epileptogenic therapies / A. Pitkänen, A. Nehlig, A. R. Brooks-Kayal, E. Dudek, D. Freidman, A. S. Galanopoulou, F. E. Jensen, R. M. Kaminski // *Epilepsia* - 2014. - 54, №4. - C.35–43.

462. Hamill C. E. Protease-activated receptor 1-dependent neuronal damage involves NMDA receptor function / C. E. Hamill, G. Mannaioni, P. Lyuboslavsky, A. A. Sastre, F. Traynelis // *Exp. Neurol.* - 2009. - 217, №1. - C.136–146.
463. Han K.-S. Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. / K.-S. Han, G. Mannaioni, C. E. Hamill, J. Lee, C. E. Junge, C. J. Lee, S. F. Traynelis // *Mol. Brain* - 2011. - 4, №1. - C.32.
464. Yuan J. Altered expression of the small guanosine triphosphatase RhoA in human temporal lobe epilepsy. / J. Yuan, L. Wang, J. Li, N. Cao, L. Wang, G. Feng, T. Xue, Y. Lu, X. Wang // *J. Mol. Neurosci.* - 2010. - 42, №1. - C.53–58.
465. Dubreuil C. I. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats. / C. I. Dubreuil, N. Marklund, K. Deschamps, T. K. McIntosh, L. McKerracher // *Exp. Neurol.* - 2006. - 198, №2. - C.361–369.
466. Jeon B. T. The Rho-kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 protects against excitotoxicity-induced neuronal death in vivo and in vitro. / B. T. Jeon, E. A. Jeong, S.-Y. Park, H. Son, H. J. Shin, D. H. Lee, H. J. Kim, S. S. Kang, G. J. Cho, W. S. Choi, G. S. Roh // *Neurotox. Res.* - 2013. - 23, №3. - C.238–248.
467. Baraban J. M. Identification of p42 mitogen-activated protein kinase as a tyrosine kinase substrate activated by maximal electroconvulsive shock in hippocampus. / J. M. Baraban, R. S. Fiore, J. S. Sanghera, H. B. Paddon, S. L. Pelech // *J. Neurochem.* - 1993. - 60, №1. - C.330–336.
468. Berkeley J. L. The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures. / J. L. Berkeley, M. J. Decker, A. I. Levey // *J. Neurochem.* - 2002. - 82, №1. - C.192–201.
469. Jiang W. Involvement of extracellular regulated kinase and p38 kinase in

- hippocampal seizure tolerance. / W. Jiang, J. Van Cleemput, A. H. Sheerin, S.-P. Ji, Y. Zhang, D. M. Saucier, M. E. Corcoran, X. Zhang // *J. Neurosci. Res.* - 2005. - 81, №4. - C.581–588.
470. Kim Y. S. Phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase by kainic acid-induced seizure in rat hippocampus. / Y. S. Kim, K. S. Hong, Y. S. Seong, J. B. Park, S. Kuroda, K. Kishi, K. Kaibuchi, Y. Takai // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1994. - 202, №2. - C.1163–1168.
471. Vezzani A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. / A. Vezzani, A. Friedman // *Biomark. Med.* - 2011. - 5, №5. - C.607–614.
472. Cirino G. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. / G. Cirino, C. Cicala, M. R. Bucci, L. Sorrentino, J. M. Maraganore, S. R. Stone, U. Kingdom // *J. Exp. Med.* - 1996. - 183, №3. - C.821–827.
473. Ravizza T. Inflammation and prevention of epileptogenesis. / T. Ravizza, S. Balosso, A. Vezzani // *Neurosci. Lett.* - 2011. - 497, №3. - C.223–230.