

## РЕФЕРАТ РОБОТИ

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

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

Існують докази того, що цілісність гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) порушується в різних ділянках мозку під час розвитку епілепсії (van Vliet et al., 2007). Порушення ГЕБ було виявлено у гіпокампі, корі, таламусі, мигдалеподібному тілі та нюховій цибулині протягом різних періодів епілептогенезу. Роль нюхової цибулини у розвитку ЕС залишається недостатньо вивченою. В даній роботі ми досліджували зміни локальних потенціалів у нюховій цибулині, гіпокампі та мигдалеподібному тілі під час розвитку ЕС у літій – пілокарпіновій моделі епілепсії. Так, після введення пілокарпіну потужність тета-ритму зростала у гіпокампі та мигдалеподібному тілі, а у нюховій цибулині, навпаки, зменшувалась. Також відбулися зміни у бета-ритмі гіпокампа та мигдалеподібному тілі, та у гамма-ритмі нюхової цибулини та мигдалеподібного тіла. Ми виявили, що інтеріктальні спалахи нейрональної активності, які співвідносять з початком нападу, у нюховій цибулині з'являлися на  $25 \pm 7$  секунд раніше ніж у гіпокампі та мигдалеподібному тілі. Ці данні можуть свідчити про можливу тригерну роль нюхової цибулини у розвитку епілептичного статусу.

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

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

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

Однією з найважливіших умов нормального функціонування організму є сталість позаклітинного середовища, одним з показників якого є врегульована концентрація протонів. У більшості хребетних у нормі цей параметр, або показник водню (рН), дорівнює 7.4. В різних фізіологічних та патофізіологічних станах його значення може помітно змінюватися – при запаленні або ішемії, наприклад, виникає локальне закислення або ацидоз тканин, що супроводжується болем. З огляду на це сформувалась думка, що в організмі існує сенсор, чутливий до протонів. У 1980-му році Кришталь та Підоплічко у роботі на нейронах сенсорних гангліїв щурів показали, що у відповідь на зміну рН позаклітинного розчину з 7.4 до 7 та нижче активується струм, який з'являється за рахунок збільшення проникності мембрани для іонів натрію та калію і досягає максимального значення при рівні рН=5.4. У

1996-му році Валдман із колегами отримали такий же самий струм, але вже у ооцитах жаби. Вони експресували в ооцитах РНК, яка була комплементарна до виділеної ДНК мозку щура. Іонні канали, через які протікає такий струм почали називати чутливими до закислення, або протон-чутливі іонні канали (Acid Sensing Ion Channels або ASICs). ASICs визначають, як підсімейство іонних каналів ссавців сімейства епітеліальних натрієвих та дегенеринових ENaC/DEG каналів. Протягом останніх років, з використанням генетично модифікованих тваринних моделей, з'ясовано їх залучення до багатьох нормальних фізіологічних та патологічних процесів, що включають больові відчуття, синаптичну пластичність, вираження страху та нейродегенерацію після ішемії. Все це робить їх потенційно цікавими мішенями для фармакології, проте на даний час ще не винайдено препаратів для ASICs, які б можливо було застосовувати клінічно. Більшість структур ASICs були отримані від курячого ASIC1a, який поділяє близько 90% ідентичності послідовностей з людським та щурячим ASIC1a. ASICs існують у трьох функціональних станах: закритому, відкритому та десенсибілізованому. Субодиниці ASICs переважно експресуються в нервовій системі. ASIC1a, ASIC2a, ASIC2b та ASIC4 виявлені в ЦНС і ПНС, а ASIC1b і ASIC3 лише в ПНС, за винятком людського ASIC3, який також демонструє низький рівень експресії в ЦНС. Також ASICs були виявлені в клітинах соми та сенсорних нервових терміналях периферичних нейронів. У нейронах гіпокампа ASIC1a переважно розташовані на тілі клітини та дендритах. ASICs є проникними для іонів  $\text{Na}^+$  і їх активація призводить до мембранної деполяризації, тим самим індукуючи потенціали дії в нейронах. Таким чином, ASICs часто мають активізуючу дію на нейрони. Для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів розроблено та виготовлено бездротовий пристрій, який дозволяє проводити реєстрацію під час поведінкових тестів та має значні переваги в порівнянні з аналогами. В експерименті з реєстрації електричної активності гіпокампа з проведенням поведінкового тесту “відкрите поле” виявлено, що блокування активності ASICs новітнім антагоністом – сполукою 5b призводить до зниження як домінуючої частоти тета-ритму, так і загального рівня локомоторної активності.

Під час епілептичних випадків рН мозку знижується, і відомо, що ацидоз може закінчитися судомами. Зіман із колегами показали, що порушення гена ASIC1a збільшило ступінь тяжкості випадків, і протилежний ефект спостерігався при надмірній експресії ASIC1a. Також вони з'ясували, що інгібіторні інтернейрони в гіпокампі демонструють більш високі амплітуди ASIC-струмів, ніж пірамідальні нейрони, і, можливо, опосередковане інгібування інтернейронів припиняє напади. Стратегії пошуку нових протиепілептичних препаратів в основному орієнтовані на початкову стадію інсульту та оборнення процесу епілептогенезу для запобігання розвитку хронічної епілепсії. Для перевірки потенційного протиепілептичного лікування у гризунів використовують каїнатну, пілокарпінову або літій-пілокарпінову модель індукованої епілепсії, які довели свою корисність у вивченні патофізіології та прогресуванні TLE. Ці моделі можуть відтворити поведінкові, електрографічні та невропатологічні особливості TLE людини. Системне або внутрішньомозкове введення каїнату, потужного агоніста глутамату, широко застосовується для індукції епілептичних нападів у тварин. Ці періодичні напади швидко генералізуються. У каїнатній моделі у щурів повторювані напади можуть тривати протягом змінних періодів до декількох місяців. Втрата нейронів зони CA1 та характер дисперсії клітин у клітинному шарі зубчастих звивин, що нагадує гістологічні зміни у людей зі скроневою епілепсією, спостерігалась після мікроін'єкції каїнату в дорсальний гіпокамп мишей. Дієвість каїнатної моделі робить її дуже корисною для розуміння патофізіологічних змін, що відбуваються при скроневої епілепсії. В нашій роботі ін'єкції каїнату в зону CA1 гіпокампа *in vivo* викликали стійку епілептиформну активність і використовуючи антагоніст ASICs – сполуку 5b, ми вперше показали, що блокада провідності цих каналів має помітний антиепілептичний ефект, зменшуючи частоту виникнення епілептиформних явищ. Ін'єкція пілокарпіну, яка робиться через 20 годин після ін'єкції літію, призводить до ЕС і після латентного періоду без випадків, переростає в хронічний стан, що характеризується спонтанними рецидивними випадками. Літій-пілокарпінову модель можна вважати корисним інструментом для дослідження фармакологічних втручань для інгібування випадків, викликаних, наприклад, інфекціями ЦНС.

Серед інших зон мозку гіпокамп особливо вразливий до пошкодження нейронів, спричиненого пілокарпіном. Гіпокамп є центром уваги в галузі дослідження TLE, оскільки він містить багато чітко визначених нейронних зв'язків, пов'язаних з генезисом припадків. Епілептичні напади спричиняють серйозні ураження пірамідальних клітинних шарів зон CA1, CA3 та зубчастої звивини гіпокампа. Епілепсія характеризується кількома поведінковими супутніми розладами, такими як когнітивна дисфункція, яка є поширеною серед хворих на епілепсію. В наших експериментах на щурах з індукованою епілепсією вперше показано, що блокування активності ASICs істотно впливає на загальний рівень локомоторної активності, а також призводить до нормалізації зниженого рівня тривожності. Тварини з індукованою епілепсією демонструють значне погіршення пам'яті та здібностей до навчання, які проявляються у початковому латентному періоді, в якому ще немає нападів. Ми з'ясували, що фармакологічна блокада ASICs у щурів значно відновлює порушене внаслідок індукції епілепсії емоційне навчання, що зумовлене страхом.

Не менш серйозним хронічним неврологічним розладом, що спричиняє смерть нейронів у лімбічній системі мозку є хвороба Паркінсона (ХП). Масова загибель дофамінергічних нейронів у чорній субстанції призводить до поведінкових та неврологічних змін ХП. У роботі ми показали, що синаптична система ГАМК, один з головних регуляторів вивільнення дофаміну, зазнає патологічних змін в умовах ХП. Раніше ми показали, що синаптична активність ГАМК в гіпокампі залежить від активації ASICs. У цьому наборі експериментів ми отримали попередні дані про вплив ASICs на поведінку щурів з LPS-моделлю ХП. Ми виявили, що при хворобі Паркінсона знижується рівень локомоторної активності. Блокада ASICs знижує локомоторну активність в контролі і при ХП. Також при ХП підвищується рівень тривожності. Блокада ASICs збільшує рівень тривожності у контролі та при ХП, нормалізуючи його в останньому випадку. Вперше продемонстровано, що максимальна частота епілептиформних явищ у зоні CA1 гіпокампа при моделюванні ХП зменшується у порівнянні з контролем.

Наші сучасні знання про властивості ниркових іонних каналів, відповідальних за електроліти та клітинний енергетичний гомеостаз, в основному

спираються на дослідження гризунів. Однак досі не встановлено, наскільки їх характеристики можна узагальнити до характеристик людей. Це дослідження було розроблено для стандартизації протоколу виділення добре збережених гломерул та ниркових каналців із нирок гризунів та людини та оцінки функціональної придатності отриманих матеріалів для фізіологічних досліджень. Відокремлення сегментів нефрону від нирок людини та гризунів було досягнуто за допомогою нової техніки вібродиссоціації. Цілісність ізольованих ниркових каналців та гломерул досліджували за допомогою електрофізіологічного аналізу та флуоресцентної мікроскопії, а чистоту зібраних фракцій підтверджували за допомогою кількісної RT-PCR з генними маркерами для конкретних типів клітин. Розроблений підхід дозволяє швидко виділити добре збережені ниркові каналці та гломерули з нирок людини та гризунів, що піддаються електрофізіологічним дослідженням, кальцієвій візуалізації. Аналіз основних електрофізіологічних параметрів основних калієвих та натрієвих каналів, виражених в кортикальних збірних протоках людини, показав, що вони виявляють подібні біофізичні властивості, як повідомлялося раніше в дослідженнях на гризунах. Застосування вібродиссоціації для виділення сегмента нефрону має ряд переваг перед існуючими методами: воно менш трудомістке, не вимагає практично ніякої ферментативної обробки і дає велику кількість добре збереженого експериментального матеріалу в чистих фракціях. Застосування цього методу для відділення сегментів нефрону від нирок людини та гризунів може стати потужним інструментом для поглибленої оцінки функції нирок за станом здоров'я та хвороб.

Діабетична хвороба нирок (DKD) є однією з провідних патологічних причин зниження функції нирок та прогресування термінальної ниркової недостатності. Для дослідження та характеристики вікових змін DKD та пов'язаних з ними пошкоджень гломерул ми використовували модель щурів діабетичної нефропатії 2 типу (T2DN) за 12 і старше 48 тижнів. Ми порівняли їх прогресування із контрольними недіабетичними щурами Вістар та діабетичними щурами Гото-Какідзакі (ГК). На ранніх стадіях DKD, T2DN та GK тварини виявили значне збільшення рівня глюкози в крові та співвідношення маси нирок до тіла. Обидві групи діабетиків мали суттєво

змінену функцію ренін-ангіотензин-альдостеронової системи. Після цього, на пізніх стадіях прогресування захворювання, щури T2DN продемонстрували значне збільшення пошкодження нирок порівняно з щурами GK та Wistar, на що вказує гіпертрофія нирок, поліурія, що супроводжується зниженням осмолярності сечі, високим рівнем холестерину та важкі форми пошкодження гломерул. Виділення нефрину з сечі свідчило про втрату щільної діафрагми гломерул, що також корелює з різким підвищенням рівня альбумінурії та втратою фарбування подоцину у старих щурів T2DN. Крім того, вперше, ми використовували топографічні аналізи скануючої іонної мікроскопії для виявлення та кількісної оцінки патологічного ремоделювання в проекціях стопи подоцитів ізольованих гломерул від тварин T2DN.

### ***Наукова новизна одержаних результатів***

Для експериментів з реєстрації електричної активності гіпокампа щурів було розроблено бездротовий пристрій, який має значні переваги у порівнянні з аналогами. У роботі було вперше досліджено зміни локальних потенціалів у нюховій цибулині, гіпокампі та мигдалині під час розвитку епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії. Дуже цікавим виявилось те, що інтеріктальні спалахи нейрональної активності з'являються раніше у нюховій цибулині ніж в гіпокампі та мигдалині. Також було показано що зміни потужності локальних потенціалів під час розвитку епілептичного статусу значно більші у нюховій цибулині в порівнянні з іншими ділянками. Отримані дані вказують на можливу роль нюхової цибулини у розвитку епілептичного статусу. Окрім внеску в загальне розуміння кінетики змін різних ритмів при розвитку епілептичного статусу в різних ділянках головного мозку, дана робота вперше показує вплив фармакологічної блокади протеазаактивованих рецепторів першого типу на потужності тета- та гамма-ритму під час транзитної фази становлення епілептичного статусу. Вперше продемонстровано, що фармакологічна блокада протеазаактивованих рецепторів першого типу нормалізує рівень тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу.

В той же час, вперше показано, що блокада провідності ASICs за допомогою



новітнього антагоністу 5b пригнічує епілептиформну активність нейронів зони CA1 гіпокампа *in vivo* в умовах каїнатної моделі епілепсії. Також вперше продемонстровано, що блокування активності ASICs призводить до зниження домінуючої частоти тета-ритму та загального рівня локомоторної активності. Показано, що поведінка тварин після індукції епілепсії нормалізується внаслідок блокування ASICs, водночас таке пригнічення функції ASIC суттєво впливає на рівень локомоторної активності тварин. Вперше продемонстровано, що блокада функції ASICs призводить до нормалізації навчання, зумовленого страхом, зниженого внаслідок індукованої епілепсії.

Розроблений метод вібродисоціації пропонує новий та зручний підхід для виділення та вивчення сегментів нефрона. На відміну від сучасних методів, призначених для виділення різних компонентів нирки, розроблений підхід дозволяє отримати велику кількість клубочків та ниркових каналців у заздалегідь визначеній ділянці нирки за кілька хвилин. Використання інкубаційної камери з насиченим розчином вуглецю розчином дозволяє зберегти життєздатні зрізи нирок протягом експериментальної доби, що, безсумнівно, важливо для оптимального використання експериментальних тварин та нирок людини. Крім того, розроблений метод дозволяє легко відокремити чисті фракції різних сегментів нефрону в лабораторних умовах для подальших досліджень молекулярної біології. Показано, що техніку вібродиссоціації можна використовувати для електрофізіологічних досліджень або досліджень кальціометрії на сегментах нефрону, виділених від різних видів, включаючи людей, оскільки розроблений протокол може бути адаптований до тканин, отриманих при трансплантації нирки та матеріалі біопсії. За допомогою цього методу ми вперше змогли описати електрофізіологічні властивості калієвих та натрієвих каналів, виражені в клітинах збірних потоків нирок людини. Крім того, ми оцінили зміни внутрішньоклітинного кальцію у відповідь на АТФ у подоцитах зі свіжовиділених гломерул гризунів за наявності або відсутності ферментативного лікування.

**Теоретичне та практичне значення отриманих результатів.** Результати, отримані в роботі, розширюють наявні уявлення щодо залучення PAR1 у механізми

розвитку епілептичного статусу та супутніх поведінкових розладів. А саме: показано роль ПАР1 у розвитку епілептичного статусу, та вплив блокування цих рецепторів на поведінкові реакції у латентний та хронічний періоди розвитку епілепсії. Також результати демонструють залучення ASIC-каналів до регуляції надмірної синхронної активності нейронів гіпокампа. В роботі представлені докази залучення нюхової цибулини у розвиток епілептичного статусу.

Практична цінність даної роботи полягає у розробці прототипу багатоканальної бездротової системи реєстрації електрофізіологічних потенціалів головного мозку щурів. Його використання для одночасних записів електричної активності від різних ділянок мозку, що надає можливість робити більш детальне дослідження розвитку епілептичного статусу. Доведена доцільність використання ПАР1 та ASICs у якості терапевтичної мішені при розвитку набутої епілепсії. Практичне застосування результатів цієї роботи може допомогти у розробці антиепілептичних препаратів. Також практична частина допоможе у проектуванні пристроїв моніторингу та реєстрації електроенцефалограми головного мозку у тварин. Розроблений метод вібродисоціації являє собою універсальний та надійний спосіб відокремлення добре збережених сегментів нефрону нирки від різних видів тварин, що вдосконалює сучасні методології виділення компонентів нирок та забезпечує чудову платформу для оцінки їх властивостей у *in vitro*.

Загальна кількість статей за циклом праць 17 , з них у міжнародних журналах 9, 21 теза на міжнародних конференціях та 2 патенти.

Загальна кількість посилань на публікації авторів згідно бази даних Google Scholar складає 62, (SCOPUS – 27, Web of Science – 28 ), сумарний h-індекс (за роботою) Google Scholar = 4, (SCOPUS – 4, Web of Science – 4).