

# Фармакологічна блокада протеазоактивованих рецепторів 1 не впливає на соціальну поведінку щурів після епілептичного статусу

М.О. Семеніхіна<sup>1</sup>, Р.І. Боговик<sup>1</sup>, М.П. Федорюк<sup>1</sup>, О.В. Стасишин<sup>2</sup>, А.В. Савотченко<sup>1</sup>, О.В. Ісаєва<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної Академії Наук (НАН) України,

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка;

e-mail: marharyta.semenikhina@gmail.com

*У нашій роботі досліджено внесок протеазоактивованих рецепторів 1 (ПАР1) у модуляцію соціальної поведінки щурів з епілептичним статусом (ЕС). З використанням літій-пілокарпінової моделі ЕС та тесту «перегородка» показано значне зниження товариськості та інтересу до соціальної новизни у щурів на 14-й день після ЕС, що є характерним розладом, який супроводжує розвиток епілепсії, причому вони проводили значно менше часу ( $5,85 \pm 1,11$  % від загального часу в експериментальній камері) із «соціальним» подразником, ніж група контрольних тварин ( $15,04 \pm 1,59$  %). Вперше продемонстровано, що блокування ПАР1 не впливає на характеристики соціальної поведінки дослідних тварин як за контрольних умов, так і за умов моделювання ЕС, що свідчить про відсутність залучення цих рецепторів у механізми формування соціальної поведінки щурів.*

*Ключові слова: протеазоактивовані рецептори 1; соціальна поведінка; епілептичний статус; літій-пілокарпінова модель.*

## ВСТУП

Майже 30 % дітей, що страждають на епілепсію, схильні до розвитку розладів аутистичного спектра (РАС) [1, 2]. Останні характеризуються насамперед порушеннями у сфері соціальних взаємодій і комунікацій. Як діти, так і дорослі страждають від різноманітних психоемоційних порушень, що супроводжують епілепсію, таких як тривожність, депресія тощо. Вірогідними причинами, які зумовлюють РАС є розбалансування між збуджуючою та гальмівною синаптичною передачею кори головного мозку та ослаблення функціонального зв'язку між лобною часткою кори та іншими ділянками мозку, що є типовим проявом епілепсії. Дані обстеження хворих на РАС демонструють порушення у ГАМК-ергічній синаптичній системі, що також є характерним для епілепсії та РАС [3]. Важливим

при лікуванні епілепсії є не лише зниження кількості та інтенсивності нападів, але й покращення якості життя хворих, тому велике значення має дослідження впливу потенційних антиепілептичних засобів на зміни емоційно-зумовленої та соціальної поведінки. Нещодавно нами було показано, що протеазоактивовані рецептори 1 (ПАР1), представники сімейства рецепторів, спряжених із G-білками, що активуються протеазами, у тому числі тромбіном, відіграють важливу роль у розвитку набутої епілепсії. З використанням літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії встановлено, що інгібування цих рецепторів під час епілептогенезу, спровокованого епілептичним статусом (ЕС), має антиепілептогенний і нейропротекторний ефекти, а також призводить до нормалізації тривожної поведінки дослідних тварин [4, 5].

© М.О. Семеніхіна, Р.І. Боговик, М.П. Федорюк, О.В. Стасишин, А.В. Савотченко, О.В. Ісаєва

ПАР1 є найпоширенішими тромбінними рецепторами ЦНС, що експресуються в нейронах і гліальних клітинах гіпокампа, корі головного мозку, стріатумі, мигдалику, базальних гангліях тощо [6–8]. Саме ці відділи є найвразливішими ділянками мозку при скроневої епілепсії, та саме вони відповідають за обробку психоемоційних реакцій, соціальну та особистісну поведінку тощо. Наші попередні дослідження показали, що блокування ПАР1 після ЕС призводить до зниження загибелі клітин гіпокампа та зменшення вірогідності розвитку набутої епілепсії у дослідних тварин [5]. Окрім того, продемонстровано залучення ПАР1 у регуляцію тривожної поведінки та формування умовної реакції страху у щурів [4]. Відомо, що ЕС призводить до зниження соціальної активності та змін у характері соціальної поведінки, що зумовлюється низкою не до кінця визначених патологічних процесів.

Метою нашої роботи було дослідження ролі ПАР1 у модуляції соціальної поведінки щурів після ЕС.

## МЕТОДИКА

Усі експериментальні процедури було проведено згідно з Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, що використовувалися в експериментальних чи інших наукових цілях, закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» і затверджено Комітетом з догляду за тваринами інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Досліди проводили на щурах лінії Вістар віком 27 діб. Тварини були розподілені на 4 групи: 1-ша – контрольні тварини (n = 21), 2-га – контрольні тварини, які отримували ін'єкції інгібітора ПАР1 (n = 20), 3-тя – тварини з ЕС (n = 10), та 4-та – тварини з ЕС, які отримували ін'єкції інгібітора ПАР1 (n = 15).

## Моделювання епілепсії

Для моделювання ЕС використовували літій-пілокарпінову модель скроневої епілепсії. За 20–22 год до ін'єкцій пілокарпіну щурам вводили внутрішньоочеревинно хлорид літію (127 мг/кг), розведений у 0,9 %-му розчині хлориду натрію із розрахунку 1 мл/кг. Ін'єкції пілокарпіну здійснювали з інтервалом 30 хв з початковою дозою 40 мг/кг та наступними – 10 мг/кг. Введення пілокарпіну припиняли після розвитку епілептичних нападів 4–5-ї стадії (ЕС) за шкалою Расіна [9]. Тварин, у яких не спостерігалися напади після введення 60 мг/кг пілокарпіну, вилучали з подальших експериментальних процедур. Через 60 хв після початку ЕС, епілептичні напади зупиняли за допомогою двох внутрішньоочеревинних ін'єкцій діазепаму (20 мг/кг кожна) з інтервалом 5 хв. Через 15 хв після припинення ЕС щурам вводили інгібітор ПАР1 (SCH79797 [SCH], 25 мкг/кг, внутрішньоочеревинно) або відповідний об'єм 0,9 %-го розчину хлориду натрію. Протягом наступних 9 діб ін'єкції інгібітора ПАР1 здійснювали раз на день. Контрольним тваринам замість пілокарпіну вводили 0,9 %-й розчин хлориду натрію в еквівалентному об'ємі. Всіх тварин утримували поодиноч в режимі 12-годинного циклу день/ніч з вільним доступом до води та їжі.

## Поведінкові тести

Для визначення ефекту антагоніста ПАР1 на різні форми соціальної поведінки контрольних щурів і щурів з ЕС використовували тест «перегородка» [10, 11]. Установа для цього тесту (120/60/50см) мала вигляд трикамерної системи, що складалась з однакових за розмірами відділів з чорним матовим покриттям, відокремлених перегородками. В одній з бічних камер знаходився щур, такий самий за статтю, віком та масою, що і дослідна тварина (соціальний подразник). Цей щур був ізольований у круглій прозорій клітці, що виключало його пересування

під час тесту, а також зіткнення з експериментальною особою. В лівій бічній камері розташовували пусту прозору клітку (несоціальний подразник). Відомо, що гризуни, як правило, воліють витратити більше часу на спілкування з іншим гризуном (товариськість) та досліджувати незнайому тварину, ніж спілкуватися зі знайомою (соціальна новизна). З огляду на ці схильності, тест може допомогти виявити гризунів із дефіцитом комунікабельності. За годину до початку експерименту дослідних тварин переносили у тестову кімнату. Дослідження складалось із 2 сесій. Під час першої сесії дослідна тварина була переміщена у центральну камеру, після чого перегородки між камерами видаляли і протягом 10 хв вимірювали час, проведений нею поряд з пустою скринькою або щуром. Другу сесію проводили за такою самою схемою, але в пусту скриньку переміщали іншого щура («новий», «незнайомий» соціальний подразник)

### Статистичний аналіз

Аналіз результатів проводили із використанням програм Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) та Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA). Різниця між групами визначалася за допомогою критерію *t* Стьюдента, *U*-критерію Манна-Уїтні та двофакторного аналізу. Результати вважалися значущими при  $P < 0,05$ . Поведінку тварин під час тесту реєстрували на відео.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження поведінкових реакцій тварин здійснювали через 14 діб після ініціювання ЕС. Встановлено, що під час першої сесії щури 3-ї групи проводили значно менше часу з «соціальним» подразником, ніж 1-ї групи ( $t = 3,53$ ,  $df = 29$ ,  $P = 0,001$ ). Тварини 1-ї групи взаємодіяли з щуром  $15,04 \pm 1,59$  % від загального часу та  $5,35 \pm 0,70$  % часу з об'єктом ( $t = 5,29$ ,  $df = 32$ ,  $P = 0,0001$ ; тварини

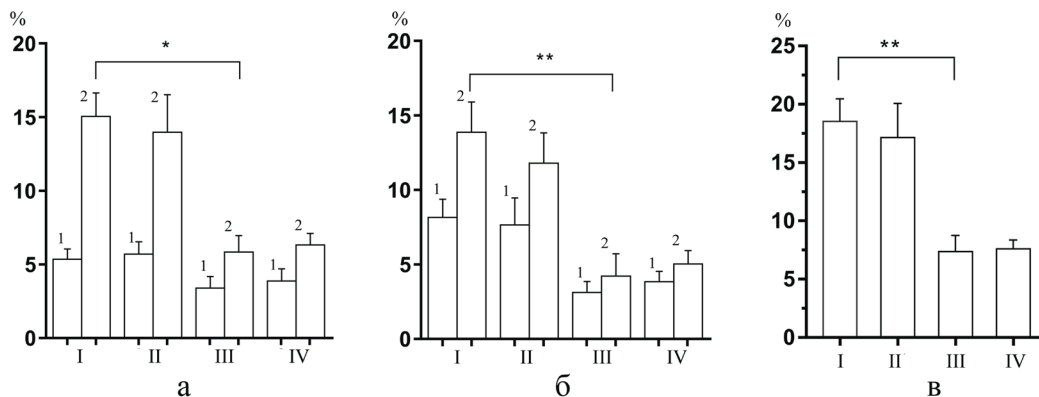
3-ї групи, в свою чергу –  $5,85 \pm 1,11$  % часу з щуром та  $3,39 \pm 0,78$  % часу з об'єктом ( $t = 2,37$ ,  $df = 20$ ,  $P = 0,03$ , рисунок, а). Зміни в часі разом із «соціальним» і «несоціальним» подразниками не залежали від загальної кількості перетинів центральної камери ( $P = 0,34$ , порівняно кількість перетинів центральної камери 1-ю та 3-ю групою), що свідчить про те, що тварини 3-ї групи не просто частіше пересувалися з однієї бічної камери до іншої (проявляли гіперактивний фенотип поведінки під час виконання тесту), а витрачали менше часу на соціальну взаємодію.

Для дослідження впливу антагоніста ПАР1 на поведінку дослідних тварин під час першої сесії ми здійснювали порівняльний аналіз часу, проведеного щурами поряд з соціальним і несоціальним подразниками, а також відношення цих показників між групами 3 та 4, 1 та 2. Статистично достовірних змін цих показників не було виявлено ( $P > 0,05$  в усіх випадках). Варто відзначити, що загальна тенденція проводити більше часу з твариною, ніж з неживим об'єктом, зберігалася в усіх тварин. Під час другої сесії тесту, яка характеризує реакцію дослідної тварини на соціальну новизну, щури 3-ї групи проводили менше часу з незнайомою твариною, порівняно з тваринами 1-ї групи ( $U = 30,5$ ,  $P = 0,0004$ , рисунок, б). Більше того, тварини 1-ї групи віддавали перевагу спілкуванню із незнайомим щуром порівняно зі знайомим з попередньої сесії ( $13,87 \pm 2,03$  % від загального часу поряд із незнайомою твариною порівняно до  $8,17 \pm 1,22$  % часу зі знайомою), в той час як тварини 3-ї групи не виділяли його за рівнем власного інтересу від реакції на знайому тварину ( $4,23 \pm 1,48$  % від загального часу поряд із незнайомою твариною щодо  $3,12 \pm 0,74$  % часу зі знайомою, рисунок, б). Порівняно загальний час проведений дослідними тваринами поряд із соціальними подразниками (знайомий і незнайомий щур) впродовж першої та другої сесій (загальна соціальна взаємодія).

Встановлено зниження цього показника у тварин з ЕС у зіставленні з контрольними, що свідчить про погіршення загального соціального інтересу тварин після ЕС. Ми не спостерігали різниці між рівнем інтересу до соціальної новизни між групами 3 і 4 ( $P > 0,05$ ), 1 та 2 ( $P > 0,05$ , рисунок, а, б). Ефекту блокування ПАР1 на загальний час, проведений за соціальною взаємодією, також не виявлено ні в контролі, ні в групі тварин після ЕС (рисунок, б).

У нашій роботі встановлено значне зниження товариськості та інтересу до соціальної новизни у щурів 3-ї групи порівняно з 1-ю. Продемонстровано відсутність впливу блокування ПАР1 на параметри соціальної поведінки щурів як за контрольних умов, так і при моделюванні ЕС. Зниження товариськості загалом та інтересу до соціальної новизни у тварин з ЕС узгоджується із даними попередніх експериментів, проведених із використанням різних моделей нападів, а також відповідає клінічним спостереженням психічних порушень при епілепсії [12]. Клітинні механізми, що лежать в основі формування соціальної поведінки, залишаються не до кінця з'ясованими, але відомо про залучення лобової та скроневої часток кори, гіпокампа, мигдалеподібного тіла тощо [13]. Дані клі-

нічних спостережень вказують на те, що у хворих на епілепсію часто спостерігаються психоемоційні розлади соціальної поведінки, такі як соціальна тривожність, соціальна інгібіція, підвищений рівень агресії [12]. Вважається, що вони викликані порушеннями у лімбічній системі. Зниження інтересу до спілкування при епілепсії також може бути спричинено депресивними розладами [14]. Соціальна поведінка як комплексний процес залежить від скоординованої роботи різних відділів ЦНС, водночас епілептичні стани пов'язані з порушенням балансу між збуджувальною та гальмівною системами. Важливу роль у сприйнятті та формуванні відповіді на соціальні подразники відіграє лобова частка кори головного мозку. Було продемонстровано, що саме розбалансованість зв'язків цієї ділянки з іншими відділами мозку може лежати в основі розвитку РАС [15]. Окрім того, одним з механізмів розвитку епілепсії вважається порушення в обміні триптофану [16], в результаті чого в мозку знижується вміст серотоніну та збільшується кінуреніну, що призводить до підвищення збудливості нейронних мереж. Було показано, що порушення соціальної поведінки може бути пов'язано із виснаженням серотонінергічної системи кори лобової частки кори [17].



Вплив блокування протезаоактивованих рецепторів першого типу (ПАР1) на соціальну поведінку дослідних тварин. а – рівень товариськості; б – реакція на соціальну новизну; в – загальна соціальна взаємодія. а: 1 – час, проведений з об'єктом, 2 – час, проведений за соціальною взаємодією; б: 1 – час, проведений зі знайомою твариною, 2 – час, проведений з «незнайомцем». \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$

У нашому дослідженні вперше продемонстровано, що блокування PAR1 не впливає на характеристики соціальної поведінки дослідних тварин за контрольних умов і щурів після ЕС. Відсутність впливу пригнічення активності PAR1 на поведінку щурів за контрольних умов узгоджується із даними наших попередніх праць, присвячених дослідженню ролі PAR1-опосередкованої сигналізації на афективну поведінку. Електрофізіологічні дослідження на нейронах гіпокампа [18, 19] також демонструють відсутність ефекту блокування PAR1 на роботу нервових мереж у контролі. Слід зазначити, що за умов моделювання епілепсії блокування PAR1 впродовж перших 10 днів після ЕС призводило до нормалізації тривожної поведінки та емоційно-зумовленої пам'яті у щурів на хронічній стадії розвитку набутої епілепсії [4]. Встановлено зниження реакції тварин з нокаутом гена F2R, який кодує експресію PAR1, у тесті на пасивне уникання та збільшення часу завмирання у тесті на формування умовної реакції страху [18, 20]. Введення блокатора PAR1 безпосередньо до мигдалеподібного ядерного комплексу також призводило до збільшення часу завмирання у тесті на формування реакції страху у мишей [20]. Ці дані вказують на залучення PAR1 в обробку сигналів в ядрах мигдалеподібного тіла. В інших дослідженнях продемонстровано залучення PAR1 у роботу гіпокампа [18, 21]. Ми припускаємо, що диференціальний характер впливу блокування PAR1 на різні форми поведінки тварин після ЕС пояснюється нерівномірним вкладом PAR1-опосередкованої сигналізації у функціонування окремих відділів ЦНС.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**М.А. Семенихина, Р.И. Боговик, М.П. Федорюк, О.В. Стасишин, А.В. Савотченко, Е.В. Исаева**

### **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКАДА ПРОТЕАЗОАКТИВИРОВАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВОГО ТИПА НЕ ВЛИЯЕТ НА СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПОСЛЕ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА**

Данная работа посвящена исследованию роли протеазоактивированных рецепторов 1 (PAR1) в модуляцию социального поведения крыс после эпилептического статуса (ЕС). С использованием литий-пилокарпиновой модели ЕС показано значительное снижение общительности и интереса к социальной новизне у крыс на четырнадцатый день после ЕС, что является характерным расстройством, которое сопровождает развитие эпилепсии, причем животные с ЕС проводили гораздо меньше времени ( $5,85 \pm 1,11$  % от общего времени в экспериментальной камере) с «социальным» раздражителем, чем контрольная группа животных ( $15,04 \pm 1,59$  %). Впервые показано, что блокирование PAR1 не влияет на характеристики социального поведения подопытных животных как в контрольных условиях, так и в условиях моделирования ЕС, что свидетельствует об отсутствии вовлечения этих рецепторов в механизмы формирования социального поведения крыс. Ключевые слова: протеазоактивированные рецепторы 1; социальное поведение; эпилептический статус; литий-пилокарпиновая модель.

**M.O. Semenikhina, R.I. Bogovyk, M.P. Fedoriuk, O.V. Stasyshyn, A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva**

### **PROTEASE-ACTIVATED RECEPTOR 1 INHIBITION DOES NOT AFFECT THE SOCIAL BEHAVIOR AFTER STATUS EPILEPTICUS IN RAT**

The present work is devoted to the study of protease-activated receptor 1 (PAR1) contribution to the modulation of social behavior in rats after SE. Using the lithium-pilocarpine model, we demonstrated a significant decline in sociality and social novelty in rats two weeks after SE, what is common comorbid condition for epilepsy. SE group spent less time ( $5.85 \pm 1.11$ % of total time in the experimental chamber) with «social» stimulus comparing to the control ( $15.04 \pm 1.59$ %). We also have shown for the first time that PAR1 inhibition does not affect the social behavior of experimental animals both under control and SE conditions, which indicates the absence of the involvement of this receptor in the mechanisms of the social behavior formation in rat.

Key words: protease-activated receptor 1; social behavior; epileptic status; lithium-pilocarpine model.

## REFERENCES

1. Tuchman R, Rapin I. Review: Epilepsy in autism. *Epilepsia*. 2002;43:352-8.
2. Besag FMC. Epilepsy in patients with autism: links, risks and treatment challenges. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:1-10.
3. Chao H, Chen H, Samaco RC, et al. GABAergic dysfunction mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*. 2011;468:263-9.
4. Bogovik R, Fedoriuk M, Isaev D, Krishtal O, Holmes GL, Isaeva E. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2017;67:66-9.
5. Isaev D, Lushnikova I, Lunko O, Zapukhliak O, Maximyuk O, Romanov A, Skibo GG, Tian C, Holmes GL, Isaeva E. Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis. *Neurobiol Dis*. 2015;78:68-76.
6. Breder È, Striggow F, Riek-burchardt M, Kiesel A, Schmidt W, Henrich-noack P, Krug M, Reymann KG, Reiser G. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci*. 2001;14:595-608.
7. Junge CE, Lee CJ, Hubbard KB, Zhang Z, Olson JJ, Hepler JR, Brat DJ, Traynelis SF. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Exp Neurol*. 2004; 188:94-103.
8. Han K, Mannaioni G, Hamill CE, Lee J, Junge CE, Lee CJ, Traynelis SF. Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Mol Brain*. 2011; 1-12.
9. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical modification of after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1972;32:281-94.
10. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *J Vis Exp*. 2011; 1-6.
11. Crawley JN. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2004;10:248-58.
12. Trimble M. Treatment issues for personality disorders in epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54:41-5.
13. Kim Y, Venkataraju KU, Pradhan K, et al. Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Rep*. 2015;10:292-305.
14. Mula M. Treatment of anxiety disorders in epilepsy: An evidence-based approach. *Epilepsia*. 2013;54:13-8.
15. Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism - a developmental perspective. *J Anat*. 2017;230:4-15.
16. Chugani HT, Chugani DC. Imaging of Serotonin Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2005;5:201-6.
17. Kondziella D, Alvestad S, Vaaler A, Sonnewald U. Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression? *J Neurochem*. 2007;103:2136-52.
18. Almonte AG, Qadri LH, Sultan FA, Watson JA, Mount DJ, Rumbaugh G, Sweatt JD. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *J Neurochem*. 2013;124(1):109-22.
19. Semenikhina M, Bogovik R, Fedoriuk M, Nikolaienko O, Alkury LT, Savotchenko A, Krishtal O, Isaeva E. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus. *Neurosci Lett* 2019;692:64-68.
20. Bourgognon JM, Schiavon E, Salah-Uddin H, et al. Regulation of neuronal plasticity and fear by a dynamic change in PAR1-G protein coupling in the amygdala. *Mol Psychiatry*. 2013;18:1136-45.
21. Maggio N, Itsekson Z, Ikenberg B, Strehl A, Vlachos A, Blatt I, Tanne D, Chapman J. The anticoagulant activated protein C (aPC) promotes metaplasticity in the hippocampus through an EPCR-PAR1-S1P1 receptors dependent mechanism. *Hippocampus*. 2014;24:1030-8.

*Матеріал надійшов  
до редакції 10.09.18*