

Вплив блокади ASIC-каналів головного мозку на гіпокампальний θ -ритм щурів у моделі «відкрите поле»

М.П. Федорюк¹, А.О. Чернінський¹, О.П. Максимюк¹, Д.С. Ісаєв¹, Р.І. Боговик¹, А.В. Венгреньок¹, О.М. Бойко², О.О. Кришталь¹

¹ Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ,

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: am@biph.kiev.ua

Досліджували вплив новітнього антагоніста протон-чутливих каналів ASIC (сполуки 5b) на інтегральний електричний сигнал гіпокампа щурів при проходженні тваринами тесту «відкрите поле». Аналіз зареєстрованих електроенцефалограм показав, що у тварин, які знаходилися під дією 10 мкмоль/кг 5b, значно знижувалася частота гіпокампального θ -ритму, що притаманно анксиолітикам - фармакологічним агентам (бензодіазепіни, барбітурати тощо), котрі використовуються у медицині як препарати проти тривожних станів. Поведінка тварин під впливом 5b також суттєво відрізнялася від контролю: у щурів із пригніченими ASIC-каналами була знижена локомоторна функція, що також схоже на дію великої дози анксиолітика. За допомогою новітнього ортостеричного антагоніста ASIC-каналів нами вперше охарактеризовано фармакологічний ефект їх блокади на електричну активність гіпокампа та поведінкові реакції щурів. Наші результати підтверджують дані попередніх досліджень щодо участі ASIC-каналів у регуляції поведінкових реакцій та таких негативних емоційних станів, як тривожність та депресія.

Ключові слова: ASIC-канали; електроенцефалограма; «відкрите поле»; речовина 5b.

ВСТУП

З моменту відкриття “рецепторів до протонів” [1], які згодом були клоновані групою французьких дослідників [2] і отримали назву ASIC-каналів, пройшло більше ніж три десятиліття, проте повна картина їх функціональної ролі у периферичній та центральній нервовій системі досі залишається нез’ясованою. Активація ASIC-каналів спричиняє транзйентний іонний трансмембранний струм, що знижується протягом декількох секунд навіть за умов підтримання кислого середовища внаслідок процесу десенситизації. Останні дослідження вказують на те, що вони задіяні у багатьох неврологічних та психічних розладах [3-6], проте штучних селективних лігандів цих каналів, котрі можна було би застосувати як терапевтичні агенти, досі не знайдено. ASIC задіяні у фізіологіч-

них процесах пам’яті, навчання тощо [5, 7], а отже потенційний фармакологічний агент має бути спрямований на пригнічення функції ASIC-каналів, що активовані патологічними чинниками, при цьому не впливаючи на їх функцію у нормі. Нами було розроблено селективний ортостеричний антагоніст ASIC1a-каналів (сполука 5b [8, 9]), що пригнічує їхню активність у субмікромолярному концентраційному діапазоні. Активність 5b на три порядки вища, коли ASIC-струми активуються незначним закисленням (pH 6,7; подібні значення спостерігаються в осередках епілептичної активності та фокальної ішемії), порівняно з активацією сильним закисленням (pH 5,0, може виникати у синаптичній щілині під час нейронної активності).

Нещодавно нами було показано, що блокада активності ASIC1a-каналів за допомо-

© М.П. Федорюк, А.О. Чернінський, О.П. Максимюк, Д.С. Ісаєв, Р.І. Боговик, А.В. Венгреньок, О.М. Бойко, О.О. Кришталь

гою 5b призводить до суттєвого пригнічення епілептичної активності як на зрізах мозку шурів, так і на тваринних моделях [10]. Ці дані були отримані на двох експериментальних моделях епілепсії: низькомагнієвій (*in vitro*) та каїнатній (*in vivo*). В обох випадках введення 1 мкмоль/л антагоніста призводило до майже повного пригнічення епілептичної активності.

Як було зазначено вище, ASIC-канали залучені у регуляції багатьох фізіологічних та патофізіологічних процесів, що відбуваються у ЦНС, а отже їхнє пригнічення ймовірно впливатиме на активність певних структур мозку, що в свою чергу, може супроводжуватися певними змінами у поведінці. Відомо, що гіпокамп бере участь у процесах навчання, запам'ятовування та реагування на новизну, а його нейрони характеризуються високим рівнем експресії ASIC1a-каналів [11].

Мета цієї роботи - вивчення впливу сполуки 5b на θ -ритм та поведінкові реакції тварин у моделі «відкрите поле».

МЕТОДИКА

Досліди проводили на білих лабораторних шурах лінії Вістар віком 90-120 днів від народження на момент початку експерименту. Тварин утримували в приміщенні із контрольованою температурою та циклом освітлення (22°C, світла фаза починалася о 20:00 і тривала 12 год), їжа і вода були доступні *ad libitum*. Усі тести виконували між 9:00 та 18:00. Досліди проводилися згідно з існуючими міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин, зокрема Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV.

Хірургічну операцію здійснювали під загальним наркозом (ін'єкція суміші кетаміну та ксилазіну 80/8 мг/кг внутрішньоочеревинно). Електроди імплантували у лівий гіпокамп (A -3.5, L -1.8, H -2.9 від брегми). Референтний електрод розташовували у

мозочку. Термін відновлення після операції становив не менше, ніж один тиждень. Реєстрацію електричної активності гіпокампа проводили за допомогою бездротового пристрою Neurologger («NewBehavior AG», Швейцарія). Прилад під'єднували до голови тварини перед початком експерименту, після чого автоматично розпочиналася реєстрація ЕЕГ у внутрішню пам'ять пристрою. Частота дискретизації становила 489 Гц. Аналіз електричної активності гіпокампа здійснювали офлайн за допомогою пакета Matlab (MathWorks, Inc, [12]), спектральну густину потужності ЕЕГ визначали за алгоритмом Welch з 10-секундними епохами та порівнювали її в діапазоні 1-50 Гц.

Тварин розділили на дві групи по 10 в кожній: контрольну та дослідну. Тварин останньої піддавали дії антагоніста ASIC1a-каналів. Пригнічення активності цих каналів досягалося за допомогою внутрішньоочеревинного введення 10 мкмоль/кг сполуки 5b [8]. На початку експерименту всі тварини знаходилися в домашній клітці. Після приєднання Neurologger дослідну тварину повертали назад у клітку. Через 20 хв після цього здійснювали ін'єкцію фізіологічного розчину або 5b і знову їх поміщали до домашньої клітки. Після 20 хв розпочинали проведення поведінкового тесту «відкрите поле». Експериментальна установка для цих дослідів являла собою квадратний пластиковий бокс розміром 1x1 м, умовно розділений на внутрішній та зовнішній сегменти. Межа між сегментами була визначена на відстані 25 см від стінок установки. Тварину поміщали в центр боксу і здійснювали відеореєстрацію її поведінки протягом 5 хв. Отримані відеозаписи аналізували за допомогою автоматизованої процедури AutoTyping, реалізованої в середовищі Matlab [13], для визначення сумарного переміщення та часу перебування тварин у внутрішньому та зовнішньому сегментах.

Для порівняння пов'язаних вибірок використовували непараметричний критерій Вілкоксона, для незалежних вибірок — кри-

терій Манна-Вітні. Результати представлені у вигляді Me [LQ; HQ], де Me – медіана, LQ – нижній кuartиль, HQ – верхній кuartиль розподілу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз поведінки тварин у відкритому полі виявив, що сполука 5b істотно впливала на загальний рівень локомоторної активності. Так, сумарний пройдений шлях становив 2,98 [2,63; 3,18] м у контрольних та 1,30 [1,07; 2,33] м у тварин під дією 5b ($P=0,0054$; рис. 1). Значущих відмін інших параметрів поведінки в тесті “відкрите” поле не виявлено. Тривалість часу, проведеного у зовнішній частині арени, становила 284 [267; 286] с у контрольних та 299 [282; 300] с у дослідних тварин ($P=0,06$); тривалість часу, проведеного в центральній частині арени - 17 [14; 33] с та 1 [0; 18] с відповідно ($p=0,06$). Такі зміни у локомоторній активності є характерними для седативних речовин, що потенціюють гальмівну систему мозку, зокрема, бензодіазепінів [14, 15].

Відомо, що головним молекулярним механізмом гальмування у нейронних мережах

гіпокампа є активація рецепторів ГАМК. Нещодавно нами було показано, що пригнічення активності ASIC-каналів підвищує частоту гальмівної синаптичної передачі та зменшує частоту виникнення епілептиформних явищ [10]. Вищенаведене дає змогу зробити висновок, що ASIC-канали у гіпокампі виконують збуджувальну функцію на системному рівні. Така особливість зв'язку їх та рецепторів ГАМК дала можливість нам висунути гіпотезу про те, що зменшення активності ASIC у гіпокампі може суттєво впливати на профіль електричної активності цієї структури аналогічно до синергетичної взаємодії ацетилхолінових та ГАМК-рецепторів [16]. Також відомо, що ГАМК-провідність відіграє істотну роль у генерації θ -ритму, який, в свою чергу, пов'язаний із особливостями дослідницької діяльності тварин [17]. У зв'язку з цим ми вирішили проаналізувати зміни електричної активності гіпокампа під впливом антагоніста ASIC-каналів. Для аналізу були доступні ЕЕГ 8 щурів у кожній з груп.

Порівняння гіпокампальної електричної активності під час перебування у звичній (“домашній”) клітці перед початком поведінкового тесту не виявило статистично значу-



Рис. 1. Репрезентативні траєкторії переміщення тварин в експериментальній установці “відкрите поле”. Зліва – контроль (тварина №5), справа – під дією сполуки 5b (тварина №15)

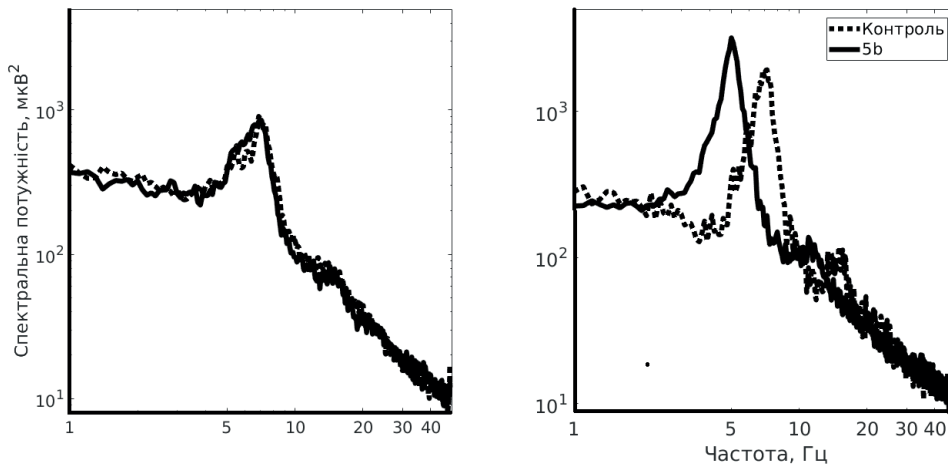


Рис. 2. Усереднені спектри потужності електричної активності гіпокампа у щурів контрольної та дослідної (під дією сполуки 5b) груп під час перебування в домашній клітці на початку експерименту (зліва) та у відкритому полі (справа)

щої різниці між тваринами контрольної та дослідної груп. Так, у щурів обох груп ЕЕГ гіпокампа характеризувалася домінуванням θ -активності із частотою 7,9 [6,6; 8,0] Гц та 7,3 [6,5; 8,1] Гц ($P=0,54$; рис. 2) у контрольній та дослідній групі відповідно. Сумарна потужність θ -діапазону (4-10 Гц) становила у контрольній групі 1267 [756; 3644] мкВ^2 та у дослідній 1905 [1098; 4835] мкВ^2 ($P=0,79$). Під час виконання тесту “відкрите поле” вона залишилася однаковою у тварин обох груп: 1345 [656; 5263] мкВ^2 у контрольних та 3004 [1094; 4553] мкВ^2 у тварин під дією сполуки 5b ($P=0,84$). Натомість істотно знизилася частота θ -активності: 7,9 [7,6; 8,1] Гц у контрольних тварин та 6,1 [6,0; 6,3] Гц на фоні дії 5b ($P=0,0043$; рис. 2). Зниження частоти θ -ритму, незалежно від клітинного механізму його генерації, є маркером для речовин, що мають анксиолітичну дію [18], таких як опіоїди, барбітурати, бензодіазепіни, 5-HT_{1A}-агоністи та селективні блокатори зворотного захоплення серотоніну.

ВИСНОВКИ

Зарєєстровані в наших експериментах міжгрупові відмінності у поведінці узгоджуються з вищенаведеними змінами у електричній

активності гіпокампа. Відомо, що частота θ -ритму позитивно корелює зі швидкістю локомоції гризунів [19]. Сполука 5b суттєво не порушує функціонування фізіологічних механізмів генерації θ -активності гіпокампа, проте призводить до значних змін домінуючої частоти, що швидше за все є наслідком збільшення гальмівної активності. Зазвичай дія анксиолітиків у терапевтичних дозах супроводжується підвищеною локомоторною активністю, яка знижується зі збільшенням концентрації діючої речовини [14, 20]. Було виявлено, що зниження активності ASIC-каналів призводить до зниження як домінуючої частоти θ -ритму, так і загального рівня локомоторної активності в тесті “відкрите поле”. Це може бути свідченням того, що активність таких каналів впливає на рівень тривожності, а отже фармакологічна маніпуляція ASIC-каналами має перспективи бути використаною як нова стратегія боротьби з депресивними та тривожними станами.

ПОДЯКА

Ця робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України (грант Ф76/85). Автори виражають велику подяку доктору Володимиру Сукачу за синтез необхідної кількості сполуки 5b.

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 co-authors of the article.

**M.P. Fedoriuk¹, A.O. Cherninskiy¹,
O.P. Maximyuk¹, D.S. Isaev¹, R.I. Bogovyk¹,
A.V. Venhreniuk¹, O.M. Boyko², O.O. Krishtal¹**

INHIBITION OF BRAIN ASICS AFFECTS HIPPOCAMPAL THETA-RHYTHM AND OPEN-FIELD BEHAVIOR IN RATS

The acid-sensing ion channels (ASICs) are present on the cellular membranes of virtually all mammalian central neurons, but their physiological role still remains to be discovered. Here, we described the effect of novel orthosteric ASIC antagonist, compound 5b, on rat's hippocampal integral electrical signal exposed to the open field behavior test. The analysis of experimental rat's EEGs revealed that 5b-administered animals demonstrate substantial decrease in theta rhythm frequency. Lowering the theta rhythm frequency is specific for anxiolytics - pharmacological agents (e.g. benzodiazepines, barbiturates, etc.), that are used in medicine for anxiety-related disorders treatment. Under 5b, the animal behavior was also significantly altered from that in control: in rats with suppressed ASIC channels, the locomotor function was reduced similarly to the effect of a large dose of anxiolytics. Using small-molecule orthosteric ASIC antagonist, we characterized for the first time the effect of pharmacological blockade of these channels on electrical activity of hippocampus and behavioral reactions of rats. Our data support the results of previous studies on the participation of ASIC channels in regulation of behavioral reactions and negative emotional states such as anxiety and depression.

Key words: ASIC; EEG; open-field; compound 5b.

¹*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;*

²*Taras Shevchenko National University of Kyiv; e-mail: am@biph.kiev.ua*

REFERENCES

1. Krishtal OA, Pidoplichko VI. A receptor for protons in the nerve cell membrane. *Neuroscience*. 1980;5(12):2325-7.
2. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*. 1997;386(6621):173-7.
3. Chu XP, Xiong ZG. Acid-sensing ion channels in pathological conditions. *Adv Exp Med Biol*. 2013;961:419-31.
4. Grunder S, Chen X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): focus on ASIC1a. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2010;2(2):73-94.
5. Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. Acid-sensing ion

- channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci*. 2006;29(10):578-86.
6. Yin T, Lindley TE, Albert GW, Ahmed R, Schmeiser PB, Grady MS, et al. Loss of Acid sensing ion channel-1a and bicarbonate administration attenuate the severity of traumatic brain injury. *PLoS One*. 2013;8(8):e72379.
7. Benarroch EE. Acid-sensing cation channels: structure, function, and pathophysiological implications. *Neurology*. 2014;82(7):628-35.
8. Buta A, Maximyuk O, Kovalsky D, Sukach V, Vovk M, Ievglevskiy O, et al. Novel Potent Orthosteric Antagonist of ASIC1a Prevents NMDAR-Dependent LTP Induction. *J Med Chem*. 2015;58(11):4449-61.
9. Sukach VA, Buta AZ, Maksymiuk OP, Koval's'kyi DB, Vovk MV, Kryshstal OO. [(3-carboxamidino-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-4-guanidinobenzoates are novel blockers of pH-sensitive ion channels]. *Fiziol Zh*. 2011;57(6):31-7.
10. Ievglevskiy O, Isaev D, Netsyk O, Romanov A, Fedoriuk M, Maximyuk O, et al. Acid-sensing ion channels regulate spontaneous inhibitory activity in the hippocampus: possible implications for epilepsy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;371(1700).
11. Schuhmacher LN, Smith ES. Expression of acid-sensing ion channels and selection of reference genes in mouse and naked mole rat. *Mol Brain*. 2016;9(1):97.
12. Cherninskii AA, Piskorskaya NG, Zima IG, Krizhanovskii SA, Makarchouk NY. Individual/Typological Peculiarities of EEG Rearrangements in Humans Related to the Analysis of Olfactory Information: Role of Extroversion/Introversion. *Neurophysiology*. 2010;42(1):63-9.
13. Patel TP, Gullotti DM, Hernandez P, O'Brien WT, Capehart BP, Morrison B, 3rd, et al. An open-source toolbox for automated phenotyping of mice in behavioral tasks. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:349.
14. Djeridane Y, Lemmer B, Touitou Y. Diazepam affects both level and amplitude of rat locomotor activity rhythm but has no effect on core body temperature. *Chronobiol Int*. 2005;22(6):975-85.
15. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1-3):3-33.
16. Takács VT, Cserép C, Schlingloff D, Pósfai B, Szőnyi A, Sos KE, et al. Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states. *Nat Commun*. 2018;9(1):2848.
17. Hoeller AA, Duzzioni M, Duarte FS, Leme LR, Costa AP, Santos EC, et al. GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. *Brain Res*. 2013;1532:21-31.
18. McNaughton N, Kocsis B, Hajos M. Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? *Behav Pharmacol*. 2007;18(5-6):329-46.
19. Shin J, Talnov A. A single trial analysis of hippocampal theta frequency during nonsteady wheel running in rats. *Brain Res*. 2001;897(1-2):217-21.
20. Hughes RN. Effects on open-field behavior of diazepam and buspirone alone and in combination with chronic caffeine. *Life Sci*. 1993;53(15):1217-25.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.11.2018*