

Селективний антагоніст протеазоактивованих рецепторів 1 нормалізує рівень емоційної збудливості щурів у латентній стадії формування скроневої епілепсії

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

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України; e-mail: marharyta.semenikhina@gmail.com

Досліджували ефект фармакологічного блокування протеазоактивованого рецептора 1 (ПАР1) на рівень емоційної збудливості щурів на 14-ту добу після епілептичного статусу (ЕС). З використанням серії тестів: тесту на наближення, доторк та піднімання, показано, що блокування ПАР1, основного тромбінового рецептора у ЦНС, призводить до нормалізації емоційної збудливості щурів у латентній стадії формування скроневої епілепсії в літій-пілокарпіновій моделі ЕС (у тесті на піднімання, який вважається найбільш чутливим серед використаних у роботі: $2,4 \pm 0,3$ бала порівняно з $3,5 \pm 0,58$ бала для групи після ЕС). Вперше було продемонстровано ефект блокування ПАР1 на емоційну збудливість на ранніх етапах формування епілепсії.

Ключові слова: протеазоактивований рецептор 1; літій-пілокарпінова модель; епілептичний статус; емоційна збудливість.

ВСТУП

Супутні психоневрологічні розлади часто супроводжують розвиток епілепсії. У першу чергу вражаються структури лімбічної системи, що призводить до таких психоемоційних проблем, як тривожність, депресія, соціальна інгібіція тощо [1]. У хворих підвищується больовий поріг, погіршуються когнітивні здібності та пам'ять, більшість пацієнтів відмічає зниження якості життя у зв'язку зі змінами психоемоційних реакцій. Деякі пацієнти більше страждають від вторинних наслідків патології, аніж безпосередньо від нападів, тому важливим у лікуванні епілепсії є не лише зниження кількості та інтенсивності нападів, але й зменшення прояву супутніх захворювань.

Нині скронева епілепсія травматичного генезу є найбільш розповсюдженою формою

цієї патології. Хвороба розвивається внаслідок порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єра після ураження мозку внаслідок травми, ішемії тощо. Нещодавно було показано, що блокування протеазоактивованого рецептора першого типу (ПАР1) в період епілептогенезу має протисудомний ефект та призводить до нормалізації тривожності та емоційнозумовленої пам'яті у щурів після епілептичного статусу (ЕС) [2,3]. Залучення ПАР1 у модуляцію емоційних реакцій продемонстровано як з використанням фармакологічної блокади ПАР1, так і у тварин з нокаутом гена F2R, який кодує експресію ПАР1, тому логічним було зосередити увагу на ефекті фармакологічної блокади ПАР1 на емоційнозумовлену поведінку після ЕС [4,5].

Метою нашої роботи було дослідження впливу фармакологічної блокади ПАР1 на емоційну поведінку щурів.

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

МЕТОДИКА

Досліди проводили на щурах лінії Вістар віком 27 діб, яких розподілили на чотири групи: 1-ша – контрольні (n = 15), 2-га – тварини після ЕС (n = 10), 3-тя – контрольні тварини, які отримували ін'єкції селективного антагоніста ПАР1 (n = 10) та 4-та – тварини після ЕС, які отримували ін'єкції селективного антагоніста ПАР1 (n = 14). Усі експериментальні процедури було проведено згідно з Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, що використовувалися в експериментальних чи інших наукових цілях та статтею 26 закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (21.02.2006). Ми використовували літій-пілокарпінову модель ЕС, яка відображає порушення гематоенцефалічного бар'єра, та застосовували тести на емоційну збудливість, результати яких використовуються як перші маркери розвитку епілепсії у тварин [6].

Моделювання епілепсії. Для моделювання ЕС використовували літій-пілокарпінову модель скроневої епілепсії. За 20-22 год до ін'єкцій пілокарпіну внутрішньоочередово вводили хлорид літію (127 мг/кг) розведений у 0,9 %-му розчині хлориду натрію з розрахунку 1 мл/кг. Ін'єкції пілокарпіну здійснювали з інтервалом 30 хв з початковою дозою 40 мг/кг та наступними дозами 10 мг/кг. Якщо ЕС не спостерігався після введення 60 мг/кг пілокарпіну, тварину вилучали з експерименту. Введення пілокарпіну припиняли після розвитку судом 4-5 стадії (ЕС) за шкалою Расіна [7]. Епілептичні напади зупиняли через 60 хв з початку ЕС ін'єкцією діазепаму (40 мг/кг). Через 15 хв після припинення ЕС щурам вводили селективний антагоніст ПАР1 (SCH79797, 25 мкг/кг, внутрішньоочередово) або відповідний об'єм 0,9 %-го розчину хлориду натрію. Протягом наступних 10 діб ін'єкції антагоніста ПАР1 здійснювали один раз на день. Контрольним тваринам замість

пілокарпіну вводили 0,9 %-й розчин хлориду натрію в еквівалентному об'ємі.

Тести на збудливість. Усіх тварин тестували у власних клітках длянівелювання реакції на незнайоме середовище. Між експериментальними процедурами вони відпочивали щонайменше 5 хв. Тести проводили у порядку підвищення інтенсивності ймовірної емоційної реакції, щоб уникнути впливу на результати менш чутливих тестів. Шкала тестів характеризувала реакції від нейтральних до тривожнісних та агресивних.

Тест на наближення визначав характер реакції тварини на неживий предмет (скляна паличка тощо), що з'являвся у полі її зору. Результати тесту оцінювали за балами: немає реакції на предмет (нейтральна реакція, 1 бал); оберт у напрямку до предмета та його обнюхування (дослідницька реакція, 2 бали); уникання предмета (реакція уникання, 3 бали); завмирання (реакція страху, 4 бали); стрибок геть від предмета (5 балів); стрибок у напрямку до предмета чи напад на нього (агресивна реакція, 6 балів).

Тест на доторк визначав реакцію тварини на неочікуваний доторк паличкою позаду. Результати тесту оцінювали балами: немає реакції на дотик (нейтральна реакція, 1 бал); оберт до предмета (дослідницька реакція, 2 бали); уникання предмета (3 бали); завмирання (реакція страху, 4 бали); тварина здригається від торкання і розвертається у напрямку до предмета (5 балів); розвертання та стрибок геть від предмета (реакція уникання, 6 балів); стрибок від предмета з вокалізацією (7 балів).

Тест на піднімання визначав характер реакції на підняття щура експериментатором. Результати тесту оцінювали балами: немає реакції (нейтральна реакція, 1 бал); піднімання легке, але з вокалізацією (2 бали); виникають складнощі, оберт у напрямку до руки (3 бали); завмирання з або без вокалізації (реакція страху, 4 бали); підняти важко, втеча від руки (реакція уникання, 5 балів); оборонна позиція, тварина може

атакувати руку (агресивна реакція, 6 балів).

Статистичний аналіз. Аналіз результатів проводили з використанням програми Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA). Різницю між групами визначали за допомогою критерію Краскера-Уолліса з post-hoc-аналізом за допомогою тесту Дана. Результати вважали значущими при $P < 0,05$.

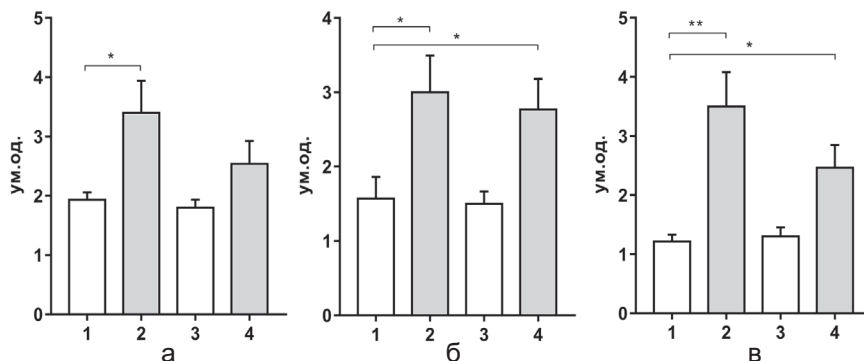
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено статистично вірогідну різницю між 1-ю та 2-ю групами в усіх тестах ($P < 0,05$), що збігається з літературними даними для літій-пілокарпінової моделі [6]. Окрім того, ці результати узгоджуються з даними, отриманими за допомогою хендлінг-тесту, який відображує відповідні показники емоційної збудливості тварин: після ЕС вони стають більш збудливими та часто агресивними [8]. Між 1-ю та 3-ю групами не виявлено значущої різниці ($P > 0,05$, в усіх тестах), що свідчить про відсутність ефекту ін'єкцій селективного антагоніста ПАР1 для контрольних тварин. Між 1-ю та 4-ю групами не спостерігали значущої різниці у тесті на наближення ($P > 0,05$, див. рисунок, а), що говорить про позитивний ефект блокування ПАР1 у тварин після ЕС. У тесті на доторк не було виявлено позитивного ефекту блокування ПАР1 для тварин після ЕС (див. рисунок, б). А у тесті на піднімання, який вважається найбільш чутливим в цій серії

тестів [6], знижувався рівень збудливості у тварин 4-ї групи порівняно зі щурами 2-ї групи (різниця між 1-ю та 2-ю групами $P = 0,001$, між 1-ю та 4-ю групами $P = 0,04$, див. рисунок, в).

Продемонстровано позитивний ефект блокування ПАР1 на емоційний стан щурів через 14 днів після ЕС, але водночас попередні дані показують, що для хронічного стану (8 тиж після ЕС) такий ефект не зберігається [9]. Тобто блокування ПАР1 суттєво покращує стан тварин саме на початкових етапах розвитку хвороби. Для травматичної епілепсії висувуються ідеї відносно терапевтичного втручання в першу годину після травми [10], а результати щодо блокування ПАР1 гіпотетично можуть бути використані для посттравматичної терапії пацієнтів. Також у попередніх працях ми показали, що блокування ПАР1 під час епілептогенезу призводить до нормалізації рівня тривожності у латентній та хронічній стадіях скроневої епілепсії, нормалізації формування афективної пам'яті та синаптичної пластичності гіпокампа, але не впливає на просторову пам'ять та соціальну поведінку [2,11,12].

Наразі актуальною залишається проблема пошуку нових фармакологічних мішеней для поліпшення перебігу епілепсії. ПАР1-опосередкована сигнальна система бере участь у багатьох нервових процесах. У моделях нікотинової та морфінової залежностей активація ПАР1 на дофамінергічних нейронах регулює



Вплив блокування протеазоактивованого рецептора першого типу на емоційну збудливість дослідних тварин. а – тест на наближення, б – тест на доторк, в – тест на піднімання. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$

нікотиніндуковані дофамінові викиди [13]. Активація ПАР в астроцитах призводить до везикулярного вивільнення глутамату, і, таким чином, впливає на функціонування НМДА-рецепторів [14]. Отже ПАР може діяти на синаптичну пластичність та поведінкові реакції через посередницькі процеси у тристоронніх синапсах [15].

Поведінкові тести демонструють залученість ПАР1-опосередкованої сигналізації у роботу гіпокампа та мигдалеподібного ядерного комплексу [4,16]. У тесті на пасивне уникання показано зниження реакції у тварин з нокаутом гена F2R, який кодує експресію ПАР1 [17]. Введення блокатора ПАР1 до мигдалеподібного ядерного комплексу призводило до збільшення часу завмирання у тесті на формування реакції страху у мишей [18].

Позитивний вплив блокування ПАР1 на емоційну поведінку загалом та емоційну збудливість після ЕС зокрема можна пояснити різними механізмами, що потребує подальшого дослідження.

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, А.А. Лунько, А.В. Савотченко,
Е.В. Исаева**

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКАДА ПРОТЕАЗОАКТИВИРУЕМЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1 НОРМАЛИЗУЕТ УРОВЕНЬ ЭМОЦИОНАЛЬНОЙ ВОЗБУДИМОСТИ КРЫС В ЛАТЕНТНОЙ СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Исследовали эффект фармакологической блокады протеазоактивированного рецептора 1 (ПАР1) на уровень эмоциональной возбудимости крыс на 14-е сутки после эпилептического статуса (ЭС). С использованием серии тестов на поведенческую возбудимость (теста на приближение, прикосновение и подъем) показано, что

блокирование ПАР1, основного тромбинового рецептора в ЦНС, приводит к нормализации эмоциональной возбудимости крыс в латентной стадии формирования височной эпилепсии в литий-пилокарпиновой модели ЕС (в тесте на подъем, который считается наиболее чувствительным среди использованных в работе: $2,4 \pm 0,3$ балла по сравнению с $3,5 \pm 0,58$ балла для группы после ЕС). Впервые был продемонстрирован эффект блокировки ПАР1 на эмоциональную возбудимость на ранних этапах формирования эпилепсии.

Ключевые слова: протеазоактивируемые рецепторы 1; литий-пилокарпиновая модель; эпилептический статус; эмоциональная возбудимость.

**M. Semenikhina, R. Bogovik, M. Fedoryuk,
O. Lunko, A Savotchenko, E. Isaeva**

PHARMACOLOGICAL BLOCKADE OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTORS 1 NORMALIZES BEHAVIORAL HYPEREXCITABILITY OF RATS IN THE LATENT STAGE OF THE EXPERIMENTAL MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Temporal lobe epilepsy (TLE) leads to variety of neuropsychological comorbidities, which may have severe impact on social and emotional well-being and significantly reduce the overall quality of life. In the present study, we demonstrate the effect of blocking protease-activated receptor 1 (PAR1), the main thrombin receptor in the central nervous system, on hyperexcitability in the early stages of epilepsy formation. We showed that inhibition of PAR1 leads to the normalization of behavioral hyperexcitability of rats in the latent stage of temporal lobe epilepsy in the lithium-pilocarpine model of status epilepticus (SE) (in the pick-up test which is considered as the most sensitive among tests used in the work: 2.4 ± 0.3 points compared to 3.5 ± 0.58 points for the group after SE). The obtained results correlate with previous studies of the effect of PAR1 inhibition on animal behavior using pharmacological approach and in animals with PAR1 knockout, and provide a further evidence of the role PAR1 in the modulation of affective behavior in TLE.

Key words: protease-activated receptors 1; lithium-pilocarpine model; status epilepticus; emotional excitability.

*Bohomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: marharyta.semenikhina@gmail.com*

REFERENCES

1. Trimble M. Treatment issues for personality disorders in epilepsy. *Epilepsia*. 2013; 54: 41-5.
2. Bogovik R, Lunko O, Fedoriuk M, Isaev D, et al. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy Behav*. 2017; 67: 66-9.
3. Isaev D, Lushnikova I, Lunko O, et al. Contribution of

- protease-activated receptor 1 in status epilepticus-induced epileptogenesis. *Neurobiol Dis.* 2015; 78: 68-76.
4. Almonte AG, Qadri LH, Sultan FA, et al. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *J Neurochem.* 2013; 124(1): 109-22.
 5. Maggio N, Cavaliere C, Papa M, et al. Thrombin regulation of synaptic transmission: Implications for seizure onset. *Neurobiol Dis.* 2013; 171-8.
 6. Rice AC, Floyd CL, Lyeth BG, et al. Status Epilepticus Causes Long-Term NMDA Receptor-Dependent Behavioral Changes and Cognitive Deficits. *Epilepsia.* 1998; 39: 1148-57.
 7. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical modification of after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972; 32: 281-94.
 8. Mikati MA, Holmes GL, Chronopoulos A, et al. Phenobarbital Modifies Seizure-related Brain Injury in the Developing Brain. *Ann Neurol.* 1994; 36: 425-33.
 9. Lunko OO, Bogovyk RI, Fedoriuk MP, et al. The protease-activated receptor 1 inhibition during epileptogenesis does not alter behavioral excitability in rats. *Fiziol Zh.* 2018; 1: 12-8. [Ukrainian].
 10. Temkin NR, Dikmen SS, Anderson GD, Wilensky AJ, Holmes MD, Cohen W, Newell DW, Nelson P, Awan A WH. Valproate therapy for prevention of posttraumatic seizures: a randomized trial. *J Neurosurg.* 1999; 91: 593-600.
 11. Semenikhina M, Bogovyk R, Fedoriuk M, et al. 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: 64-8.
 12. Semenikhina M, Bogovyk R, Fedoriuk M, et al. Protease-activated receptor 1 inhibition does not affect the social behavior after status epilepticus in rat. *Fiziol Zh.* 2018; 17-22. [Ukrainian].
 13. Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, et al. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior CA. *Nature neurosci.* 2003;2:168-74.
 14. Horii Y. Increased Anxiety-Like Behavior in Neurotensin (Kallikrein-Related Peptidase 8) Gene-Deficient Mice. *Behav Neurosci.* 2008; 122: 498-504.
 15. Samson AL, Medcalf RL. Tissue-Type Plasminogen Activator : Minireview A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity. *Neuron.* 2006; 50: 673-8.
 16. Maggio N, Itsekson Z, Ikenberg B, et al. The anticoagulant activated protein C (aPC) promotes metaplasticity in the hippocampus through an EPCR-PAR1-S1P1 receptors dependent mechanism. *Hippocampus.* 2014; 24: 1030-8.
 17. Almonte AG, Hamill CE, Chhatwal JP, et al. Learning and memory deficits in mice lacking protease activated receptor-1. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 88: 295-304.
 18. 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.

*Матеріал надійшов
до реакції 02.02.2019*