

# Фармакологічне блокування протончутливих іонних каналів нормалізує порушене внаслідок епілептичного статусу емоційнозумовлене навчання

М.П. Федорюк<sup>1</sup>, М.В. Стефаненко<sup>1</sup>, Р.І. Боговик<sup>1</sup>, А.О. Чернінський<sup>1</sup>,  
О.П. Максимюк<sup>1</sup>, Д.С. Ісаєв<sup>1</sup>, М.О. Платонов<sup>2</sup>, О.О. Кришталь<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ,

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: m\_fedoryuk@biph.kiev.ua

*Досліджено ефект фармакологічного блокування ASIC1a-каналів на емоційнозумовлене навчання у щурів за літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії. Відомо, що розвиток епілептичного статусу призводить до порушення як контекстуального, так і стимулзумовленого емоційного навчання. У наших експериментах безпосередній больовий вплив супроводжувався завмиранням у тварин усіх груп, проте за умов індукованої епілепсії його тривалість була меншою. Блокування ASIC1a-каналів нівелювало таку різницю. Індукція епілепсії порушувала як контекстуальне, так і стимулзумовлене емоційне навчання. Фармакологічне блокування ASIC1a частково відновлювало цей процес у тварин з індукованою епілепсією, що може мати позитивний терапевтичний ефект відносно корекції супутніх скроневої епілепсії емоціогенних розладів.*

*Ключові слова:* ASIC1a; епілепсія; сполука 5b; зумовлений страх.

## ВСТУП

Епілепсія – група поширених медичних станів, головною ознакою яких є повторювані епілептичні напади. У людини вона може супроводжуватися супутніми розладами, серед яких депресивні та тривожні стани [1] з відповідним порушенням емоційної регуляції [2], що істотно знижують якість життя [3]. Проте нині існує досить мало даних щодо механізмів супутніх до епілепсії психіатричних розладів, і відповідно пошук шляхів їх корекції наразі є достатньо утрудненим [4]. Однією з центральних структур, що бере участь у регуляції емоційних станів, є мигдалина. Відомо, що її нейрони експресують, зокрема, ASIC1-канали, а миші з нокаутом відповідного гена мають дефіцит у навчанні, пов'язаному зі страхом [5]. І навпаки – надекспресія ASIC1a-каналів посилює таке навчання [6]. Нещодавно нами було показано, що блокада активності ASIC1a-каналів за

допомогою новітньої сполуки 5b призводить до суттєвого пригнічення епілептиформної активності як на зрізах мозку щурів, так і *in vivo* [7]. Це свідчить про можливість корекції епілептичних станів за допомогою фармакологічної регуляції активності цих каналів. Водночас вплив фармакологічної блокади ASIC1a-каналів на функціонування мозку у нормі є недостатньо дослідженим, так само як і можливі побічні ефекти застосування блокаторів цих каналів як протиепілептичних засобів.

Метою нашої роботи було встановити, як блокада ASIC1a-каналів за допомогою сполуки 5b впливає на емоційне навчання у щурів з індукованою епілепсією.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на білих лабораторних щурах лінії Вістар віком 60–90 днів від народження згідно із міжнародними та

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

національними нормативними актами щодо використання дослідних тварин, зокрема Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV. Тварин утримували у приміщенні із контрольованими температурою та циклом освітлення (22°C, світла фаза починалася о 20:00 і тривала 12 год), їжа і вода доступні *ad libitum*. Усі експерименти та тести виконувались у темну фазу.

Для індукції епілепсії використовували літій-пілокарпінову модель. За 20–22 год до введення пілокарпіну щурам робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію літію хлориду (127 мг/кг). Перша доза пілокарпіну становила 30 мг/кг, а далі через кожні 30 хв вводили по 10 мг/кг доки не розвивалися судомні напади (стадія Racine IV–V) [8]. Якщо після введення загальної дози 60 мг/кг пілокарпіну у щурів не виникали напади, то їх виключали з експерименту. Напади припиняли ін'єкцією діазепаму (40 мг/кг) через годину після індукції епілепсії. Поведінковий тест проводили через 2 тиж.

Поведінку контрольних і дослідних тварин з індукованою епілепсією оцінювали за допомогою тесту на дослідження зумовленого страху [8] з деякими модифікаціями. Експериментальна установка являла собою плексигласовий бокс (50×40×40 см) з непрозорими стінками, який розташовували у звукоізольованій кімнаті з освітленням 600 Лм. За допомогою контролера на платформі Arduino (“Arduino SRL”, Італія) автоматично подавали звуковий та електричний стимули. Звуковий сигнал (10 кГц, 75 дБ, 20 с) надходив через під'єднаний до Arduino динамік (1 Вт, 8 Ом), розташований у верхній частині боксу. Підлога боксу – це металева решітка, на яку подається електричний стимул (0,5 мА, 0,5 с).

Експеримент проводили за два дні: навчання та тестування пам'яті. У перший день після поміщення тварини у тестовий бокс через хвилину роздавався звуковий сигнал, одразу по закінченні якого надходив електричний розряд. Зазначену пару стимулів

повторювали тричі з інтервалом 1 хв. На другий день процедуру проводили без електричної стимуляції. Поведінку тварин записували за допомогою IP-відеокамери (працює за протоколом Internet). Оцінювали тривалість завмирання протягом 20 с до початку та 20 с упродовж дії звуку, а також додатково – протягом 60 с після дії струму у перший день (післяшокове завмирання). Аналізували реакції протягом першого пред'явлення стимулу. Завмирання визначали як відсутність активних рухів, за виключенням дихальних. Збільшення тривалості завмирання на другий день експерименту порівняно з першим є ознакою успішності емоційного навчання. При цьому розрізняють завмирання контекстуальне (викликане поміщенням у експериментальну установку) та зумовлене стимулом (умовним – звуковим, безумовним – більшовим електричним).

Щурів поділили на контрольну (I; n = 14); та три дослідні групи: контроль і блокатор (II; n = 9), індукована епілепсія (III; n = 10), індукована епілепсія і блокатор (IV; n = 10). Тварини II та IV груп за 20 хв до тесту поведінки отримали ін'єкцію сполуки 5b (1 мкмоль/кг); тварини I та III груп – еквівалентну кількість фізіологічного розчину.

Для порівняння незалежних вибірок використовували критерій Манна – Уїтні, а для пов'язаних – критерій Вілкоксона (програмний пакет GraphPad Prism). Відмінності вважалися вірогідними при  $P < 0,05$

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз поведінки тварин виявив істотну міжгрупову різницю тривалості контекстуального завмирання (рис. 1). Так, у контрольних тварин з блокатором та без нього у перший день цієї реакції майже не спостерігалось: 0,4, 0,2 с відповідно. Натомість, на другий день тривалість завмирання значущо зростає: у I групі – 3,5 с, у II – 8,5 с. При цьому дія блокатора 5b призводила до збільшення показника порівняно з контрольною групою

( $P < 0,05$ ). Індукція епілепсії супроводжувалася зростанням часу завмирання порівняно з контрольними тваринами у перший день (без блокатора – 1,8 с, з блокатором – 1,2 с). На відміну від контролю збільшення часу завмирання на другий день набувало статистичної значущості лише на фоні дії блокатора (4,2 с;  $P < 0,05$ ), але не у групі з індукованою епілепсією (3,9 с;  $P > 0,05$ ). водночас цей параметр не відрізнявся між парами груп I і III, а також II та IV. Перше пред'явлення звуку на перший день експерименту без підкріплення больовим стимулом супроводжувалося розвитком помірного завмирання у перших двох групах (I – 0,7 с, II – 0,7 с), час якого був дещо більшим у тварин інших груп (III – 2,3 с, IV – 1,4 с), але ця різниця не сягала рівня статистичної значущості (рис.2). На другий день тривалість завмирання під час дії звуку істотно зростає порівняно із першим днем в усіх групах, за виключенням III (I – 6,2 с, II – 8,8 с, III – 4,7 с, IV – 4,4 с). При цьому дія сполуки 5b не позначалася на часі завмирання як у контрольних, так і в тварин з епілепсією.

Порівняння часу завмирання після першого удару струмом показало, що у тварин з індукованою епілепсією він був меншим за контроль (I – 18,9 с, III – 10,9 с). Дія сполуки 5b майже не змінила цей час (II – 18,8 с, IV – 9,0 с).

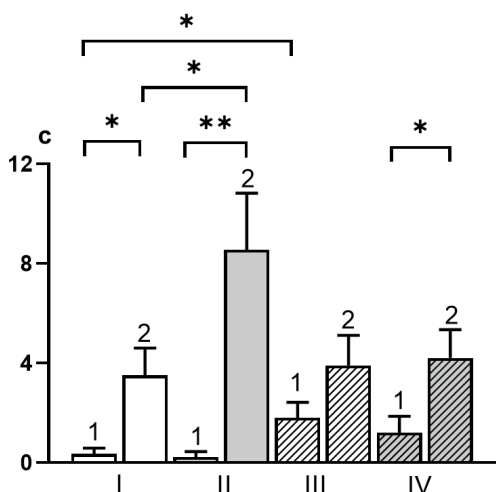


Рис. 1. Тривалість реакції завмирання у щурів у період до початку звукового стимулу: 1, 2 – дні експерименту; I – контроль, II – контроль і блокатор, III – індукована епілепсія, IV – індукована епілепсія і блокатор

Зареєстрована нами в експерименті поведінка, незважаючи на простоту парадигми, складається з кількох компонентів різної природи. Так, безпосередня дія больового стимулу є безумовною захисною реакцією. Спрощено, такі реакції можуть бути двох типів – пасивна (завмирання) чи “боротьба або втеча” [9]. Центральна роль у обробці негативних стимулів належить мигдалині, а саме центральному ядру, нейрони якого формують конкурентні нейромережі, що реципрокно гальмують одна одну [10]. У разі завмирання гальмівний вплив мигдалини на мотонейрони опосередковується через вентролатеральну частину центральної сірої речовини стовбура [9]. У наших експериментах больовий вплив супроводжувався завмиранням у тварин усіх груп, проте за умов індукованої епілепсії його тривалість була меншою. Це може вказувати на певний зсув балансу між двома описаними формами поведінки у бік “боротьби або втечі” або дефіциту процесів гальмування внаслідок патології. Блокування досліджуваних каналів нівелювало різницю між значеннями у тварин з індукованою епілепсією та контрольними – вона лишалася помітною, але не набувала достовірності. Отже, дія блокатора 5b дещо нормалізує характер реагування на больовий

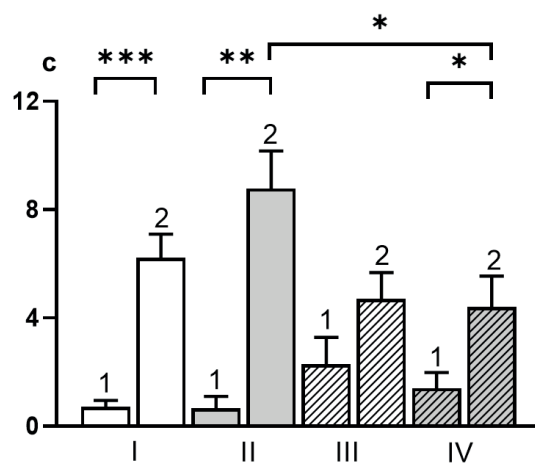


Рис. 2. Тривалість реакції завмирання у щурів під час дії звукового стимулу: 1, 2 – дні експерименту; I – контроль, II – контроль і блокатор, III – індукована епілепсія, IV – індукована епілепсія і блокатор

стимул у тварин з індукованою епілепсією.

Завмирання при поміщенні в установку до пред'явлення першої пари звукового та больового стимулів також є природною реакцією на новизну та потенційну небезпеку, воно може розглядатися, як корелят рівня тривожності. Тварини з індукованою епілепсією демонстрували збільшену тривалість такої реакції. Блокування ASIC-каналів не впливало на цей параметр ані в контрольних, ані в тварин з індукованою епілепсією. Реакція на звуковий сигнал у перший день до больової стимуляції також є вроджено орієнтувальною. Жодної міжгрупової різниці щодо неї не виявлено.

Реагування тварин на поміщення в установку та на звук в другий день експерименту є результатом асоціативного навчання. Істотне збільшення тривалості завмирання є ознакою успішного формування асоціації між больовим стимулом та супутніми – як контекстуальним, так і звуковим. Фармакологічна блокада ASIC-каналів за допомогою сполуки 5b посилювала емоційне навчання у контрольних тварин, але лише контекстуальне. Тривалість реакції завмирання у тварин з індукованою епілепсією на другий день не відрізнялася від контрольних. Проте різниця між значеннями обох днів була статистично не вірогідною, що вказує на меншу ефек-

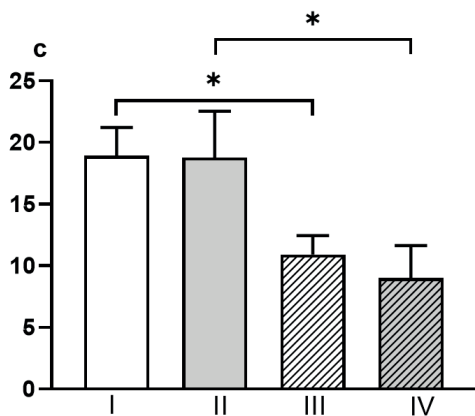


Рис. 3. Тривалість реакції завмирання щурів у період після дії больового електричного стимулу у перший день експерименту: I – контроль, II – контроль і блокатор, III – індукована епілепсія, IV – індукована епілепсія і блокатор

тивність навчання та узгоджується з даними інших авторів [8, 11]. Натомість за умов дії сполуки 5b як контекстуальне, так і стимулзумовлене завмирання на другий день ставало значущо більшим за перший. Таким чином, блокування ASIC-каналів відновлювало порушене внаслідок епілепсії емоційне навчання. Варто зауважити, що тривалість стимулзумовленої реакції завмирання в цьому випадку була меншою за таку у контрольних тварин, тобто баланс збудження та гальмування нормалізувався не повністю.

Наступне питання стосується конкретних фізіологічних механізмів, які пояснюють зареєстровані нами зміни у поведінці щурів. Місцем формування асоціації звукового стимулу та негативно емоційного стану є базолатеральна частина мигдалини [12]. Показано, що ASIC1a-рецептори експресуються як на головних клітинах цієї структури, так і на гальмівних інтернейронах [13]. При цьому активація ASIC-каналів супроводжується розвитком збуджувальних і гальмівних постсинаптичних потенціалів із сумарним ефектом зсунутим у бік ГАМК-опосередкованого гальмування. Однак їх гальмування супроводжується сумарним зростанням збудливості мигдалини. Це, у свою чергу, посилює процеси синаптичної пластичної та формування емоційнозумовлених слідів у пам'яті [14], що і показано в наших експериментах щодо контекстуального, але не стимулзумовленого страху у контрольних тварин.

Відомо, що у базолатеральній мигдалині виділяють окремі базальне та латеральне ядра [14]. Латеральне ядро може отримувати інформацію за рахунок безпосередніх зв'язків із сенсорними структурами таламуса та неокортекса, а відтак – забезпечує більший внесок у стимулзумовлене навчання. Натомість базальне ядро більше пов'язане із контекстуальним навчанням завдяки прямим зв'язкам із гіпокампом (на відміну від бічного ядра). У літературі немає відомостей щодо порівняння експресії ASIC-каналів у зазначених частинах мигдалини, проте, якщо

вона є, це може пояснити зареєстровану нами різницю в ефективності контекстуального та стимулзумовленого навчання у контрольних щурів під дією сполуки 5b.

Індукція епілепсії порушує як контекстуальне, так і стимулзумовлене емоційне навчання. Повідомлялось про численні порушення структури та функцій мигдалини та її зв'язків із гіпокампом за умов скроневої епілепсії, що можуть бути причиною емоційних розладів та порушенням відповідного навчання [15]. Вплив сполуки 5b частково відновлював цей процес у тварин з індукованою епілепсією.

Отже, блокування ASIC1a-каналів має позитивний ефект щодо корекції супутніх скроневої епілепсії емоційних розладів. Раніше нами було показано потенційну протіепілептичну [7], а також антидепресантну дію цієї сполуки [16]. Разом все це вказує на високий потенціал фармакологічної маніпуляції ASIC1a-каналами для корекції скроневої епілепсії та супутніх розладів.

*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.П. Федорюк, М.В. Стефаненко, Р.І. Боговик, А.А. Чернинский, А.П. Максимюк, Д.С. Ісаєв, М.О. Платонов, О.А. Кришталь**

### **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БЛОКАДА ПРОТОНЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ НОРМАЛИЗУЕТ НАРУШЕННОЕ ВСЛЕДСТВИИ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО СТАТУСА ЭМОЦИОНАЛЬНО ОБУСЛОВЛЕННОЕ ОБУЧЕНИЕ**

Исследован эффект фармакологической блокады ASIC1a-каналов на эмоционально обусловленное обучение у крыс при литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Известно, что развитие эпилептического статуса приводит к нарушению как контекстуального,

так и обусловленного стимулом эмоционального обучения. В наших экспериментах непосредственно болевое влияние сопровождалось замиранием у всех животных, однако в условиях индуцированной эпилепсии его продолжительность была меньше, а блокирование ASIC1a-каналов нивелировало эту разницу. Индукция эпилепсии нарушала как контекстуальное, так и обусловленное стимулом эмоциональное обучение. Подавление ASIC1a-каналов частично восстанавливало этот процесс у животных с индуцированной эпилепсией. Значит фармакологическое блокирование ASIC1a-каналов может иметь положительный терапевтический эффект по коррекции сопутствующих височной эпилепсии эмоциогенных расстройств.

Ключевые слова: ASIC1a; эпилепсия; обусловленный страх.

**M.P. Fedoriuk<sup>1</sup>, M.V. Stefanenko<sup>1</sup>, R.I. Bohovyk<sup>1</sup>, A.O. Cherninsky<sup>1</sup>, O.P. Maxymuk<sup>1</sup>, D.S. Isaev<sup>1</sup>, M.O. Platonov<sup>2</sup>, O.O. Krishtal<sup>1</sup>**

### **PHARMACOLOGICAL BLOCKADE OF ACID SENSING ION CHANNELS NORMALIZES EMOTIONALLY CONDITIONED LEARNING DISTURBED DUE TO EPILEPTIC STATUS**

<sup>1</sup>O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv;

<sup>2</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv; e-mail: m\_fedoryuk@biph.kiev.ua

The effect of pharmacological blockade of ASIC1a channels on emotionally conditioned learning in rats with lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy was studied. The development of status epilepticus is known to impair both contextual and stimulated emotional learning. In our experiments, the painful effect was directly accompanied by freezing in animals of all groups, however, under conditions of induced epilepsy, its duration was shorter, and blocking ASIC1a channels neutralized this difference. The induction of epilepsy disrupted both contextual and stimulated emotional learning. Suppression of ASIC1a channels partially restored this process in animals with induced epilepsy. This means that pharmacological blocking of ASIC1a channels can have a positive therapeutic effect in correcting the emotional disorders associated with temporal lobe epilepsy.

Key words: ASIC1a; epilepsy; fear conditioned.

### **REFERENCES**

1. Hingray C, McGonigal A, Kotwas I. The relationship between epilepsy and anxiety disorders. *Curr Psychiatr Rep.* 2019 Apr 29;21(6):40.
2. Tombini M, Assenza G, Quintiliani L, Ricci L, Lanzone J, Ulivi M, Di Lazzaro V. Depressive symptoms and

- difficulties in emotion regulation in adult patients with epilepsy: Association with quality of life and stigma. *Epilepsy Behav.* 2020 Jun;107:107073.
3. Boldyreva U, Streiner DL, Rosenbaum PL, Ronen GM. Quality of life in adolescents with epilepsy, cerebral palsy, and population norms. *Dev Med Child Neurol.* 2020 May;62(5):609-14.
  4. Yogarajah et al. Social cognition, psychiatric comorbidities, and quality of life in adults with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2019 Nov;100(Pt B):106321.
  5. Wemmie JA. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *J Neurosci.* 2003 Jul 2;23(13):5496-502.
  6. Wemmie JA. Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Mar 9;101(10):3621-6.
  7. 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 Roy Soc London.* 2016 Aug 5;371(1700):20150431.
  8. Bogovyk R, Lunko O, Fedoriuk M, Isaev D, Krishtal O, Holmes G, Isaeva O. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus. *Epilepsy Behav.* 2017 Feb;67:66-9.
  9. Roelofs K. Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing. *Philos Trans Roy Soc London.* 2017 Apr 19;372(1718):20160206.
  10. Fadok JP, Krabbe S, Markovic M, Courtin J, Xu C, Massi L. A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. *Nature.* 2017 Feb 2;542(7639):96-100.
  11. Dos Santos JG, Longo BM, Blanco MM, Menezes de Oliveira MG, Mello LE, Guilherme J. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res.* 2005 Dec 20;1066(1-2):37-48.
  12. Lanuza E, Moncho-Bogani J, Ledoux JE. Unconditioned stimulus pathways to the amygdala: effects of lesions of the posterior intralaminar thalamus on foot-shock-induced c-Fos expression in the subdivisions of the lateral amygdala. *Neuroscience.* 2008 Aug 26;155(3):959-68.
  13. Pidoplichko VI. ASIC1a activation enhances inhibition in the basolateral amygdala and reduces anxiety. *J Neurosci.* 2014 Feb 26;34(9):3130-41.
  14. Davis P, Reijmers LG. The dynamic nature of fear engrams in the basolateral amygdala. *Brain Res.* 2018 Jul;141:44-9.
  15. Yilmazer-Hanke D, O'Loughlin E, McDermott K. Contribution of amygdala pathology to comorbid emotional disturbances in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res.* 2016 Jun;94(6):486-503.
  16. Fedoriuk MP, Cherninskiy AO, Maximyuk OP, Isaev DS, Bogovyk RI, Venhreniuk AV, Boyko OM, Krishtal OO. Inhibition of brain ASICs affects hippocampal theta-rhythm and openfield behavior in rats. *Fiziol Zh.* 65(1): 15-9.

*Матеріал надійшов  
до редакції 06.07.2020*