

Вплив пригнічення функції протеазаактивованих рецепторів 1 у латентний період розвитку скроневої епілепсії на депресивноподібну поведінку щурів

М.О. Семеніхіна, М.П. Федорюк, Р.І. Боговик

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

Досліджували вплив фармакологічної блокади протеазаактивованих рецепторів 1 (ПАР1) на поведінкові порушення депресивного типу після епілептичного статусу (ЕС). Поведінкові тести проводили під час латентної стадії формування скроневої епілепсії, через два тижні після ЕС, індукованого з використанням літій-пілокарпінової моделі. Ін'єкції блокатора ПАР1 здійснювали 10 днів після ЕС. Отримані результати свідчать про часткову нормалізацію депресивноподібної поведінки у тесті «вимушеного плавання»: час, коли тварина дослідної групи намагалася вибратися з експериментальної установки становив $180 \pm 25,5$ с після блокування ПАР1, а після ЕС – 87 ± 16 с). Також ми спостерігали відновлення реакцій дослідних щурів після пригнічення функції ПАР1 у «сахарозному» тесті. Інгібування ПАР1 призводило до підвищення часу клімбінгу у тесті «вимушеного плавання». Водночас час плавання у тесті «вимушеного плавання» знижувався внаслідок блокування ПАР1 порівняно з контрольною групою, а час флоатингу підвищувався.

Ключові слова: епілептичний статус; латентна стадія формування епілепсії; протеазаактивовані рецептори 1; депресія.

ВСТУП

Епілепсія одне з найбільш поширених у світі неврологічних захворювань, часто супроводжується низкою психоемоційних та психіатричних розладів, пов'язаних з патологічними порушеннями у структурах мозку, які відповідають за обробку емоційних реакцій. Пацієнти часто переживають такі стани, як тривожність, депресія, демонструють агресивну чи дратівливу поведінку, відчують нетипові для себе страх, паніку, котрі можуть бути спричинені як епілептогенезом безпосередньо, так і прийомом антиепілептичних препаратів.

Депресію вважають найбільш поширеним неврологічним розладом у хворих на епілепсію, але незважаючи на це, часто вона залишається непоміченою та не лікується. Суїцид, як наслідок депресивного розладу, є частою причиною смертності серед пацієнтів [1–3]. Встановлено, що 43% з них

© М.О. Семеніхіна, М.П. Федорюк, Р.І. Боговик

переживають довготривалі депресивні епізоди та 68% короткотривалі [4]. Люди, які хворіли на депресію у минулому, в 4–6 разів більш схильні до розвитку набутої епілепсії внаслідок черепно-мозкової травми, ішемічного ураження мозку чи інших розладів, які провокують епілептогенез, тобто ці два захворювання взаємопов'язані [5]. Водночас не лише епілепсія провокує депресивні розлади у хворих. Відомо, що вживання антиепілептичних препаратів може спричинювати розвиток депресивних розладів [2].

Таким чином, актуальною постає проблема пошуку нових молекулярних мішеней, вплив на які не тільки забезпечить антиепілептичну дію, а і знизить імовірність розвитку супутніх поведінкових розладів надалі. Однією з таких перспективних мішеней є протеазаактивовані рецептори 1 (ПАР1), блокада яких під час епілептогенезу

призводить до покращення стану тварин у пілокарпіновій та літій-пілокарпіновій моделях епілептичного статусу (ЕС) [6–8].

Метою нашої роботи було дослідження впливу блокування ПАР1 на поведінкові порушення депресивного типу після епілептичного статусу.

МЕТОДИКА

Усі експериментальні процедури проводили згідно з Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних чи інших наукових цілях, законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» і були затверджені Комітетом з біоетики Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України. Досліди проводили на щурах лінії Вістар різного віку (27 діб та 2 міс). Тварин розподілили на 3 групи: контрольну та дві дослідні, одна з яких отримувала ін'єкції блокатора ПАР1 (SCH 79797), а інша – ні.

Моделювання епілептичного статусу

Для моделювання ЕС використовували літій-пілокарпінову модель скроневої епілепсії. За 20–22 год до ін'єкцій пілокарпіну щурам вводили внутрішньоочеревинно LiCl (127 мг/кг), розведений у фізіологічному розчині із розрахунку 1 мл/кг. Ін'єкції пілокарпіну здійснювали з початковою дозою 40 мг/кг та наступними – 10 мг/кг кожні 30 хв до розвитку епілептичних нападів 4-5-ї стадії (ЕС) за шкалою Расіна [9]. Після введення 60 мг/кг пілокарпіну, у разі відсутності епілептичних нападів, тварину вилучали з експерименту. Через 60 хв для молодих щурів та 90 хв для дорослих після початку ЕС, епілептичні напади зупиняли ін'єкцією діазепаму (40 мг/кг). Через 15 хв після припинення ЕС вводили блокатор ПАР1 (SCH79797 [SCH], 25 мкг/кг, внутрішньоочеревинно) або відповідний об'єм фізіологічного розчину. Протягом наступних 9 діб ін'єкції блокатора здійснювали раз на день. Для контрольних тварин використовували фізіологічний розчин

в еквівалентному об'ємі. Тварин утримували поодиноці з вільним доступом до води та їжі в режимі 12-годинного циклу день/ніч.

Поведінкові тести

Для дослідження ефекту фармакологічної блокади ПАР1 на різні форми депресивно-подібної поведінки контрольних і дослідних щурів використовували тест «вимушеного плавання» та «сахарозний» тест.

У 10-хвилинному протоколі «вимушеного плавання» використовували скляний циліндр, заповнений водою, підігрітою до 25 С. Вимірювали час, коли тварина перебувала у стабільному положенні, не роблячи жодних рухів, окрім необхідних для утримання цього положення (флоатинг); час, коли вона намагалася вибратися з установки (клімбінг); та час, коли плавала. Процес тестування записували на відео для подальшого аналізу. Для тесту «вимушеного плавання» кількість тварин у контрольній та дослідних групах з блокатором ПАР1 і без становила 10, 7 та 9 тварин, відповідно, у «сахарозному» тесті у кожній групі було по 4 тварини.

Для «сахарозного» тесту до клітки, де утримували тварину, за добу до його початку, щоб уникнути ефекту новизни додавали дві пляшки з водою, одну з яких на наступний день замінювали на пляшку з розчином сахарози (2%), через добу вимірювали об'єм випитих твариною води та сахарозного розчину.

Статистичний аналіз

Аналіз результатів проводили із використанням програм Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA). Статистичну різницю між показниками різних груп визначали за допомогою двофакторного аналізу з подальшим аналізом у тесті Тьюкі. Результати вважали значущими при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що ЕС провокує розвиток депресивноподібної поведінки у тварин навіть у латентній стадії епілептогенезу, в той час як блокування ПАР1 на цій стадії розвитку хвороби частково нормалізує стан

тварин. У тесті «вимушеного плавання» час клімбінгу становив 87 ± 16 с після ЕС та нормалізувався внаслідок блокади ПАР1 до $180 \pm 25,5$ с ($P < 0,05$; рис.1). З літературних джерел відомо, що час клімбінгу, тобто той, який тварина проводить, намагаючись вибратися з установки, підвищується внаслідок дії антидепресантів групи зворотного захоплення норадреналіну.

Відомо, що час флоатингу зменшується під дією більшості антидепресантів [10]. Однак у нашому тесті час для дослідної групи після блокування ПАР1 був майже втричі більшим за контроль ($P < 0,05$). Ми також не спостерігали позитивного ефекту для часу плавання у цьому тесті. В літературі наведено суперечливі дані щодо впливу епілептичних нападів на емоційну поведінку, наприклад рівень тривожності у тварин після ЕС варіює від збільшення до зниження залежно від експериментальної моделі та віку [11–14]. Водночас пацієнти з епілепсією вказують на неоднозначний вплив хвороби, але напевне можна стверджувати, що епілепсія та ЕС певним чином змінюють роботу тих структур мозку, які є відповідальними за емоційні реакції. Літій-пілокарпінова модель ЕС, яку ми використовували, вважається оптимальною для дослідження патернів депресивної поведінки, спровокованої цим захворюванням [15, 16].

Існує взаємозв'язок розвитку депресії та епілепсії. Для людей, що хворіли на неї або хворіють наразі, або навіть мали поодинокі випадки судом у минулому, зростає можливість розвитку депресії і навпаки – пацієнти з депресією в історії хвороби мають вищу ймовірність розвитку набутої епілепсії надалі. Водночас недостатньо дослідженим залишається взаємозв'язок епілепсії з іншими неврологічними розладами. Так, не з'ясовано, чи підвищується ризик її розвитку лише внаслідок депресії, чи інші захворювання також мають подібний вплив. Але відомо, що епілепсія провокує такі психоемоційні розлади як тривожність, напади паніки та агресивність. У нашій лабораторії ми досліджуємо

зв'язок між ЕС та розладами емоційної та соціальної поведінки [6, 7, 17].

Епілепсія є мережевим явищем, у першу чергу вона вражає ті структури мозку, які мають більше внутрішніх шляхів передачі сигналу та зв'язків з навколишніми ділян-

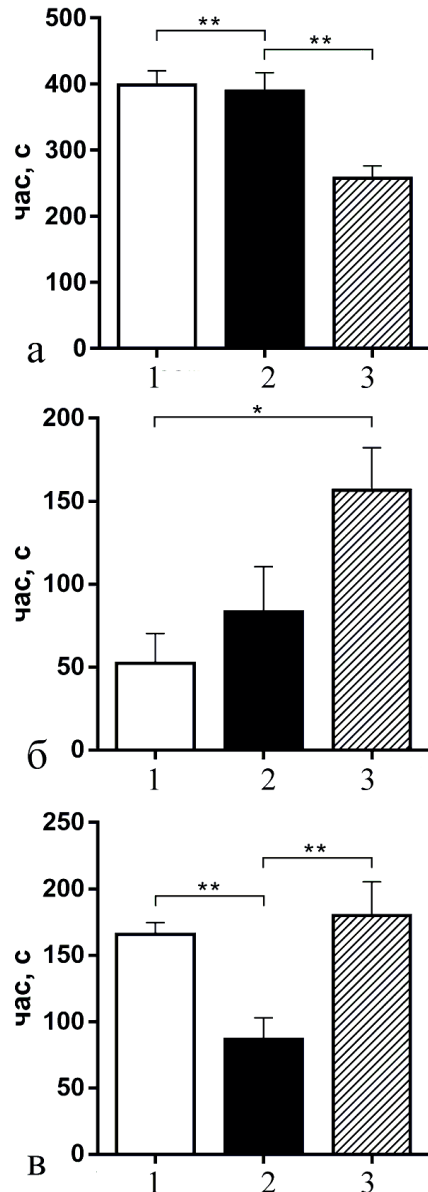


Рис. 1. Дослідження параметрів депресивноподібної поведінки шурів у тесті «вимушеного плавання»: 1 – контрольна група, 2 – епілептичний статус, 3 – епілептичний статус + блокатор ПАР1. а – час плавання тварини у тесті, б – час пасивного плавання, в – час вилізання. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$

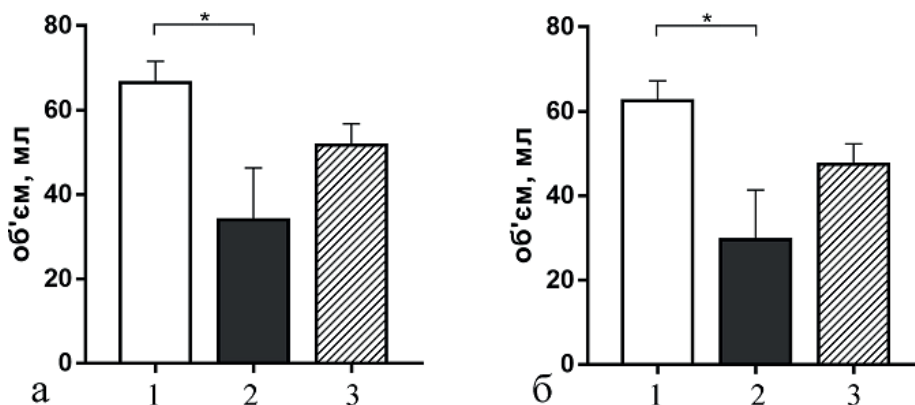


Рис. 2. Нормалізація ангедонічної поведінки у «сахарозному» тесті: 1 – контрольна група, 2 – епілептичний статус, 3 – епілептичний статус і блокатор PAR1. а – об'єм випитого тваринами сахарозного розчину, б – загальний об'єм. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$

ками. Лімбічна система, сукупність структур мозку, яка відповідає за сприйняття та аналіз різноманітних емоційних подразнень, стає найбільш вразливою, тому з використанням тваринних моделей епілепсії показано, що порушення у роботі когнітивних функцій, пам'яті та емоційної поведінки можуть спостерігатися у тварин навіть до появи перших неспровокованих епілептичних нападів.

Класичним поєднанням при дослідженні депресивноподібної поведінки є тести «вимушеного плавання» та «сахарозний». В останньому продемонстровано нормалізацію ангедонічної поведінки у після блокування PAR1 у епілептиків: $47,5 \pm 5$ щодо $29,5 \pm 12$ мл без блокатора, при $62,5 \pm 5$ мл у контролі ($P < 0,05$, рис 2).

Механізми впливу блокування PAR1 на розвиток епілепсії та супутніх захворювань залишаються невивченими. Літературні джерела вказують на залученість PAR1 у процеси обробки поведінкових реакцій. Так, у мишей з нокаутом PAR1, що кодує експресію PAR1 спостерігається достовірне зниження, зумовленої страхом, пам'яті у тесті на формування умовного рефлексу страху [18]. З використанням нокауту PAR1 показано зміни в рівні тривожності у тестах «припіднятий хрестоподібний лабіринт», «відкрите поле» та «реакція пасивного уникання».

Позитивний ефект блокування PAR1 на деякі з параметрів депресивноподібної поведінки щурів для тесту «вимушеного плавання» та «сахарозного» у латентній стадії формування скроневої епілепсії може бути пов'язаний як з нейропротекторною дією блокади PAR1 під час епілептогенезу, так і з їх залученістю у роботу збуджуючої та гальмівної систем мозку. Водночас цікавим є вплив блокування PAR1 на такі параметри тесту «вимушеного плавання», як флоатинг та час плавання. Спостережений ефект 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, М.П. Федорюк, Р.И. Боговик

ЭФФЕКТ БЛОКАДЫ ПРОТЕАЗААКТИВИРОВАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1 НА ДЕПРЕССИВНОПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС В ЛАТЕНТНОЙ СТАДИИ ФОРМИРОВАНИЯ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Исследовали влияние фармакологической блокады протеазаактивированных рецепторов 1 (PAR1) на поведенческие нарушения депрессивного типа после

эпилептического статуса (ЭС). Поведенческие тесты проводили во время латентной стадии формирования височной эпилепсии, через две недели после ЕС, индуцированного с использованием литий-пилокарпиновой модели. Инъекции блокатора PAR1 осуществляли 10 дней после ЕС. Полученные результаты свидетельствуют о частичной нормализации депрессивноподобного поведения в тесте «вынужденного плавания»: время, когда животное экспериментальной группы пыталось выбраться из экспериментальной установки составило $180 \pm 25,5$ с после блокировки PAR1, а после ЕС этот показатель составлял 87 ± 16 с). Также мы наблюдали восстановление реакций крыс после блокировки PAR1 в сахарозном тесте. Блокировка PAR1 приводила к нормализации времени климбинга в тесте «вынужденного плавания», а также нормализовало реакции крыс в сахарозном тесте. Вместе с тем время плавания в тесте «вынужденного плавания» снижалось вследствие блокирования PAR1 по сравнению с контрольной группой, а время флоатинга повышалось. Ключевые слова: эпилептический статус; латентная стадия формирования эпилепсии; протеазаактивированные рецепторы 1; депрессия.

M. Semenikhina, M. Fedoryuk, R. Bogovik

THE EFFECT OF PROTEASE-ACTIVATED RECEPTORS 1 INHIBITION ON DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR IN THE LATENT STAGE OF FORMATION OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

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

Here we investigate the effect of pharmacological blockade of protease-activated receptors 1 (PAR1) on depressive-like behavioral impairments following status epilepticus (SE). Behavioral tests were performed during the latent stage of formation of temporal lobe epilepsy two weeks after SE induced using lithium-pilocarpine model. The PAR1 blocker (SCH 79797) was injected for 10 days after SE. The results indicate a partial normalization of depressive-like behavior in the forced swim test: the climbing time was 180 ± 25.5 s after PAR1 inhibition, and 87 ± 16 s after SE). We also observed behavioral normalization after PAR1 inhibition in the sucrose test. PAR1 inhibition led to the normalization of climbing time in the forced swim test, as well as normalized the behavior in the sucrose preference test. At the same time, the swimming time in the forced swim test decreased due to the PAR1 inhibition compared to the control group, while the floating time increased.

Keywords: status epilepticus; latent stage of epilepsy formation; protease-activated receptors 1; PAR1; depression.

REFERENCES

1. Gilliam F, Kanner AM. Treatment of depressive disorders

- in epilepsy patients. *Epilepsy Behav.* 2002;3:2-9.
2. Kanner AM. Depression in epilepsy: Prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biol Psychiat.* 2003;54:388-98.
3. Kanner AM. Depression and Epilepsy: A new perspective on two closely related disorders. *Curr Rev Clin Sci.* 2008;8:85-9.
4. Hermann BP, Seidenberg M, Bell B. The neurodevelopmental impact of childhood onset temporal lobe epilepsy on brain structure and function and the risk of progressive cognitive effects. *Prog Brain Res.* 2002;135:429-38.
5. Forsgren L, Nyström L. An incident case-referent study of epileptic seizures in adults. *Epilepsy Res.* 1990;6:66-81.
6. 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.
7. Semenikhina M, Bogovyk R, Fedoriuk M, Alkury LT, Savotchenko A, Krishtal O, 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.
8. Semenikhina M, Bogovik R, Fedoryuk M, Lunko O, Savotchenko A, Isaeva E. Pharmacological blockade of protease-activated receptors 1 normalizes behavioral hyperexcitability of rats in the latent stage of the experimental model of temporal lobe epilepsy. *Fiziol Zh.* 2019;65(3):7-11.
9. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical modification of after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972;32:281-94.
10. West CHK, Weiss JM. Effects of antidepressant drugs on rats bred for low activity in the swim test. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;61:67-79. Bokoch MP, Zou Y, Rasmussen SGF, Liu CW, Nygaard R, Rosenbaum DM, et al. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2010;463:108-12.
11. Luo W, Wang Y, Reiser G. Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Res Rev.* 2007.
12. Traynelis SF, Trejo J. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol.* 2007;14:230-5.
13. Mula M, Monaco F. Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update. *Epileptic Disord.* 2009;11:1-9.
14. Shen Y, Peng W, Chen Q, Hammock BD, Liu J, Li D, et al. Anti-inflammatory treatment with a soluble epoxide hydrolase inhibitor attenuates seizures and epilepsy-associated depression in the LiCl-pilocarpine post-status epilepticus rat model. *Brain Behav Immun.* 2019;81:535-44.
15. Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R. Depression after status epilepticus: Behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. *Brain.* 2008;131:2071-83.
16. Lunko OO, Bogovyk RI, Fedoriuk MP, Semenets GS,

Isaeva E V. The protease-activated receptor 1 inhibition during epileptogenesis does not alter behavioral excitability in rats. *Fiziol Zh.* 2018;1:12-8.
17. Dos Santos JG, Longo BM, Blanco MM, Menezes de

Oliveira MG, Mello LE, Guilherme J, et al. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res.* 2005;1066:37-48.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.07.2020*