

Вплив тромбіну у плазматичному іонному середовищі на розвиток епілептиформної активності культивованих нейронів гіпокампа щурів

М.С. Шипшина, А.В. Савотченко, К.І. Кузнецов, М.С. Веселовський

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

Визначення механізмів розвитку епілептиформної нейрональної активності при дисфункції гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ) залишаються актуальним у сучасній психоневрології. З використанням модельних умов, що імітують наслідки порушення ГЕБ у культурі нейронів гіпокампа, вивчали вплив плазматичного іонного середовища на характер імпульсації гіпокампальних нейронів та роль сироваткового білка тромбіну у регуляції епілептиформної імпульсної активності цих нейронів. Спонтанні потенціали дії (ПД) у культивованих нейронах гіпокампа реєстрували методом patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації струму. Зміна іонного складу позаклітинного нейронального середовища на плазматичний сприяла розвитку епілептиформної тонічної активності в культивованих нейронах гіпокампа. Про це свідчило зростання середньої частоти ПД на $65,1 \pm 17,9\%$ ($n = 5$) у нейронах з фоновою імпульсацією та виникнення тонічної електричної активності з частотою $1,65 \pm 0,4 \text{ c}^{-1}$ ($n = 6$) у нейронах без фонової імпульсації. Глутаматні NMDA-рецептори робили значний внесок у формування епілептиформної тонічної активності в нейронах з фоновою генерацією ПД, тоді як їх роль у забезпеченні тонічної активності в нейронах без фонової активності була несуттєвою. Тромбін (5 Од/мл) у розчині плазматичного іонного складу значно посилював епілептиформну імпульсну активність у нейронах як з фоновою генерацією ПД, так і без такої: частота ПД зростала на $117,3 \pm 25,6\%$ ($n = 3$) та $61,8 \pm 11,5\%$ ($n = 3$) порівняно з частотою в розчині плазматичного іонного складу. Блокада тромбінових PАР-1-рецепторів аплікацією SCH 79797 (10 мкмоль/л) нівелювала протонічну дію тромбіну в нейронах без фонової генерації ПД, істотно знижувала її в нейронах з фоновою імпульсною активністю. Отже, зміна іонного складу позаклітинного середовища на плазматичний стимулює виникнення епілептиформної активності в нейронах гіпокампа, що вочевидь асоційоване з активацією NMDA-рецепторів у нейронах з фоновою імпульсною активністю. Проепілептиформна дія тромбіну реалізувалася значною мірою через посередництво PАР-1-рецепторів. Тромбінзалежна регуляція імпульсної активності нейронів гіпокампа залучає механізми, відмінні від модуляції глутаматних NMDA-рецепторів в цих клітинах.

Ключові слова: гематоенцефалічний бар'єр; епілепсія; гіпокамп; потенціал дії; NMDA-рецептори; тромбін.

ВСТУП

Епілепсія є одним з найпоширеніших психоневрологічних розладів центральної нервової системи. Як етіологічний фактор розвитку цієї патології розглядається дисфункція гематоенцефалічного бар'єра (ГЕБ). Однак механізми, залучені у розвиток епілепсії в умовах порушення ГЕБ, залишаються значною мірою нез'ясованими. Одним з наслідків

порушення ГЕБ є зміна внутрішньомозкового середовища, коли в зонах ураження іонний склад міжклітинної рідини мозку концентраційно наближається до такого в плазмі крові [1, 2]. Такі зрушення іонного складу можуть призводити до змін імпульсної активності нейронів та впливати на ефективність синаптичної передачі і, як наслідок, сприяти підвищенню збудливості нейронних мереж гіпокампа.

© М.С. Шипшина, А.В. Савотченко, К.І. Кузнецов, М.С. Веселовський

Екстравазація білків плазми крові у позаклітинне середовище мозку при порушенні ГЕБ також сприяє тривалій гіперсинхронізації нейронів у місцях ураження. В цьому контексті наукові дослідження виділяють роль серинової протеази, тромбіну, в індукції епілептичного статусу [3] при патологічних станах, пов'язаних з порушенням ГЕБ. При цьому проепілептична дія тромбіну реалізується передусім через посередництво активації протеазаактивованого рецептора 1 (ПАР1). Механізми ПАР1-асоційованої тромбінової регуляції нейрональної активності залучають різноманітні внутрішньоклітинні сигнальні системи модуляції функцій іонних каналів та регуляції синаптичної пластичності [4, 5]. Як потенційна мішень активації цієї сигналізації розглядається функція NMDA-рецепторів [6–9], проте визначення їх ролі у розвитку тромбініндукованої епілептиформної імпульсної активності в нейронах гіпокампа при порушенні ГЕБ потребує подальших досліджень.

Мета нашої роботи – виявлення впливу плазматичного іонного середовища на параметри імпульсної активності нейронів гіпокампа та на їх здатність до генерації епілептиформної активності, а також для визначення ролі сироваткового білка тромбіну у регуляції імпульсної активності цих клітин в модельних умовах, що імітують наслідки порушення ГЕБ.

МЕТОДИКА

Усі експерименти були проведені із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Біоетичний комітет Інституту фізіології імені О.О. Богомольця розглянув та схвалив протоколи експериментальних процедур із використанням лабораторних тварин.

Культивування нейронів гіпокампа. Методика приготування культури нейронів

гіпокампа не відрізнялася від описаної раніше [10]. Після декапітації неонатальних щурів лінії Вістар виділяли гіпокамп і поміщали в розчин, що містив мінімальне середовище Ігла, 20 ммоль/л HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Сегменти гіпокампа обробляли 0,05%-м розчином трипсину (тип II) при кімнатній температурі (23–25°C) протягом 10 хв. Після механічної дезагрегації нейрони розміщували на вкритих полі-L-орнітином ділянках чашок Петрі (щільність клітин у культурах – близько 30 тис. од/см²). Культури інкубували при 37°C і 5% CO₂ у повітряному середовищі. Розчин для культивування виготовляли на базі мінімального середовища Ігла з додаванням 10% кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO₃, 8 мкг/мл інсуліну, 50 од/мл бензилпеніциліну натрієвої солі та 50 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Надмірну проліферацію гліальних клітин пригнічували цитозин-A-D-арабінофуранозидом (5 мкмоль/л). Протягом дозрівання культури нейронів додатково не збагачували факторами росту. Електрофізіологічні експерименти проводили на 16–22-гу добу культивування. Реактиви для виготовлення клітинної культури отримані від фірми «Sigma-Aldrich» (США).

Електрофізіологія. З використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації струму реєстрували та аналізували спонтанні потенціали дії (ПД) у нейронах гіпокампа. Для нейронів вимірювали параметри окремого ПД (поріг, амплітуду, тривалість та амплітуду слідової гіперполяризації). Контрольний позаклітинний розчин за іонним складом відповідав міжклітинній рідині мозку щурів [11] і містив (ммоль/л): NaCl – 150; KCl – 3,4; CaCl₂ – 1; MgCl₂ – 1,3; глюкозу – 6; HEPES – 10 (рН 7,3). Внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках складався з (ммоль/л): калію глюконату – 155; EGTA – 0,5; MgCl₂ – 2; HEPES – 10; MgATФ – 5 (рН 7,3). Наслідки дисфункції ГЕБ у культурі нейронів

гіпокампа імітували базовою заміною контрольного позаклітинного розчину на розчин плазматичного іонного складу (РПІС), адаптованого за вмістом електролітів до сироватки крові [12], з наступним додаванням тромбіну («Гранум», Україна) в концентрації 5 од/мл. Розчин плазматичного іонного складу містив (ммоль/л): NaCl – 148; KCl – 5,3; CaCl₂ – 1,5; MgCl₂ – 0,8; глюкозу – 6; HEPES – 10 (pH 7,5). Реактиви для розчинів отримані від фірми «Sigma-Aldrich» (США). Експерименти проводили при 20–22°C. Заміну розчинів проводили зі швидкістю 2 мл/хв. Блокаду ПАР-1 та NMDA-рецепторів виконували додаванням у позаклітинний розчин їх специфічних антагоністів SCH 79797 («Tocris», Велика Британія) та AP-5 («Sigma-Aldrich», США) відповідно.

Аналіз результатів. Числові результати представлені як середнє ± похибка середнього; розміри вибірки усереднення подані

в дужках. Для визначення рівня значущості розбіжностей між середніми значеннями в групах використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Вплив розчину плазматичної іонного складу на фонову імпульсну активність культивованих нейронах гіпокампа. Зміна іонного складу позаклітинного середовища культивованих нейронів гіпокампа на плазматичний призводила до суттєвого підвищення частоти спонтанних ПД у нейронах з фоновною генерацією, а також до виникнення епілептиформної тонічної активності в нейронах без фоновної генерації (рис. 1). Нейронам з фоновною генерацією ПД була властива низькочастотна імпульсна активність у контрольному позаклітинному розчині при мембранному потенціалі, близькому до

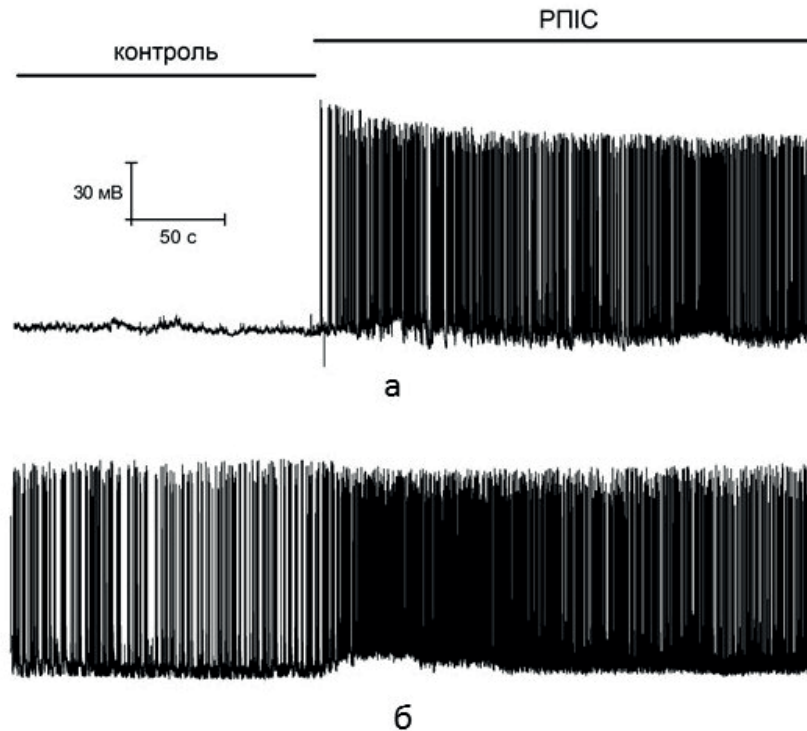


Рис. 1. Зміна імпульсної активності в нейронах гіпокампа під впливом розчину плазматичного іонного складу. Типові приклади реєстрацій мембранного потенціалу поодиноких нейронів у режимі фіксації струму в контролі та під дією розчину плазматичного іонного складу (РПІС). а – тип нейронів без фоновної імпульсної активності; б – тип нейронів з фоновною генерацією потенціалів дії

потенціалу спокою. В групі цих нейронів при заміні позаклітинного розчину на плазматичний середня частота ПД вірогідно зростала на $65,1 \pm 17,9\%$ ($n = 5$; $P < 0,005$) порівняно з контролем. У нейронах без фонові генерації ПД, які не виявляли імпульсної активності за зазначених вище контрольних умов, розчин з плазматичним іонним складом стимулював розвиток тонічної електричної активності з середньою частотою ПД $1,65 \pm 0,4 \text{ c}^{-1}$ ($n = 6$) протягом усього періоду експозиції.

Паралельно спостерігали незначне, але статистично вірогідне зниження амплітуди ПД на $14,1 \pm 5,3\%$ ($n = 5$; $P < 0,05$) та суттєве зниження амплітуди слідової гіперполяризації ПД на $56,1 \pm 10,4\%$ ($n = 5$; $P < 0,001$) при невеликому зменшенні різниці потенціалів на мембранах нейронів на $9,5 \pm 1,5\%$ ($n = 5$; $P < 0,005$). Зміни ширини окремих ПД не сягали статистично значущого рівня.

Заміна іонного складу позаклітинного середовища на плазматичний очевидно впливає на функціонування потенціалкерованих мембранних каналів досліджуваних нейронів. Так, підвищені концентрації позаклітинного K^+ у РПІС крім впливу на мембранний потенціал та синаптичну передачу, потенціюють у нейронах постійний (персистентний) Na^+ -струм (persistent Na^+ current; INaP) [13]. Останній у свою чергу сприяє посиленню синаптичних потенціалів і підвищує здатність нейронів до повторюваної регулярної спайкової активності [14], що спостерігається в наших експериментах. Заміна іонного складу позаклітинного середовища на плазматичний асоційована також зі змінами концентрацій Ca^{2+} та Mg^{2+} , які відіграють суттєву роль у забезпеченні стабілізації нейрональних мембран, у тому числі і через екранування поверхневих зарядів навколо потенціалзалежних іонних каналів. У наших експериментах зміни концентрацій визначених іонів відповідно до плазматичних нівелювали один одного, що сприяло збереженню екранування негативних зарядів на мембранах нейронів відповідно

до контрольного рівня. Отже, тетанічна активність нейронів гіпокампа в РПІС навряд чи пов'язана зі змінами концентрацій двовалентних катіонів.

Роль NMDA-рецепторів у змінах спонтанної імпульсної активності в нейронах гіпокампа під впливом розчину плазматичного іонного складу. Відома роль активації NMDA-рецепторів у індукції епілептичного статусу, а також у підвищенні пароксизмальної нейрональної активності [6]. У цьому контексті зміна іонного складу позаклітинної рідини плазматичною підвищує здатність NMDA-рецепторів до активації, зокрема через зняття Mg^{2+} -блоку, зменшення різниці потенціалів на мембрані тощо. В наших експериментах на фоні блокади NMDA-рецепторів у культурі нейронів гіпокампа експозиція розчину плазматичного іонного складу не викликала вірогідного зростання частоти ПД у групі нейронів з фонові генерацією ПД. Проте в нейронах без фонові генерації ПД специфічний блокатор NMDA-рецепторів AP-5 у концентрації 20 мкмоль/л не впливав на частотну імпульсну активність нейронів, що виникала внаслідок заміни позаклітинного розчину на такий плазматичного іонного складу (рис. 2).

Отже, під впливом іонного середовища плазматичного складу NMDA-рецептори роблять значний внесок у формування епілептиформної тонічної активності в гіпокампальних нейронах з фонові генерацією ПД, тоді як їх роль у забезпеченні тонічної активності в нейронах без фонові імпульсної активності виявляється несуттєвою. Такі відмінності можуть бути опосередковані неоднорідністю рівнів експресії NMDA-рецепторів та їх субодиночного складу в нейронах гіпокампа у дорсовентральному напрямку [15]. Відомо, що у складі цих рецепторів вентрального гіпокампа, найбільш схильного до генерації пароксизмальної активності, домінують NR2B-субодиноці, які визначають низьку спорідненість Mg^{2+} до каналу рецептора. І це,

очевидно, пов'язане з більшою участю NMDA-рецепторів у розвитку епілептиформної активності в нейронах вентрального гіпокампа порівняно з дорсальним у середовищі з низьким вмістом магнію [16]. Імовірно, нейрони з фоновою генерацією ПД у представленому дослідженні відповідають нейронам вентрального гіпокампа, що і демонструє високу залежність частоти їх тонічної імпульсації від активації NMDA-рецепторів.

Вплив тромбіну на імпульсну активність культивованих нейронів гіпокампа та роль ПАР-1 у регуляції частотної генерації ПД. У групі нейронів без фонової генерації ПД додавання у розчин плазматичного іонного складу тромбіну стимулювало підвищення частоти ПД у нейронах гіпокампа до $2,67 \pm 0,37 \text{ c}^{-1}$ ($n = 3$); частота ПД зростала на $61,8 \pm 11,5\%$ ($P < 0,05$) порівняно з такою в розчині плазматичного іонного складу. Наступна блокада тромбінових рецепторів ПАР-1 типу за допомогою SCH 79797 (10 мкмоль/л) викликала суттєве (майже вдвічі) зниження частоти ПД у тих самих нейронах гіпокампа до $1,46 \pm 0,2 \text{ c}^{-1}$. У таких умовах подальша блокада глутаматних NMDA-рецепторів за допомогою їх специфічного антагоніста AP-5 (20 мкмоль/л) призводила до незначного

зниження частоти ПД до $1,14 \pm 0,24 \text{ c}^{-1}$ (рис. 3).

Представлені результати узгоджуються з даними попередніх досліджень [17, 18], підтверджуючи проепілептичну дію тромбіну через стимуляцію тонічної електричної активності нейронів та ефективність антагоністів ПАР-1-рецепторів у пригніченні епілептиформної нейрональної активності в гіпокампі. Відомо що, активація NMDA-рецепторів стимулює індукцію епілептиформної нейрональної активності в гіпокампі [19, 20]. За даними багатьох досліджень ці рецептори стають мішенями активації каскадів ПАР-1-залежної специфічної модуляції синаптичної пластичності [6, 7, 9], характерної для нейронів епілептичного вогнища. Отже, ми визначали їх внесок у формування епілептиформної тонічної активності в досліджуваних нейронах.

Як зазначено вище, при блокаді NMDA-рецепторів у культурі нейронів гіпокампа експозиція розчину плазматичного іонного складу не викликала вірогідного зростання частоти ПД у групі нейронів з фоновою імпульсною активністю. При цьому додавання в розчин плазматичного іонного складу тромбіну значно підвищувало частоту ПД на $117,3 \pm 25,6\%$ ($n = 3$; $P < 0,005$),

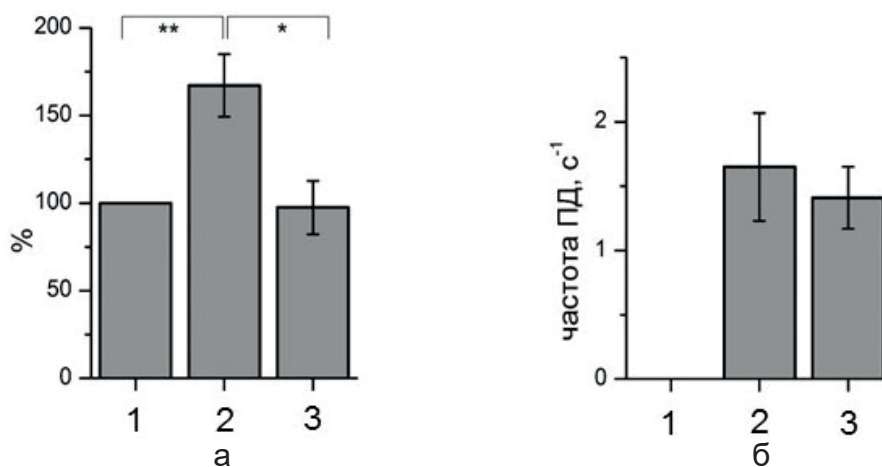


Рис. 2. Вплив активації NMDA-рецепторів на імпульсну активність нейронів гіпокампа у розчині плазматичного іонного складу. Результати статистичного порівняння значень середньої частоти потенціалів дії (ПД) у нейронах з фоновою активністю (а) та в нейронах без фонової активності (б): 1 – в контролі; 2 – під дією розчину плазматичного іонного складу; 3 – після блокади NMDA-рецепторів. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$

а подальша аплікація SCH 79797 (10 мкмоль/л) відновлювала частоту ПД майже до контрольного рівня (не визначено вірогідних відмінностей при статистичному порівнянні частоти ПД у розчині плазматичного іонного складу та після блокади тромбінових ПАР-1 рецепторів).

Таким чином, у наших експериментах на фоні блокади NMDA-рецепторів проепілептична дія тромбіну практично повністю нівелювалася антагоністом ПАР-1 рецепторів. Очевидно, що тромбінзалежна регуляція імпульсної активності нейронів гіпокампа залучає механізми, відмінні від модуляції глутаматних NMDA-рецепторів у цих клітинах. Такі результати узгоджуються з раніше отриманими даними на зрізах мозку про незалежність тромбініндукованого епілептогенезу від активації NMDA-рецепторів [21]. Хоча існує багато повідомлень про ПАР-1-залежну модуляцію синаптичної передачі та нейрональної пластичності в мозку через активацію глутаматних рецепторів цього типу [4, 6, 22–24]. Очевидною є невідповідність між викликаним тромбіном підвищенням синаптичної активності та

розвитком епілептиформної імпульсної активності в нейронах гіпокампа.

ВИСНОВКИ

Отже, зміна іонного складу позаклітинного нейронального середовища на плазматичний стимулює виникнення епілептиформної тонічної активності в культивованих нейронах гіпокампа, що ймовірно залучає модуляцію потенціалкерованих мембранних каналів та зростання постійного Na^+ -струму. Глутаматні NMDA-рецептори роблять значний внесок у формування епілептиформної тонічної активності в гіпокампальних нейронах з фоновою генерацією ПД, тоді як їх роль у забезпеченні тонічної активності в нейронах без фонової імпульсної активності виявляється несуттєвою. Тромбін у розчині плазматичного іонного складу значно посилює епілептиформну імпульсну активність у нейронах гіпокампа як з фоновою генерацією ПД, так і без такої. Його проепілептиформна дія реалізується значною мірою через посередництво ПАР-1-рецепторів. Тромбінзалежна регуляція ім-

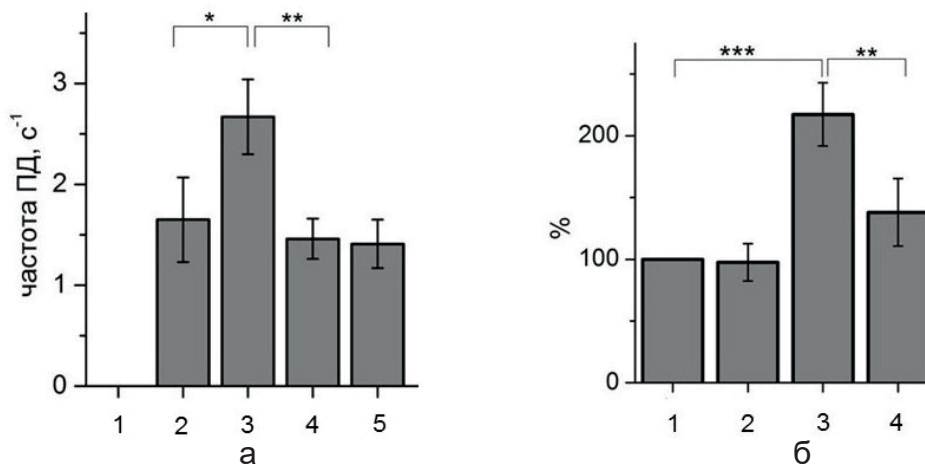


Рис. 3. Вплив розчину плазматичного іонного складу та тромбіну на частоту генерації потенціалів дії у нейронах гіпокампа при блокаді NMDA-рецепторів. а – результати статистичного порівняння значень середньої частоти потенціалів дії (ПД) у нейронах без фонової активності, б – статистичне порівняння значень частоти потенціалів дії, нормованих щодо таких у контролі (100 %) у нейронах з фоновою імпульсною активністю. 1 – контроль; 2 – дія розчину плазматичного іонного складу; 3 – дія тромбіну у розчині плазматичного іонного складу; 4 – дія блокатора ПАР-1-рецепторів SCH 79797 за наявності тромбіну в розчині плазматичного іонного складу та після блокади NMDA-рецепторів їх антагоністом AP-5. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,001$

пульсної активності нейронів гіпокампа залучає механізми, відмінні від модуляції глутаматних NMDA-рецепторів у цих клітинах.

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.S. Shypshyna, A.V. Savotchenko,
K.I. Kuznetsov, M. S. Veselovsky**

THE EFFECT OF THROMBIN IN THE SERUM-ADAPTED IONIC ENVIRONMENT ON THE INDUCTION OF EPILEPTIFORM FIRING ACTIVITY OF HIPPOCAMPAL CULTURED NEURONS

O.O. Bogomolets Institute of Physiology of the NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: shypshyna.mariia@gmail.com

The mechanisms of epileptiform neuronal activity development under blood-brain barrier (BBB) dysfunction remains relevant in modern psychoneurology. In the present work we mimic some effects of BBB disruption in the culture of hippocampal neurons to examine the effect of serum-adapted ionic environment on the impulse activity of hippocampal neurons and the role of serum protein thrombin in induction of epileptiform neuronal activity. Using the whole-cell patch-clamp method under current-clamp mode we analyzed the spontaneous action potentials (AP) in the single hippocampal neurons. The changing of ionic extracellular neuronal environment to such serum-adapted contributed to the development of epileptiform tonic activity of cultured hippocampal neurons and led to increase the average APs frequency by $65.1 \pm 17.9\%$ ($n = 5$) in neurons with spontaneous firing activity (FA) and to occurrence of tonic electrical activity ($1.65 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$) in neurons without firing activity. Glutamate NMDA receptors significantly contribute to epileptiform tonic activity formation in neurons with FA, while their role in tonic activity providing in neurons without FA was insignificant. Thrombin (5 U/ml) in the serum-adapted ionic solution significantly enhanced of epileptiform activity in neurons with and without spontaneous FA: APs frequency increased in these neuronal groups by $117.3 \pm 25.6\%$ ($n = 3$) and by $61.8 \pm 11.5\%$ ($n = 3$), respectively, compared with that in the serum-adapted ionic solution only. Blockade of thrombin protease activated receptor 1 (PAR-1) by application of SCH 79797 ($10 \mu\text{m}$) canceled the thrombin's effect in neurons without spontaneous FA, and significantly reduced such in neurons with FA. Therefore, the change of ionic extracellular neuronal environment to serum-adapted stimulates the occurrence of epileptiform activity in hippocampal neurons, that is apparently associated with NMDA-

receptors activation in neurons with FA. The proepileptiform action of thrombin was mostly mediated by PAR-1 activation. Thrombin-dependent regulation of the hippocampal single neurons firing activity involves the mechanisms different from the modulation of glutamate NMDA receptors in these cells. Key words: blood-brain barrier; epilepsy; hippocampus; action potentials; NMDA receptors; thrombin; PAR-1.

REFERENCES

1. Reinert M, Khaldi A, Zauner A, Doppenberg E, Choi S, Bullock R. High extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure. *Neurosurg Focus*. 2000;8(1):1-8.
2. Zauner A, Bullock R, Kuta AJ, Woodward J, Young HF. Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl*. 1996;67:40-4.
3. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:619-47.
4. Maggio N, Shavit E, Chapman J, Segal M. Thrombin induces long-term potentiation of reactivity to afferent stimulation and facilitates epileptic seizures in rat hippocampal slices: toward understanding the functional consequences of cerebrovascular insults. *J Neurosci*. 2008;28:732-6.
5. Isaeva E, Hernan A, Isaev D, Holmes GL. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current. *Ann Neurol*. 2012;72,192-8.
6. Lee CJ, Mannaioni G, Yuan H, Woo DH, Gingrich MB, Traynelis SF. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *J Physiol*. 2007;581,1057-81.
7. Han KS, Mannaioni G, Hamill CE, Lee J, Junge CE, Lee CJ. Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Mol Brain*. 2011;4:32.
8. Oh SJ, Han KS, Park H, Woo DH, Kim HY, Traynelis SF. Protease activated receptor 1-induced glutamate release in cultured astrocytes is mediated by Bestrophin-1 channel but not by vesicular exocytosis. *Mol Brain*. 2012;5:38.
9. Park H, Han KS, Oh SJ, Jo S, Woo J, Yoon BE. High glutamate permeability and distal localization of Best1 channel in CA1 hippocampal astrocyte. *Mol Brain*. 2013;6:54.
10. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Temporal regularity of neurotransmitter release at single terminal in cultured hippocampal neurons. *Fiziol Zh*. 2010;56(1):118-26.
11. Davson H and Segal MB. *Physiology of the CSF and blood-brain barriers*. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1996.
12. Katzman R and Pappius HM. *Brain electrolytes and fluid metabolism*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1973.
13. Somjen GG and Miiller M. Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. *Brain Res*. 2000;885,102-10.
14. Stafstrom CE. Persistent sodium current and its role in

- epilepsy. *Epilepsy Current*. 2007 Jan-Feb;7(1):15-22.
15. Pandis C, Sotiriou E, Kouvaras E, Asproдини E, Papatheodoropoulos C, Angelatou F. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *Neuroscience*. 2006;140:163-75.
 16. Papatheodoropoulos C, Moschovos C, Kostopoulos G. Greater contribution of N-methyl-d-aspartic acid receptors in ventral compared to dorsal hippocampal slices in the expression and long-term maintenance of epileptiform activity. *Neuroscience*. 2005;135:765-79.
 17. 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 Jun;78:68-76.
 18. Maggio N, Cavaliere C, Papa M, Blatt I, Chapman J, Segal M. Thrombin regulation of synaptic transmission: implications for seizure onset. *Neurobiol Dis*. 2013;50:171-8.
 19. Rice AC, DeLorenzo RJ. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res*. 1998;782(1-2):240-7.
 20. Hellier JL, White A, Williams PA, Dudek FE, Staley KJ. NMDA receptor-mediated long-term alterations in epileptiform activity in experimental chronic epilepsy. *Neuropharmacology*. 2009;56(2):414-21.
 21. Ben Shimon M, Lenz M, Ikenberg B, Becker D, Shavit Stein E, Chapman J, Tanne D, Pick CG, Blatt I, Neufeld M, Vlachos A, Maggio N. Thrombin regulation of synaptic transmission and plasticity: implications for health and disease. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:151.
 22. Gingrich MB, Junge CE, Lyuboslavsky P, Traynelis SF. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci*. 2000;20:4582-95.
 23. Becker D, Ikenberg B, Schiener S, Maggio N, Vlachos A. NMDA-receptor inhibition restores Protease-Activated Receptor 1 (PAR1) mediated alterations in homeostatic synaptic plasticity of denervated mouse dentate granule cells. *Neuropharmacology*. 2014;86:212-8.
 24. Vance KM, Rogers RC, Hermann GE. PAR1-activated astrocytes in the nucleus of the solitary tract stimulate adjacent neurons via NMDA receptors. *J Neurosci*. 2015;35:776-85.

*Матеріал надійшов до
редакції 08.06.2021*