

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
В.И. ВЕРНАДСКОГО»**
(ФГАОУ ВО «КФУ»)

На правах рукописи



Савотченко Алина Владимировна

**МЕХАНИЗМЫ МОДУЛЯЦИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ И
СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ
ИЗМЕНЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ**

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

Чуян Елена Николаевна

доктор биологических наук, профессор

Симферополь – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ	23
1.1 Эпилепсия и эпилептогенез: современное состояние проблемы.....	23
1.1.1 Эпилептические приступы и эпилепсия: определение, классификация, эпидемиология	24
1.1.2 Механизмы эпилептогенеза при височной эпилепсии.....	33
1.2 Гематоэнцефалический барьер и его роль в эпилепсии	58
1.2.1 Строение и функции гематоэнцефалического барьера	59
1.2.2 Дисфункция ГЭБ при эпилепсии.....	70
1.3 Роль тромбина и протеаза-активируемых рецепторов в функционировании ЦНС в норме и при патологических состояниях.....	75
1.3.1 Тромбин и его рецептор PAR1	75
1.3.2 Тромбин и PAR1 в ЦНС	81
1.3.3 Роль тромбина и PAR1 в развитии эпилепсии	83
1.4 Поверхностный заряд нейрональной мембраны как модулятор возбудимости.....	85
1.4.1 Полисиаловые кислоты: структурно-функциональная характеристика.....	86
1.4.2 Нейраминидаза – ключевой фермент дисиализации	95
1.4.3 Патологические процессы, связанные с нарушением метаболизма нейраминидазы и полисиаловых кислот	99
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	102
2.1 Организация исследования.....	102
2.2 Исследование влияния измененного ионного состава внеклеточной среды, имитирующего дисфункцию ГЭБ, на спонтанную активность нейронов гиппокампа в первичной культуре и переживающих срезах	112

2.2.1	Получение первичной культуры нейронов гиппокампа.....	113
2.2.2	Регистрация потенциалов действия от одиночных нейронов.....	115
2.2.3	Приготовление переживающих срезов гиппокампа	117
2.2.4	Регистрация эпилептиформной активности	120
2.3	Оценка влияния раствора с повышенной осмолярностью на пароксизмальную активность мозга крыс линии <i>WAG/Rij</i>	121
2.3.1	Процедура имплантации ЭЭГ-электродов.....	121
2.3.2	Регистрация внеклеточных потенциалов <i>in vivo</i>	124
2.3.3	Дизайн эксперимента по применению гиперосмолярной терапии	125
2.4	Исследование роли тромбина в индукции эпилептиформной активности гиппокампа в модельных условиях дисфункции ГЭБ.	126
2.4.1	Влияние тромбина на импульсную активность нейронов в культуре гиппокампа	126
2.4.2	Влияние тромбина на спонтанную активность пирамидных нейронов переживающих срезов гиппокампа	127
2.4.3	Литий-пилокарпиновая модель эпилептического статуса	127
2.5	Исследование изменения синаптической пластичности CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа в экспериментальных условиях дисфункции ГЭБ и при блокаде PAR1	131
2.6	Оценка влияния блокады PAR1 на поведенческие нарушения после эпилептического статуса.....	133
2.6.1	Водный лабиринт Морриса	134
2.6.2	Тест «открытое поле».....	136
2.6.3	Тесты на возбудимость	139
2.6.4	Тест «перегородка»	140

2.7 Оценка влияния модификации поверхностного заряда мембраны нейронов путем блокады нейраминидазы на синаптическую эффективность и пластичность сети CA3-CA1	143
2.8 Методы статистического анализа	146
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	147
3.1 Исследование эффекта нарушения ионного гомеостаза вследствие дисфункции ГЭБ на активность нейронов гиппокампа.....	147
3.1.1 Эффект модифицированного раствора ИСМЖ на фоновую импульсную активность культивированных нейронов гиппокампа.....	147
3.1.2 Роль NMDA-рецепторов в изменениях спонтанной импульсной активности нейронов гиппокампа под влиянием модифицированного раствора ИСМЖ	149
3.1.3 Влияние модифицированного раствора ИСМЖ на активность пирамидных нейронов области CA1 переживающих срезов гиппокампа....	151
3.2 Оценка эффектов осмоларных сдвигов на судорожную активность на системном уровне у животных с абсансной эпилепсией.....	154
3.3 Влияние тромбина в модифицированном ИСМЖ на эпилептиформную активность нейронов гиппокампа крыс	161
3.3.1 Влияние тромбина на импульсную активность культивированных нейронов гиппокампа и роль PAR1 в регуляции частотной генерации потенциалов действия	162
3.3.2 Влияние тромбина на спонтанную активность пирамидных нейронов переживающих срезов гиппокампа	164
3.3.3 Эпилептиформная активность нейронных сетей гиппокампа во время острой фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии.....	168
3.3.4 Электрографические корреляты эпилептиформной активности гиппокампа во время хронической фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии	171

3.3.5 Сравнительный анализ эпилептиформной активности разных групп животных.....	173
3.4 Изменение синаптической пластичности гиппокампа в модельных условиях дисфункции ГЭБ.....	177
3.4.1 Оценка воздействия модельных условий нарушения функции ГЭБ на возбуждающую синаптическую передачу гиппокампа	177
3.4.2 Кратковременная синаптическая пластичность нейронных сетей гиппокампа при экспериментальной дисфункции ГЭБ.....	182
3.4.3 Изменения долговременной пластичности нейронных сетей гиппокампа крыс при имитации дисфункции ГЭБ	191
3.5 Роль PAR1 в модуляции эпилептической активности нейронных сетей гиппокампа	197
3.5.1 PAR1-зависимая регуляция синаптической пластичности гиппокампа крыс после эпилептического статуса.....	198
3.5.2 Влияние фармакологической блокады PAR1 на поведенческие реакции крыс.....	206
3.6 Синаптическая передача нейронных сетей гиппокампа в условиях ферментативной модификации поверхностного заряда мембраны нейронов.....	223
3.6.1 Изменение значений синаптической эффективности пирамидных нейронов гиппокампа под действием блокатора нейраминидазы.....	224
3.6.2 Кратковременная синаптическая пластичность в условиях фармакологической блокады нейраминидазы.....	228
3.6.3 Изменения пластичности, зависящей от активности, при гиперсинаптической.....	232
3.6.4 Модуляция долговременной пластичности CA3-CA1-нейронной сети гиппокампа в ответ на блокаду нейраминидазы	235

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	238
ВЫВОДЫ	253
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	255
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	258
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	260

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Эпилепсия остается одним из наиболее частых хронических неврологических заболеваний, поражающим более 50 миллионов человек во всем мире [179]. Распространенность активной эпилепсии в популяции составляет 0,5-1,0 %, что в пересчете на Российскую Федерацию соответствует 1,0-1,5 миллионам пациентов [8]. Несмотря на значительный прогресс в разработке противоэпилептических препаратов, около 30-35 % больных страдают фармакорезистентными формами заболевания [320], что определяет высокую медицинскую и социальную значимость проблемы [339].

В 30-40 % всех случаев развитие эпилепсии провоцируется приобретенными повреждениями головного мозга: черепно-мозговыми травмами (ЧМТ), ишемическими инсультами, внутримозговыми кровоизлияниями, инфекциями, опухолями, корковой дисплазией, а также рядом нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на большое разнообразие этиологий, общим признаком соответствующих расстройств является наличие пароксизмальных изменений возбудимости центральной нервной системы (ЦНС), что индуцирует схожие патологические особенности, которые в конечном счете проявляются клинически как эпилептический синдром. Исследования последних лет на различных экспериментальных моделях приобретенной эпилепсии значительно расширили наше понимание молекулярных и клеточных процессов, происходящих в ходе эпилептогенеза и способствующих формированию аномальных нейронных сетей, способных к спонтанной генерации эпилептиформной активности (ЭФА) [214]. Тем не менее, следует признать: пока нет надежной стратегии предотвращения развития приобретенной эпилепсии. Центральной проблемой современной эпилептологии является понимание механизмов, посредством которых нейронные сети переходят от нормальной активности к генерации патологических гиперсинхронных разрядов. Поэтому поиск новых молекулярных мишеней,

вовлеченных в эпилептогенез, является одной из приоритетных задач современной нейрофизиологии.

Способность нейронной сети генерировать эпилептиформные разряды определяется функциональным состоянием входящих в ее состав нейронов – интегральной характеристикой, включающей мембранный потенциал, порог генерации потенциала действия, эффективность синаптической передачи и пластичность синаптических контактов. Это функциональное состояние может изменяться на нескольких уровнях организации.

На уровне внеклеточной среды ионный гомеостаз определяет базовую возбудимость нейронов. Нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), наблюдаемое при ЧМТ, нейроинфекции, в постинсультном периоде, приводит к изменению ионного состава интерстициальной жидкости мозга, поступлению плазменных белков в паренхиму и, как показано в клинических и экспериментальных исследованиях, достоверно повышает риск развития эпилепсии [192, 367, 511]. Однако конкретные механизмы, посредством которых измененный ионный состав внеклеточной среды модулирует сетевую возбудимость гиппокампа, изучены недостаточно. Более того, роль осмолярных сдвигов в модуляции судорожной активности на системном уровне, несмотря на клиническое применение осмотерапии при отеке мозга, остается дискуссионной.

На уровне рецепторной сигнализации особый интерес представляет система протеазаактивируемых рецепторов, в первую очередь 1-го типа (PAR1). Тромбин – сериновая протеаза каскада свертывания крови – является одним из ключевых белков, проникающих в паренхиму мозга при нарушении ГЭБ. Активируя PAR1 на нейронах и глиальных клетках, тромбин способен модулировать синаптическую пластичность, долговременную потенцию (ДП) и возбудимость нейронов [358]. Вместе с тем PAR1 активируется не только экзогенным тромбином, но и эндогенными протеазами, уровень которых может изменяться в условиях нейровоспаления, сопровождающего эпилептический статус (ЭС). Это позволяет рассматривать PAR1-сигнализацию как связующее звено между дисфункцией ГЭБ и изменением функционального состояния нейронов, однако динамика PAR1-

опосредованных эффектов в нейронных сетях гиппокампа после ЭС остается практически не исследованной.

На уровне мембранных свойств нейронов существенную роль играет поверхностный электрический заряд клеточной мембраны, формируемый преимущественно отрицательно заряженными остатками сиаловых кислот в составе ганглиозидов и полисиализированных белков (прежде всего NCAM). Поверхностный заряд создает локальный электрический потенциал, влияющий на эффективную работу потенциалзависимых ионных каналов и, следовательно, на порог генерации потенциала действия. Ферментативное удаление сиаловых кислот нейраминидазой, моделирующее процессы, происходящие при нейроинфекции и нейровоспалении, может существенно изменять возбудимость нейронов. Противоположное по направленности воздействие фармакологическая блокада эндогенной нейраминидазы, приводящая к накоплению полисиаловых кислот на нейрональной мембране, сопровождается повышением возбудимости нейронной сети вплоть до развития эпилептиформной активности. Это делает данную модель информативным инструментом для изучения синаптической пластичности в условиях повышенной возбудимости и определяет одну из задач настоящего исследования.

Таким образом, все три уровня модуляции – внеклеточная среда, рецепторная сигнализация и мембранные свойства – конвергируют на общей мишени: возбудимость нейронов и способность нейронной сети гиппокампа генерировать ЭФА. Комплексное исследование вклада каждого из этих уровней в модуляции ЭФА позволит сформировать целостное представление о многоуровневых механизмах перехода нейронной сети из нормального состояния в эпилептиформное и обосновать новые мишени для противоэпилептической терапии.

Степень разработанности проблемы

Установлено, что церебральные повреждения разной этиологии, способные индуцировать эпилептогенез, ассоциированы с нарушением целостности ГЭБ [253]. Роль дисфункции ГЭБ в патогенезе эпилепсии активно исследуется с начала

2000-х годов. Первые систематические работы группы А. Friedman и соавторов продемонстрировали, что экспериментальное повреждение ГЭБ способно индуцировать ЭФА в гиппокампе и развитие хронической эпилепсии у крыс [278, 511]. Позднее было показано, что проникновение сывороточного альбумина через нарушенный ГЭБ активирует TGF- β -зависимую сигнальную систему астроцитов, что приводит к снижению экспрессии калиевого канала Kir4.1 и, как следствие, к нарушению буферирования внеклеточного калия [154, 278].

Клинические и экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о том, что дисфункция ГЭБ может являться важным фактором риска развития приобретенной эпилепсии в дальнейшей жизни [547]. Нарушение барьерных свойств ГЭБ выявлено при височной эпилепсии [547], фокальных кортикальных дисплазиях [367], а также при посттравматической эпилепсии [561].

МРТ-исследования с использованием контрастных агентов демонстрируют повышенную проницаемость ГЭБ в эпилептогенных зонах головного мозга [586]. Предполагается, что повышение проницаемости ГЭБ может приводить к экстравазации клеток крови и белков плазмы (таких как альбумин, тромбин, фибриноген, плазминоген) во внеклеточную мозговую среду. Эти факторы способны непосредственно или косвенно активировать различные патологические процессы и приводить к формированию эпилептического очага [585]. Однако, несмотря на значительные достижения в исследованиях специфических путей, которые активируются в результате нарушений ГЭБ и могут участвовать в развитии приобретенной эпилепсии, связь между соответствующими процессами остается в значительной степени неизученной. Одним из таких факторов, проникающих через нарушенный ГЭБ и способных запускать эпилептогенез, является сывороточный белок тромбин. Накопленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что помимо своей ключевой роли в коагуляции крови, тромбин вовлечен во множество физиологических и патологических процессов в головном мозге. Установлено, что тромбин способен модулировать активность нейронов и глии, влиять на синаптическую передачу и оказывать нейротрофические либо повреждающие эффекты в зависимости от концентрации и контекста активации.

Исследования последних лет демонстрируют сложную и часто противоречивую роль тромбина и его рецепторов PAR1 в модуляции нейронной функции: 1) PAR1-агонисты могут изменять возбудимость нейронов посредством модуляции натриевых каналов [273] и NMDA-рецепторов [207]; 2) тромбин влияет на синаптическую передачу в нейронах гиппокампа, повышая частоту и амплитуду mEPSC и снижая аналогичные параметры mIPSC [358]; 3) активация PAR1 на глиальных клетках индуцирует провоспалительные реакции [237], что может способствовать эпилептогенезу.

Ряд исследований указывает на проэпилептогенную роль тромбина/PAR1: проникновение тромбина через поврежденный ГЭБ коррелирует с развитием судорог после экспериментальной ЧМТ [562], при этом системное ингибирование как тромбина [328], так и PAR1 [266] снижает выраженность судорог в различных моделях эпилепсии.

Важной составляющей патологических процессов, развивающихся при нарушении ГЭБ, является изменение ионного и осмотического гомеостаза внеклеточной среды мозга [427]. Повышение осмолярности интерстициальной жидкости и модификация ее состава могут влиять на мембранный потенциал нейронов, активность ионных каналов и межклеточные взаимодействия в гиппокампе – ключевой структуре, вовлеченной в формирование судорожных разрядов и когнитивных нарушений при эпилепсии [472].

Кроме того, все больше данных свидетельствует о роли поверхностных зарядов мембраны нейронов в регуляции синаптической пластичности и возбудимости нейронов [372]. Фармакологическая блокада нейраминидазы, приводящая к гиперсенсилизации мембран, может изменять межклеточные взаимодействия, потенцировать ЭФА, модулировать синаптическую пластичность, однако механизмы такого влияния изучены фрагментарно [30, 501].

Таким образом, степень разработанности данной проблемы определяет актуальность настоящего исследования, связанную с необходимостью комплексного анализа вклада дисфункции ГЭБ, PAR1-зависимой сигнализации и изменения межклеточных взаимодействий, включая сигнализацию и осмотические

сдвиги, в формирование эпилептогенности нейронных сетей гиппокампа. Изучение данных процессов на различных уровнях – от синаптической передачи и пластичности до интегративной активности сетей – имеет принципиальное значение для уточнения патогенетических основ эпилепсии и поиска новых мишеней для ее терапии.

Цель работы: установить механизмы модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности в головном мозге крыс при изменении функционального состояния нейронов.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать влияние измененного ионного состава внеклеточной среды, имитирующего дисфункцию ГЭБ, на механизмы спонтанной активности нейронов гиппокампа в первичной культуре и переживающих срезах.

2. Оценить влияние раствора с повышенной осмолярностью на пароксизмальную активность мозга на системном уровне с использованием генетической модели абсансной эпилепсии у крыс линии *WAG/Rij*.

3. Установить роль тромбина в индукции эпилептиформной активности гиппокампа в модельных условиях дисфункции ГЭБ.

4. Охарактеризовать изменения синаптической пластичности CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа в экспериментальных условиях дисфункции ГЭБ.

5. Исследовать PAR1-зависимую модуляцию синаптической пластичности гиппокампа крыс после эпилептического статуса, индуцированного в молодом возрасте.

6. Оценить влияние фармакологической блокады PAR1 на поведенческие нарушения, развивающиеся у крыс после эпилептического статуса.

7. Определить влияние модификации поверхностного заряда мембраны нейронов вследствие фармакологической блокады нейраминидазы на синаптическую эффективность, кратковременную и долговременную пластичность, а также пВПСП-спайк-сопряжение в CA3-CA1 нейронных сетях гиппокампа.

Научная новизна работы. Настоящая работа представляет комплексное исследование механизмов модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности головного мозга, выполненное на клеточном, сетевом и системном уровнях организации.

Впервые систематически охарактеризованы быстрые эффекты измененного ионного состава, моделирующего дисфункцию ГЭБ, на базовую синаптическую передачу и порог индукции ЭФА в области CA1 гиппокампа. Впервые показано, что сдвиги осмолярности внеклеточной среды оказывают противозепилептическое действие на электрографические проявления абсансной эпилепсии у крыс линии *WAG/Rij*, что свидетельствует о вовлечении осмотических градиентов в регуляцию синхронизированной активности нейронных сетей, а также указывает на роль нарушений водно-электролитного гомеостаза в патогенезе эпилепсии.

Разработана оригинальная методика моделирования дисфункции ГЭБ на изолированных срезах гиппокампа *in vitro*, позволяющая воспроизводить ключевые компоненты барьерной недостаточности (проникновение сывороточных белков, изменение ионного состава) в условиях прецизионного контроля экспериментальных параметров, что создает основу для изучения молекулярных механизмов эпилептогенеза, ассоциированного с повреждением ГЭБ.

Впервые продемонстрировано, что экспериментальное моделирование дисфункции ГЭБ приводит к увеличению эпилептогенного потенциала нейронных сетей гиппокампа, проявляющемуся в снижении порога индукции ЭФА, усилении синхронизации нейронной активности и формировании патологических осцилляций, характерных для эпилептического фокуса.

Впервые охарактеризованы специфические изменения электрофизиологических свойств пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа в условиях моделирования барьерной дисфункции и установлены количественные параметры этих изменений, включая модификацию амплитудно-частотных характеристик популяционных разрядов.

Впервые продемонстрировано, что дисфункция ГЭБ вызывает специфические изменения синаптической пластичности гиппокампа с вовлечением

как пресинаптических, так и постсинаптических механизмов, что может лежать в основе когнитивных нарушений при эпилепсии.

Впервые установлена роль PAR1 в модуляции синаптической пластичности гиппокампа: показано, что PAR1 участвует в регуляции долговременной потенциации как в норме, так и в условиях патологии, индуцированной ЭС.

Впервые выявлено, что фармакологическая блокада PAR1 оказывает протективное действие на поведенческие функции животных после эпилептического статуса, проявляющееся в снижении выраженности когнитивного дефицита и тревожно-депрессивных расстройств.

Впервые показано, что фармакологическая блокада эндогенной нейраминидазы приводит к возрастанию базовой синаптической эффективности при одновременном снижении долговременной потенциации в области CA1 гиппокампа; получены комплексные характеристики этих изменений на уровне пирамидного слоя, включая параметры ВПСИ–спайкового сопряжения и кривые «ВХОД–ВЫХОД».

Впервые проведено сопоставление двух моделей эпилептиформной активности – острой дисфункции гематоэнцефалического барьера и ингибирования нейраминидазы и установлено, что при феноменологически сходной гипервозбудимости характер изменений долговременной потенциации является противоположным, что определяется различием в состоянии молекулярного субстрата её консолидации. Полученные результаты расширяют представления о роли полисиаловых кислот и поверхностного заряда нейрональных мембран в регуляции возбудимости гиппокампа и уточняют молекулярные механизмы формирования эпилептогенной сети.

Совокупность полученных данных углубляет понимание механизмов эпилептогенеза и обосновывает перспективность новых терапевтических подходов при эпилепсии.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов эпилептогенеза, связанного с нарушением целостности гематоэнцефалического

барьера. Установленные закономерности взаимосвязи между дисфункцией ГЭБ, изменениями электрофизиологических свойств нейронов и развитием патологической нейронной активности расширяют современные представления о патогенезе приобретенных форм эпилепсии и обосновывают концепцию барьерной дисфункции как самостоятельного патогенетического звена эпилептогенеза. Разработанный способ имитации дисфункции ГЭБ на изолированных срезах мозга *in vitro* создает методологическую основу для дальнейшего изучения молекулярных и клеточных механизмов, связывающих повреждение барьера с развитием нейропатологий. Данная методика обладает трансляционным потенциалом и может быть использована в нейрофизиологических лабораториях для исследования широкого спектра нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с нарушением ГЭБ (болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, ишемия мозга).

Выявленная роль PAR1 в модуляции синаптической пластичности, когнитивных функций и развитии эпилептогенеза расширяет представления о функциональной роли системы сериновых протеаз в ЦНС и углубляет понимание молекулярных основ коморбидных когнитивных и эмоциональных расстройств при эпилепсии.

Установленные закономерности влияния поверхностного заряда мембраны нейронов на процессы синаптической передачи и пластичности, опосредованные модуляцией нейраминидазной активности, расширяют представления о роли посттрансляционных модификаций мембранных белков в регуляции функционального состояния нейронных сетей в норме и при патологии. Учитывая, что механизм широко применяемых противовирусных препаратов основан на подавлении нейраминидазной активности, полученные данные имеют значение для оценки потенциальных центральных эффектов этих препаратов и обоснования мер предосторожности при их назначении пациентам с эпилепсией.

Полученные результаты уточняют функциональную роль полисиаловых кислот и поверхностного электрического заряда нейрональных мембран в регуляции возбудимости и синаптической пластичности гиппокампа. Проведённое сопоставление двух моделей эпилептиформной активности позволило

сформулировать положение о том, что характер изменений долговременной потенциации в эпилептогенной сети определяется не самим фактом повышения возбудимости, а состоянием молекулярного субстрата её консолидации, что расширяет теоретические представления о механизмах эпилептогенеза.

Продemonстрированное противоэпилептическое действие умеренного повышения осмолярности внеклеточной среды при абсансной эпилепсии расширяет представления о механизмах генерации патологических осцилляций в мозге и обосновывает целесообразность применения пероральной регидратационной терапии в качестве вспомогательного немедикаментозного метода лечения рефрактерных форм абсансов. Данный подход может представлять собой экономически доступный, физиологически обоснованный и потенциально эффективный метод терапии, особенно актуальный для педиатрической практики и применения в условиях ограниченных медицинских ресурсов.

Результаты исследования имеют важное прикладное значение для разработки патогенетически обоснованных подходов к профилактике и лечению эпилепсии, особенно ее симптоматических форм, развивающихся после ЧМТ, инсультов, нейрохирургических вмешательств, нейроинфекций и других состояний, сопровождающихся нарушением целостности ГЭБ.

Определение PAR1 в качестве молекулярной мишени в каскаде событий, связывающих дисфункцию ГЭБ с развитием эпилептогенеза и коморбидных когнитивных нарушений, обосновывает важность разработки и клинического применения антагонистов PAR1 в качестве перспективной группы противоэпилептических и нейропротективных средств. Данное направление представляется особенно актуальным для лечения пациентов с фармакорезистентной эпилепсией и выраженными когнитивными расстройствами. Полученные результаты могут служить теоретической основой для доклинических и клинических испытаний селективных блокаторов PAR1 при эпилепсии.

Разработанная экспериментальная методика и полученные результаты внедрены в образовательный процесс кафедры физиологии человека и животных и биофизики ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», в частности, дисциплины

«Нейрофизиология», «Механизмы действия лекарственных средств», «Современные научные достижения и методы физиологических исследований», «Организация и выполнение доклинических исследований», «Биомедицинские исследования», «Механизмы регуляции сложных систем», «Клеточная физиология», «Прогнозирование токсичности и мониторинг безопасности лекарственных средств», «Физиология ЦНС и анализаторов» и в программы научно-исследовательской и производственной практик.

Результаты проведенных исследований вошли в научно-исследовательские разработки в рамках выполнения программ исследований № АААА-А21-121011990099-6 «Физиологические механизмы биологического действия факторов разной природы и интенсивности» и № 126060421664-2 «Закономерности и механизмы адаптации организма к факторам разной природы» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», проектов на базе ФГБОУ ВО «Азовский государственный педагогический университет (номер ОТГЕ-2025-0019, 7200Ф.99.1.БН60АБ6400) и ФГБОУ ВО «Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет» (номер ОТГЕ-2025-0017, 1024122400004-0-5.3.1).

Методология и методы научного исследования. В основу методологии диссертационного исследования положен системный подход, предполагающий на основании комплекса электрофизиологических, нейрофармакологических, поведенческих и математико-статистических методов проведение многоуровневого анализа механизмов модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности в нейронных сетях головного мозга крыс при изменении функционального состояния нейронов. Экспериментальная стратегия предусматривала последовательное изучение трёх факторов модуляции функционального состояния нейронов — ионно-осмотического гомеостаза внеклеточной среды, рецептор-опосредованной внутриклеточной сигнализации и физико-химических свойств нейрональной мембраны на клеточном, сетевом и системном уровнях организации.

Для исследования клеточных и сетевых механизмов эпилептогенеза использовали переживающие срезы мозга и первичные культуры нейронов гиппокампа, приготовленные по стандартным методикам. Эпилептиформную активность на системном уровне исследовали *in vivo* с использованием литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии и генетической модели абсансной эпилепсии (*WAG/Rij*).

Функциональное состояние нейронных сетей оценивали методом регистрации полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов с использованием стеклянных микроэлектродов. Анализировали характеристики синаптической передачи (амплитуду и кинетику вызванных постсинаптических потенциалов) и синаптической пластичности (кратковременной, долговременной, зависимой от активации). Электрофизиологические свойства одиночных пирамидных нейронов гиппокампа (порог и амплитуду ПД, длительность и амплитуду следовой гиперполяризации) исследовали методом *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока.

Функциональные последствия экспериментальных воздействий оценивали в стандартных поведенческих тестах. Локомоторную активность и уровень тревожности анализировали в тесте «открытое поле». Для оценки аффективных нарушений использовали тесты на возбудимость. Когнитивные функции исследовали с помощью тестов на пространственное обучение (водный лабиринт Морриса). Социальное поведение оценивали в трехкамерном тесте социального предпочтения.

Для идентификации молекулярных механизмов изучаемых явлений применяли селективные фармакологические агенты, воздействующие на различные рецепторные системы и сигнальные пути (антагонисты PAR1, ингибиторы нейраминидазы и др.). Оценивали эффекты препаратов на электрофизиологические характеристики нейронов, синаптическую пластичность и поведенческие параметры.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью современных методов параметрической и непараметрической статистики

(t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с последующим *post hoc* тестом Тьюки или Сидака) с применением программ Clampfit («Molecular Devices», США), Origin 7.5 («OriginLab», США) и GraphPad Prism 8 («GraphPad», США).

Объект исследования: механизмы модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности в нейронных сетях головного мозга крыс при изменении функционального состояния нейронов.

Предмет исследования: эпилептиформная активность и синаптическая пластичность в нейронных сетях головного мозга крыс.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Приближение ионного состава внеклеточной среды к плазме крови, моделирующее ионный компонент нарушения ГЭБ, выступает самостоятельным фактором повышения возбудимости нейронных сетей гиппокампа: увеличивает амплитуду базовых синаптических ответов и снижает порог генерации ЭФА.

2. Повышение осмолярности внеклеточной среды оказывает противэпилептическое действие на пароксизмальную активность мозга в генетической модели абсансной эпилепсии.

3. Аппликация тромбина к срезам гиппокампа индуцирует устойчивую ЭФА, по основным электрофизиологическим параметрам соответствующую активности в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии, что обосновывает использование тромбина как *in vitro* коррелята эпилептогенеза при дисфункции ГЭБ.

4. Экспериментальное нарушение ГЭБ индуцирует усиление как кратковременной, так и долговременной синаптической пластичности в нейронных сетях гиппокампа.

5. Фармакологическая блокада тромбиновых рецепторов PAR1 в период эпилептогенеза предотвращает нарушения синаптической пластичности в нейронных сетях гиппокампа, развивающиеся в постстатусный период литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии.

6. Ингибирование PAR1 в период эпилептогенеза избирательно нормализует тревожность и эмоциональную возбудимость у крыс после экспериментально индуцированного эпилептического статуса, не оказывая влияния на пространственное обучение и социальное поведение.

7. Модификация поверхностного заряда мембраны нейронов вследствие блокады эндогенной нейраминидазы повышает возбудимость нейронных сетей гиппокампа и одновременно снижает их пластический потенциал.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов и выводов обеспечена методологически обоснованным планированием и проведением экспериментальных исследований, системой адекватных взаимодополняющих и хорошо воспроизводимых методов, достаточным объемом выборки проведенного экспериментального исследования (428 лабораторных животных), а также применением адекватных статистических методов анализа полученных данных.

Апробация результатов диссертационного исследования проведена на расширенном заседании кафедры физиологии человека и животных и биофизики Института биохимических технологий, экологии и фармации ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (протокол № 6 от 10.06.2026 г.).

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на национальных и международных конференциях, съездах, школах, симпозиумах: 8-м Форуме нейронаук FENS (Барселона, 2012 г.), научной конференции «Молекулярные механизмы регуляции синаптической передачи» памяти профессора Владимира Скока» (Киев, 2012), научной конференции «Физиология: от молекулы к организму» (Киев, 2012), Международной школе FENS-IBRO SFN «Синаптический стресс и патогенез нервно-психических расстройств» (Бертиноро, 2013), 7-м Международном симпозиуме по экспериментальной и клинической нейробиологии (Кошице, 2013), 9-м Форуме Нейронаук FENS (Милан, 2014), Симпозиуме молодых нейробиологов (Барселона, 2017), XX съезде Украинского физиологического общества памяти Платона Костюка (Киев, 2019), Региональном

собрании FENS (Белград, 2019), 8-м съезде Украинского биофизического общества (Киев, 2019), 12-м виртуальном форуме нейронаук FENS (Глазгоу, 2020), Заседании Президиума Национальной академии наук Украины с научным докладом (Киев, 2020), 50-й виртуальной конференций нейронаук SFN (Чикаго, 2021), Всероссийской научно-практической (с международным участием) конференции «Психолого-педагогические аспекты подготовки будущих педагогических работников в контексте процессов интеграции и вызовов современности» (Бердянск, 2025), VII Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященная 100-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 2025), XVI Международной Крымской конференции «Космос и Биосфера» (Симферополь, 2025), XI Всероссийской конференции с международным участием «Физиология и биохимия медиаторных процессов» (Москва, 2025), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций в норме и при патологии», посвященной 90-летию со дня рождения академика РАН Михаила Андреевича Медведева (Томск, 2025), XXII Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2026), XXV Съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Москва, 2026), Всероссийская конференция «Молекулярные и системные механизмы адаптации», посвященная 95-летию со дня рождения академика А.Д. Ноздрачева (Санкт-Петербург, 2026).

Декларация личного участия автора. Автором лично была создана концептуальная основа методических подходов к проведению исследовательской работы, а также осуществлено непосредственное выполнение экспериментальной части в период 2012 – 2025 гг. Диссертантом самостоятельно осуществлен комплексный анализ научных источников по исследуемой тематике, что дало возможность обосновать важность изучаемой проблематики и установить уровень ее научной проработанности, сформулировать вектор исследовательской деятельности, определить целевые установки и задачи работы, а также методологические принципы.

Автором в полном объеме выполнены экспериментальные работы, осуществлен отбор первичных материалов, проведена аналитическая и статистическая обработка полученных данных и их систематизация, сформулированы ключевые положения диссертационного труда, написаны все главы работы, подготовлены выступления на научных мероприятиях различного уровня, обоснованы научные заключения и практические рекомендации по использованию результатов исследования.

В ходе экспериментальных работ на лабораторных животных был предложен инновационный метод моделирования нарушения гематоэнцефалического барьера в *in vitro* условиях.

В научных публикациях, выполненных совместно с научным консультантом, диссертантом самостоятельно проведены экспериментальные работы, статистическая обработка, анализ полученных данных, формулировка выводов и библиографические изыскания.

Публикации. В рамках диссертационного исследования подготовлено и опубликовано 35 работ, включающих 15 научных статей, среди которых 13 публикаций размещены в периодических изданиях, отвечающих требованиям и стандартам рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации материалов диссертационных исследований. Дополнительно 20 работ опубликовано в иных научных изданиях и сборниках конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация представлена на 324 страницах печатного текста и структурирована согласно требованиям к научно-квалификационным трудам. Работа включает введение, обзор литературных данных, материалы и методы исследований, 6 подразделов главы с представлением результатов собственных исследований и их обсуждением, заключение, выводы, практические рекомендации, перечень сокращений и список литературы. Текст дополнен 70 рисунком и 5 таблицами. Библиографический указатель включает 650 источников (12 кириллицей и 638 латиницей).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1 Эпилепсия и эпилептогенез: современное состояние проблемы

Эпилепсия (от греч. ἐπιληψία – «схватывание», «приступ», «нападение») является одним из наиболее распространенных психоневрологических расстройств, связанных с нарушением функционирования центральной нервной системы (ЦНС). Заболевание характеризуется повторными спонтанными эпилептическими приступами и сопровождается рядом клинических и параклинических проявлений, среди которых наиболее значимыми являются психические расстройства и личностные изменения [214].

Эпилепсию следует рассматривать не как изолированное заболевание, а как комплекс симптомов различной этиологии и патогенеза, объединенных общим признаком – повторяющимися, спонтанно возникающими судорожными приступами [3].

Эпилепсия известна человечеству с древнейших времен. В Древней Греции и Риме ее связывали с волшебством и магией, называя «священной болезнью». В эпоху Средневековья эпилепсию воспринимали как неизлечимое и заразное заболевание, якобы передающееся при дыхании больного во время приступа. Людей, страдавших эпилепсией, нередко подвергали гонениям – их считали одержимыми, связанными с потусторонними силами, а в тяжелых случаях даже сжигали на кострах.

В то же время научные представления об эпилепсии появились достаточно рано. Гиппократ в своем трактате «О священной болезни» писал: «Насколько мне кажется, она не более божественна и не более священна, чем другие болезни; ее происхождение столь же естественно, как и у прочих недугов. Первые, кто признал эту болезнь священной, были маги, шарлатаны и невежественные люди. Но если знать ее причины, то всякая святость исключается. Следовательно, не божественное, а человеческое видится мне во всем этом... Причина же этой болезни, как мне кажется, заключается в мозге».

В Древнем Риме врач Гален ввел понятие «ауры» – особого состояния, часто предшествующего парциальному эпилептическому приступу. В XI веке арабский ученый и философ Авиценна (Абу Али Ибн Сина) впервые применил термин «эпилепсия» и описал ее клинические проявления.

В настоящее время эпилепсию определяют как хроническое неинфекционное заболевание головного мозга, которым страдают около 50 млн человек во всем мире [179]. Для данного расстройства характерны повторяющиеся приступы, представляющие собой кратковременные эпизоды непроизвольных движений, которые могут вовлекать отдельные участки тела (парциальные припадки) или проявляться как генерализованные судороги, охватывающие все тело. Приступы нередко сопровождаются потерей сознания, а также нарушением контроля функций мочевого пузыря и кишечника [111].

Эпилептический приступ является следствием чрезмерных электрических разрядов в группе нейронов головного мозга. Подобные разряды могут возникать в различных отделах мозга, в зависимости от чего определяется клиническая картина приступа. Их проявления варьируют от кратковременных выпадений внимания и легких подергиваний мышц до тяжелых и продолжительных судорог. Частота приступов также крайне различна – от единичных эпизодов в год до нескольких в течение суток [97].

1.1.1 Эпилептические приступы и эпилепсия: определение, классификация, эпидемиология

Один изолированный приступ сам по себе не является основанием для постановки диагноза эпилепсии, поскольку, по данным ВОЗ, до 10 % населения Земли могут испытать один эпилептический эпизод на протяжении жизни. Диагноз «эпилепсия» устанавливается в случаях, когда у пациента наблюдаются два и более неспровоцированных приступа.

По оценкам, доля населения, страдающего активной формой эпилепсии (то есть продолжающимися приступами или потребностью в постоянной терапии) в данный момент времени, колеблется от 4 до 10 человек на 1000 населения.

В мировом масштабе ежегодно диагностируется приблизительно 5 млн новых случаев эпилепсии. В странах с высоким уровнем дохода заболеваемость оценивается в среднем как 49 новых случаев на 100 000 человек в год, тогда как в странах с низким и средним уровнем дохода этот показатель может достигать 139 случаев на 100 000 населения (рисунок 1.1) [179, 212].

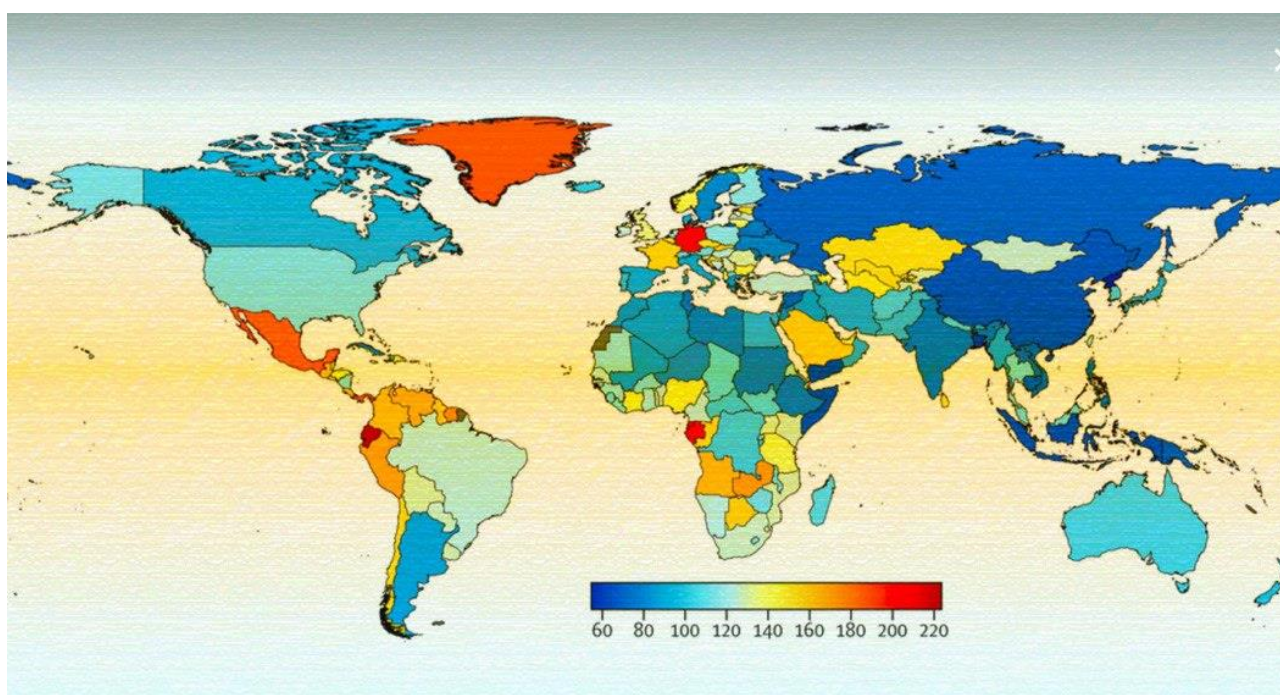


Рисунок 1.1 – Статистика заболеваемости эпилепсией в странах мира из расчета на 100 000 жителей, данные за 2019 год [179]

Такое различие, вероятно, связано с повышенной распространенностью эндемических заболеваний (например, малярии или нейроцистицеркоза), с более высокой частотой черепно-мозговых травм в дорожно-транспортных происшествиях, родовыми травмами, а также с различиями в уровне развития медицинской инфраструктуры, доступности профилактических программ и качестве медицинской помощи.

По данным ВОЗ, около 80 % людей, страдающих эпилепсией, проживают в странах с низким и средним уровнем дохода [618].

По информации, представленной в официальных статистических отчетах Минздрава за 2024 год, на территории Российской Федерации было зарегистрировано 347 тысяч зарегистрированных пациентов, что эквивалентно 2,43 случая на 1000 жителей. При этом около 35 % всех пациентов составляли дети и подростки в возрасте до 18 лет. Эксперты из отдела эпилепсии Федерального центра мозга и нейротехнологий ФМБА оценивают реальную картину чуть шире: ориентировочно 3-4 человека на 1 тысячу населения.

Анализ динамики новых диагнозов показал устойчивое снижение числа впервые выявленных случаев заболевания в период с 2015 по 2020 годы: в группе детей 0-14 лет уменьшение составило 17 %, среди подростков 15-17 лет – 10 %, а в возрастной категории 18 лет и старше – 20 %.

Несмотря на совершенствование диагностических возможностей и одновременное старение населения, наблюдаемое сокращение числа новых пациентов свидетельствует о вероятной гиподиагностике эпилепсии в России. Предполагаемое реальное количество больных может колебаться в широких пределах – от 367 тыс. до 1 100 тыс. человек [8].

Ряд эпидемиологических исследований показал, что заболеваемость и распространенность эпилепсии несколько выше у мужчин, чем у женщин, однако эти различия не достигают статистической значимости (рисунок 1.2) [190]. Подобные колебания могут быть связаны с гендерными особенностями распределения факторов риска, а также с социо-культурными причинами, затрудняющими обращаемость и диагностику заболевания у женщин в отдельных регионах [74].

Наибольшая частота новых случаев эпилепсии наблюдается в детском и пожилом возрасте. По оценкам, в Соединенных Штатах Америки показатель заболеваемости у детей первого года жизни составляет около 86 на 100 000 населения в год, затем он постепенно снижается до 23-31 на 100 000 в возрастной группе 30-59 лет, и снова возрастает до 180 на 100 000 у лиц старше 85 лет [236].

В странах с низким и средним уровнем дохода заболеваемость достигает пика в детском возрасте, что может объясняться как недоучетом эпилепсии у пожилых людей, так и демографическими особенностями этих стран. Динамические исследования показывают, что возрастные показатели заболеваемости эпилепсией со временем снижаются в младших возрастных группах, вероятно, в результате улучшения перинатальной помощи и эффективного контроля инфекционных заболеваний.

В то же время, увеличение продолжительности жизни в совокупности с ростом распространенности возраст-ассоциированных эпилептогенных состояний (таких как инсульт, опухоли и нейродегенеративные заболевания), а также улучшение диагностической идентификации заболевания в старшем возрасте привели к росту заболеваемости эпилепсией у пожилых пациентов.

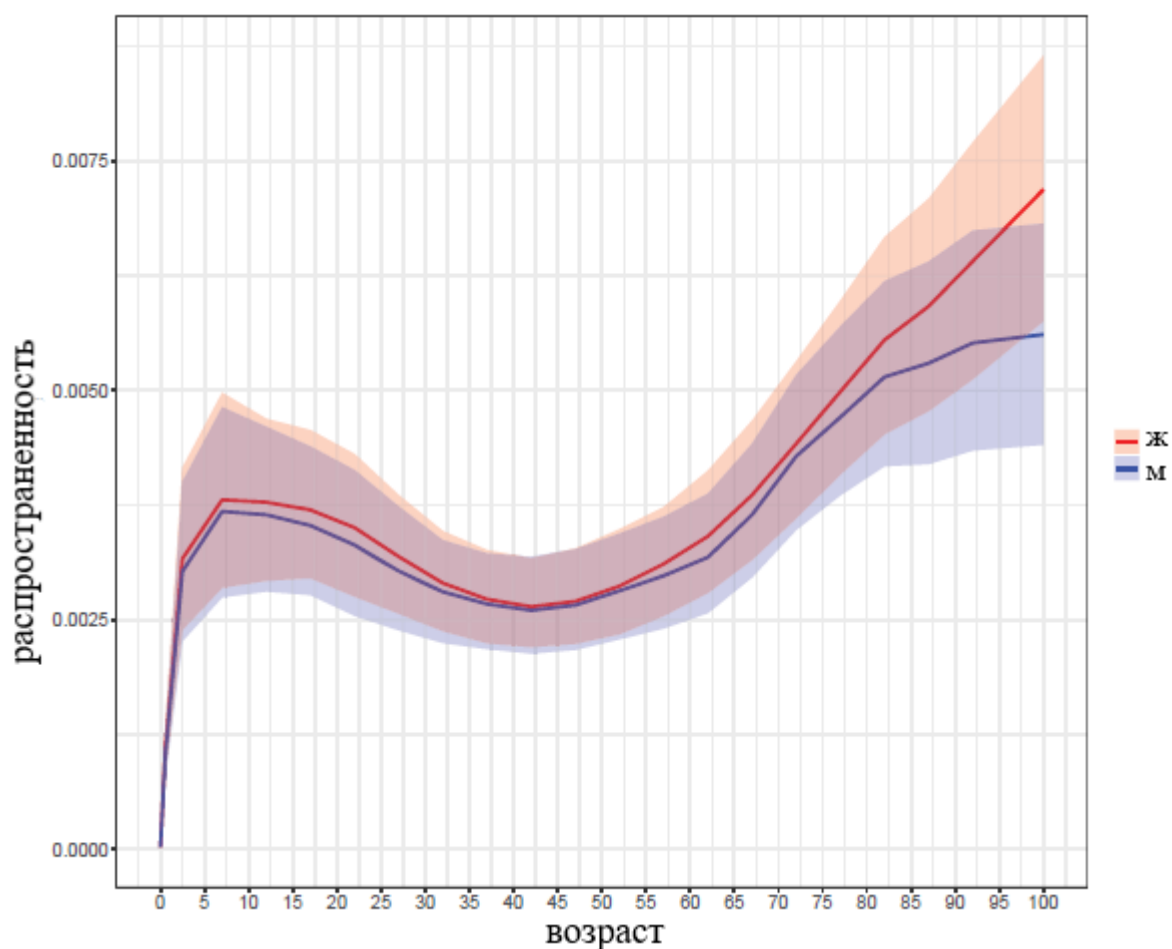


Рисунок 1.2 – Глобальная распространенность идиопатической эпилепсии по возрасту и полу, 2016 год

Таким образом, максимальная частота эпилептических приступов приходится на первый год жизни, к 10-летнему возрасту заболеваемость постепенно снижается и достигает уровня, характерного для взрослого населения [106]. Пожизненная и активная распространенность эпилепсии несколько выше в странах с низким и средним уровнем дохода, чем в экономически развитых государствах. При этом существуют значительные колебания по данным отдельных популяционных групп, где распространенность эпилепсии, как правило, выше у представителей отдельных этнических групп, в том числе коренных народов, что подчеркивает необходимость дополнительных исследований высокорисковых категорий населения [179].

Причины эпилептических приступов зависят от возраста человека.

Основными причинами эпилептических приступов у детей являются:

- внутричерепные кровоизлияния (травматические, гипоксические приступы у недоношенных новорожденных);
- гипоксемия, ишемия головного мозга;
- родовые травмы или врожденные повреждения головного мозга, увечья, пороки развития, в том числе аневризмы сосудов мозга;
- вирусные, бактериальные или протозойные инфекции (менингит, энцефалит, краснуха, герпес, токсоплазмоз, сифилис, стафилококковые, листериозные, колибациллярные инфекции и т.п.);
- инфекционно-токсические и метаболические нарушения при острых заболеваниях желудочно-кишечного тракта или органов дыхания;
- метаболические нарушения: гипогликемия, гипергликемия, гипокальциемия, гипомагниезия, гипернатриемия, повышенная вязкость крови, врожденные (генетические) нарушения обмена веществ;
- интоксикации организма: эндогенная (уремия, билирубинемия и т.п.), экзогенная (пищевые интоксикации, пенициллин, барбитураты и др.);
- гипертермия при инфекциях, интоксикациях.

Причинами судорог во взрослом возрасте выступают:

- травмы головы,

- инфекции;
- употребление алкоголя и стимуляторов;
- опухоли;
- внутричерепные кровоизлияния, связанные с травмами, инсультом, аневризмами;
- побочные эффекты лечения.

Причинами приступов у пожилых людей являются:

- инсульты;
- опухоли головного мозга;
- травмы;
- нейродегенеративные расстройства.

Приблизительно у 70 % пациентов с диагнозом эпилепсия причина возникновения эпилептических приступов не может быть идентифицирована (рисунок 1.3) [249].

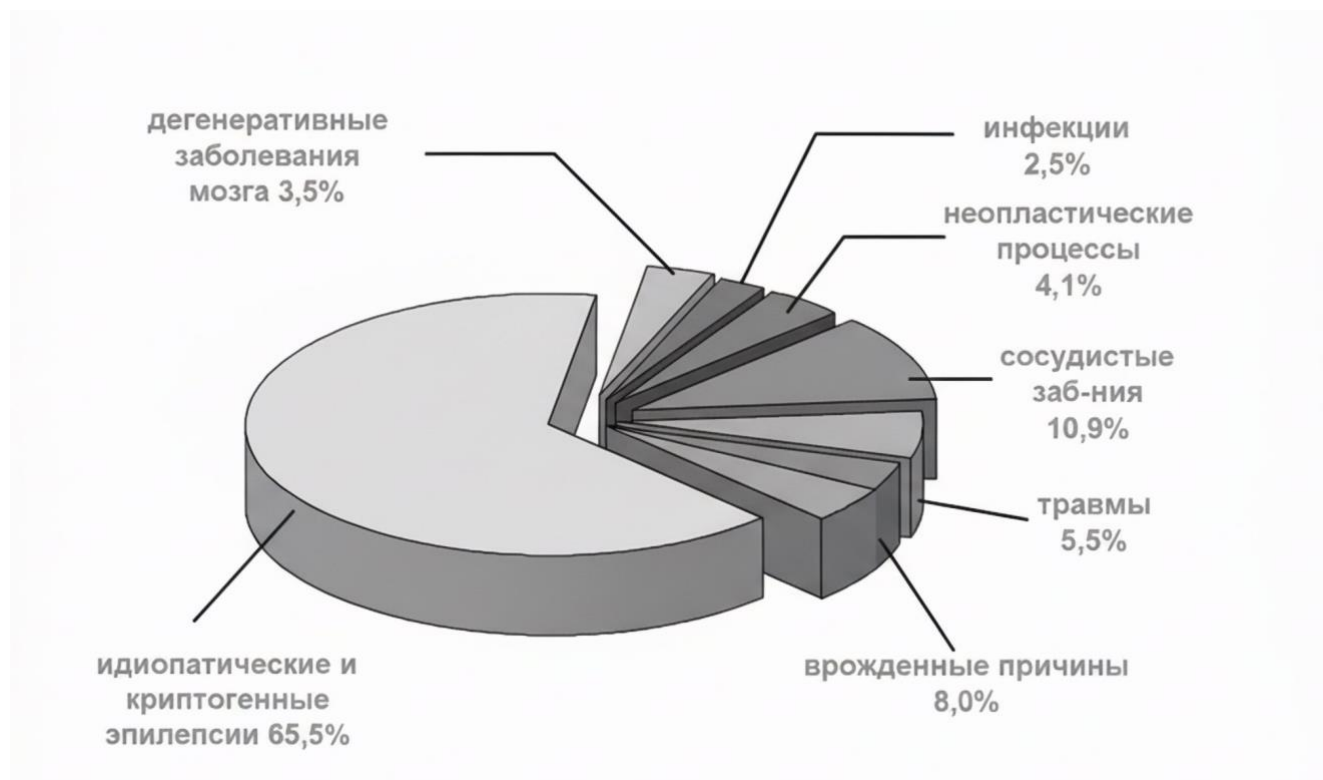


Рисунок 1.3 – Причины возникновения эпилептических приступов и эпилепсии [236]

Эти идиопатические эпилепсии связаны преимущественно с наследственной предрасположенностью, имеют типичный возрастной промежуток и хорошо поддаются лечению [3, 4].

В случае, когда при анализе особенностей клинического синдрома предполагается вероятность отнесения эпилепсии к симптоматической, но причины остаются не определенными, говорят о криптогенной эпилепсии.

Эпилептические приступы проявляются по-разному в зависимости от их этиологии, локализации патологического очага и электроэнцефалографических характеристик. Для удобства их анализа и описания применяются различные систематизации. Основу многочисленных классификационных систем составляют разнообразные критерии, отражающие морфологические, патогенетические и клинические особенности эпилептических пароксизмов.

По очаговым проявлениям различают:

1) парциальные (фокальные) приступы, возникающие при повреждении или дисфункции нейронов в определенной области одного из полушарий головного мозга.

Среди них выделяют:

- а) простые приступы – протекают без нарушения сознания;
- б) сложные приступы – сопровождаются изменением или нарушением сознания, что связано с вовлечением различных по локализации корковых зон; такие приступы часто переходят в генерализованные формы;
- в) вторично генерализованные приступы – начинаются с фокального (судорожного или бессудорожного) пароксизма или абсанса и сопровождаются дальнейшим двусторонним распространением судорожной активности на все группы мышц.

2) первично-генерализованные приступы – двусторонние, симметричные, без очаговых проявлений в момент возникновения.

На электроэнцефалограмме (ЭЭГ) в этих случаях регистрируются группы генерализованных комплексов «пик-волна» во всех отделах мозга.

Среди них различают:

а) абсансы – кратковременные эпизоды глубокого помрачения сознания, во время которых больной замирает в одной позе; лицо может покраснеть или побледнеть, взгляд становится неподвижным, моргание отсутствует. Пациент не реагирует на внешние раздражители, иногда выпускает предметы из рук. Продолжительность приступа составляет 20-40 с, частота – 5-10 раз в сутки. После приступа амнезия на событие полная. Во время приступа на ЭЭГ выявляются характерные комплексы «пик-волна». Наиболее часто абсансы возникают в возрасте 4-5 лет;

б) миоклонические приступы – сопровождаются подергиваниями разных групп мышц, чаще двусторонних и симметричных, одиночных или множественных, различной амплитуды. На ЭЭГ определяются характерные периодические всплески генерализованной активности и нерегулярные спайки с частотой 4-6 Гц;

в) атонические приступы – характеризуются внезапным падением мышечного тонуса в одной или нескольких мышечных группах, что приводит к падению и потере сознания. На ЭЭГ по фону генерализованной активности «пик-волна» наблюдается фаза диффузного снижения активности. Продолжительность – 5-10 с;

г) тонические приступы – сопровождаются резким напряжением всей мускулатуры. На ЭЭГ регистрируется низковольтная высокочастотная активность; приступы особенно часто возникают во время сна;

д) клонические приступы – проявляются сериями коротких, неритмичных, интенсивных сокращений массивов мышц. На ЭЭГ отмечается медленная высоковольтная активность в обоих полушариях мозга. Длительность приступов – от 2-3 до 5 мин;

е) тонико-клонические приступы – характеризуются потерей сознания, тоническими судорогами туловища и конечностей, сменяющимися фазой клонических подергиваний. На ЭЭГ во время тонической фазы регистрируется высокочастотная (около 10 Гц) или низковольтная активность, которая постепенно переходит в более медленные и высоковольтные колебания;

ж) эпилептический статус (ЭС) – неотложное жизнеугрожающее состояние, при котором наблюдаются длительные или повторяющиеся большие тонико-клонические приступы без восстановления сознания между ними. Продолжительность эпилептического статуса превышает 30 мин; требует срочной медицинской помощи и постоянного мониторинга состояния пациента [5, 598].

Эпилептиформная активность (ЭФА) включает совокупность характерных проявлений биоэлектрической активности нейронов, регистрируемых на ЭЭГ пациентов с эпилепсией во время эпилептического приступа или в интервалах между приступами (интериктальная активность).

ЭФА выявляется примерно у 2 % лиц, не страдающих эпилепсией, однако различные ее варианты регистрируются на ЭЭГ у 50-90 % пациентов с эпилепсией в зависимости от условий записи и длительности проведенного исследования.

У подавляющего большинства больных приступы наблюдаются примерно один раз в неделю. Поскольку средняя продолжительность кортикальных судорог составляет лишь 1-2 мин, электрографические эпилептические приступы во время рутинного ЭЭГ-мониторинга регистрируются редко. Напротив, интериктальная активность на ЭЭГ встречается значительно чаще и часто хорошо коррелирует с клинической картиной эпилепсии.

Некоторые варианты интериктальной активности обладают характерной морфологией и обнаруживаются у большинства пациентов с судорожными приступами, но редко – у лиц без типичных для эпилепсии клинических симптомов. К таким паттернам относятся спорадические спайки, острые волны и комплексы спайк – медленная волна.

В экспериментальных моделях эпилепсии и эпилептических приступов ЭФА демонстрирует схожие характеристики нейронной активности, регистрируемые как у анестезированных животных при воздействии проэпилептических соединений, так и у неанестезированных – во время приступов или в межприступные интервалы [269, 270]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* показано, что аппликация фармакологических агентов с проэпилептическими свойствами вызывает длительную ЭФА в изолированных срезах различных областей мозга [272].

Модели ЭФА *in vivo* и *in vitro* широко применяются в современных экспериментальных исследованиях для изучения механизмов возникновения эпилептических приступов и тестирования потенциальных противоэпилептических препаратов (ПЭП).

1.1.2 Механизмы эпилептогенеза при височной эпилепсии

Приблизительно в 30-40 % случаев удается установить причины развития эпилепсии.

К факторам, способным привести к возникновению заболевания, относятся различные структурные повреждения головного мозга: черепно-мозговые травмы (ЧМТ), ишемические инсульты, внутримозговые кровоизлияния, инфекционные поражения, опухоли, корковая дисплазия, некоторые нейродегенеративные заболевания, а также симптоматические эпилептические приступы, в том числе сложные фебрильные судороги или ЭС [185].

Несмотря на многообразие этиологических механизмов, объединяющим признаком эпилептических расстройств является пароксизмальное повышение возбудимости центральной нервной системы, способное воспроизводить сходные патологические паттерны, которые клинически проявляются в виде эпилептического заболевания.

Эпилептогенезом называют период, проходящий между известным повреждением головного мозга и появлением первого непровоцированного эпилептического приступа [636].

В процессе эпилептогенеза нормальная мозговая ткань постепенно превращается в ткань, способную генерировать спонтанные эпилептические приступы. Продолжительность эпилептогенеза значительно варьирует: она может составлять от нескольких суток или недель (у экспериментальных животных) до нескольких недель и даже десятков лет (у человека) [442].

Различные патологические изменения описаны в мозговой ткани пациентов с эпилепсией, перенесших хирургическую резекцию эпилептогенного очага, а также

в головном мозге животных с экспериментально вызванной височной эпилепсией на острой, латентной (эпилептогенез) и хронической стадиях заболевания (рисунок 1.4).

Установлено, что в период эпилептогенеза постепенно повышается возбудимость нейронных сетей вследствие комплексных молекулярных и структурных перестроек, что в итоге приводит к появлению спонтанной эпилептической активности. Эти наблюдения позволили предположить, что переход от эпилептогенеза к фазе хронической эпилепсии не является ступенчатым процессом [362].

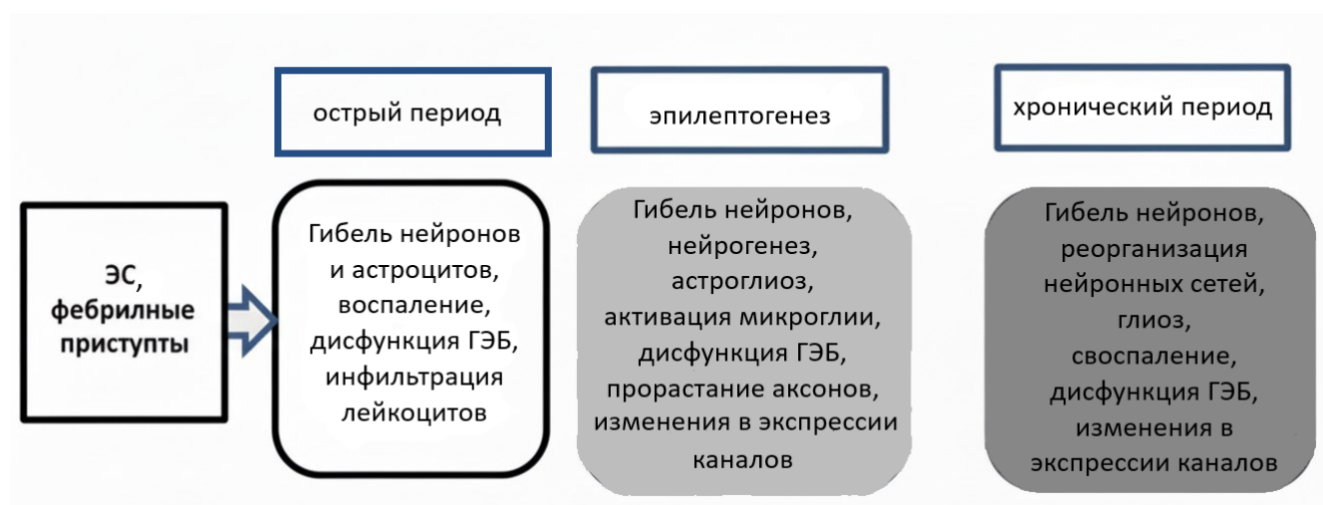


Рисунок 1.4 – Стадии развития медиальной височной эпилепсии, индуцированной ЭС или фебрильными приступами [148]

В поддержку данной гипотезы недавние эксперименты с использованием длительного видео-ЭЭГ-мониторинга показали, что развитие приобретенной эпилепсии описывается сигмоидной (логистической) зависимостью от времени [275]: после появления первого спонтанного эпилептического приступа заболевание продолжает прогрессировать.

Наиболее изученными примерами эпилептогенеза у взрослых являются случаи развития приобретенной эпилепсии вследствие ЧМТ, инсульта и эпилептического статуса.

Установлено, что после умеренной или тяжелой ЧМТ острые (ранние) приступы возникают примерно в 25 % наблюдений [555], а хроническая эпилепсия формируется у 10-25 % пациентов [516].

Около 11 % случаев приобретенной эпилепсии у взрослых связано с постинсультными судорогами; при этом тяжесть и объем очага инсульта напрямую коррелируют с течением и прогрессированием эпилепсии [201].

Среди взрослых пациентов примерно у 25 % больных впервые диагностированная эпилепсия дебютирует в виде эпилептического статуса.

Развитие эпилепсии возможно также в период раннего постнатального периода и раннего детства. Показано, что примерно 30 % детей, перенесших неонатальные судороги, впоследствии развивают эпилепсию [483]. Кроме того, установлена четкая связь между длительными и сложными фебрильными приступами в раннем постнатальном периоде и развитием в дальнейшем когнитивных нарушений и эпилепсии [330].

Для изучения механизмов развития приобретенной эпилепсии созданы различные экспериментальные модели, в которых повреждения мозга разного генеза – ЧМТ, ишемия, гипертермия, эпилептический статус – приводят к формированию эпилептического синдрома.

Среди них киндлинговая модель и модель эпилептического статуса, вызванная химическим или электрическим раздражением, являются наиболее распространенными и рекомендованными Международной лигой по борьбе с эпилепсией (ILAE) экспериментальными моделями для изучения эпилептогенеза, а также для тестирования соединений, разрабатываемых с целью предотвращения развития приобретенной эпилепсии.

Обе эти модели относятся к моделям височной эпилепсии – наиболее распространенной формы фокальной эпилепсии у взрослых.

В острой пилокарпиновой модели височной эпилепсии у крыс введение химического конвульсанта пилокарпина сопровождается развитием внутрисосудистых провоспалительных изменений, которые обуславливают повышение проницаемости ГЭБ. Нарушения барьерной функции наиболее

выражены в областях мозга, чувствительных к холинергическим воздействиям, в частности в структурах лимбической системы и гиппокампе [366, 382, 585]. В нормальных условиях ГЭБ выполняет ключевую роль в разделении центральной нервной системы и периферической иммунной системы. Однако при его повышенной проницаемости в мозговой паренхиме отмечается инфильтрация периферических иммунных клеток и компонентов крови. Эти клетки, включая продуценты металлопротеиназ, дополнительно нарушают целостность ГЭБ и способствуют деструктивным изменениям в нервной ткани [428]. Попадая в мозг, циркулирующие лейкоциты активируют микроглию и астроциты, что усиливает воспалительный каскад и снижает судорожный порог [344, 585, 629]. Дополнительно усиливается продукция провоспалительных цитокинов, в частности IL-1 β , который, активируя NMDA-рецепторы, оказывает прямое возбуждающее действие на нейроны и способствует развитию эксайтотоксичности [629].

Повышение проницаемости ГЭБ наблюдается как в острой, так и в латентной фазах эпилепсии, включая периоды до появления спонтанных моторных судорог [366]. В острой фазе пилокарпиновой модели эпилепсии в гиппокампе сначала происходит увеличение проницаемости ГЭБ к микромолекулам (через 30 мин после введения пилокарпина до наступления ЭС), далее к макромолекулам (через 5 ч после ЭС), что влечет за собой более выраженные повреждения мозговой ткани. Спустя 24 ч сохраняется лишь повышенная проницаемость ГЭБ для микромолекул, сопровождающаяся последствиями, связанными с ранее возникшей дисфункцией барьера [382].

Способность пилокарпина индуцировать ЭС зависит от активации M1 подтипа мускаринового рецептора, что было показано в экспериментах на мышах, которым генетически «выключали» рецепторы M1, после чего у них не возникало реакции на введение пилокарпина [226]. Другие холиномиметики, такие как карбахол и оксотреморин, при инъекции системно или непосредственно в мозг, также способны вызывать приступы и связанные с ними повреждения мозга [436]. Кроме того, системное введение атропина, антагониста мускариновых рецепторов,

способно предотвратить развитие ЭС, индуцированного пилокарпином. Однако, атропин эффективен только перед началом приступа, после инициации припадков инъекции атропина становятся неэффективными, поскольку поддержание приступа зависит от других механизмов [136]. Эксперименты с культивированными нейронами гиппокампа продемонстрировали, что пилокарпин, опосредуя свое действие через мускариновые рецепторы, вызывает дисбаланс между возбуждающей и тормозной передачей, что и приводит к генерации приступов [467]. Кроме того, исследования *in vivo* показали увеличение концентрации глутамата в гиппокампе после начала приступа в ответ на введение пилокарпина [525]. После инициации приступа с участием M1 рецепторов, дальнейшая их манифестация поддерживается работой NMDA-рецепторов [411].

Височная эпилепсия характеризуется возникновением эпилептических приступов, локализованных в височных отделах головного мозга [346]. Данная форма эпилепсии часто оказывается резистентной к противоэпилептической терапии и почти всегда сопровождается нарушениями когнитивных и поведенческих функций у пациентов [110].

Изменения в поведении животных во время литий-пилокарпиновой инициации коррелирует с изменениями ЭЭГ активности. Сначала появляются одиночные высоковольтные разряды на ЭЭГ, которые разделены прерывающейся низковольтной активностью. Со временем частота разрядов увеличивается, что приводит к генерализованному тонико-клоническому приступу [297]. Непосредственное начало приступов у некоторых животных фиксировалось в вентральной части мозга (*ventral globus pallidum* и *nucleus acumbens*), после чего распространялось на другие области. Также регистрировались случаи начала электрографических приступов одновременно в нескольких участках мозга.

Основные морфофункциональные особенности височной эпилепсии, ассоциированной со склерозом гиппокампа, включают:

- а) потерю пирамидных нейронов и интернейронов в структурах гиппокампа;
- б) изменения в составе и/или экспрессии рецепторов и ионных каналов, обуславливающие хроническое повышение возбудимости нейронных сетей;

в) структурно-адаптивные реакции, такие как прорастание аксонов и активация нейрогенеза;

г) развитие глиоза, в том числе изменений в функционировании глиальных клеток;

д) дисфункцию гематоэнцефалического барьера (ГЭБ);

е) нейровоспалительные процессы;

ж) хронические когнитивные и поведенческие расстройства.

Все перечисленные изменения обнаруживаются у пациентов с фармакорезистентной височной эпилепсией [103, 416, 597], а также воспроизводятся в ее экспериментальных моделях [143, 393, 623, 642].

Патофизиология развития эпилепсии включает:

Гибель нейронов и глиоз

Как отмечалось выше, первичное поражение, являющееся пусковым механизмом эпилептогенеза, часто приводит к гистопатологическим изменениям в мозге. Наиболее распространенной гистопатологической особенностью височной эпилепсии является потеря нейронов, расположенных в области зубчатой извилины, также известных как мшистые клетки.

К другим характерным гистопатологическим изменениям относится склероз областей CA1-CA3 гиппокампа, характеризующийся потерей пирамидных нейронов и глиозом в зоне CA1 (сектор Соммера), а также в зоне CA3b гиппокампа.

У пациентов с височной эпилепсией чаще всего наблюдаются двусторонние, но асимметричные изменения в гиппокампе, при этом один гиппокамп, как правило, более поврежден, чем другой [303].

Гистопатологические изменения также описаны в энторинальной коре и миндалине у пациентов с медиальной формой височной эпилепсии [290], а также в других отделах мозга [223, 456, 460].

Характер и степень нейронного повреждения у пациентов с этой формой эпилепсии могут быть весьма неоднородными [131].

В экспериментальных моделях височной эпилепсии, основанных на химической или электрической индукции эпилептического статуса, наблюдается

повреждение нейронов в соответствующих областях височной доли и других отделах головного мозга. Степень этого повреждения в значительной мере зависит от протокола исследования, в частности: 1) типа модели эпилепсии, примененной концентрации хемоконвульсанта и пути его введения (например, внутривентрикулярно или внутримозгово);

2) продолжительности и тяжести эпилептического статуса;

3) использования фармакологических агентов (например, диазепама) для прекращения повторяющихся судорог; а также многих других факторов (таких как возраст или линия животных) [131].

Киндлинговая модель является одной из старейших и наиболее изученных экспериментальных моделей височной эпилепсии.

Явление киндлинга заключается в том, что повторяющаяся электрическая стимуляция определенных участков головного мозга со временем приводит к снижению порога возникновения эпилептических судорог в ответ на электрическую стимуляцию. Обычно такая стимуляция не вызывает развития спонтанных эпилептических приступов [377, 378].

Характерной особенностью киндлинга является отсутствие или незначительное повреждение нейронов по сравнению с моделями височной эпилепсии, индуцированными ЭС. Однако гистопатологические данные свидетельствуют о том, что даже единичный эпилептический приступ, спровоцированный электрической стимуляцией у взрослых крыс, может привести к гибели нейронов ЦНС [553].

Показано, что повторная электрическая стимуляция перфорантных путей у анестезированных животных вызывает значительную гибель нейронов в зубчатой извили и, в меньшей степени, в областях CA3 и CA1 гиппокампа [523].

В экспериментальных моделях височной эпилепсии, вызванной ЭС, индуцированным инъекцией проэпилептических соединений (пилокарпина или каиновой кислоты), нейрональная гибель наблюдается и в других отделах головного мозга [100, 524]. ЭС, вызванный инъекцией каиновой кислоты, приводит к выраженной гибели нейронов в гиппокампе, миндалине, грушевидной и

энторинальной коре, а также в таламусе. При этом повреждение гиппокампа включает пирамидные нейроны областей CA1 и CA3 и нейроны зубчатой извилины [475].

В исследованиях с использованием пилокарпиновой модели ЭС выявлена гибель клеток обонятельной коры, миндалины, миндалевидного комплекса, таламуса, коры головного мозга, гиппокампа и черной субстанции [147].

Как отмечалось выше, потеря интернейронов и мшистых клеток хилуса зубчатой извилины является характерной особенностью ЭС [639]. Предполагается, что вызванная приступами гибель этих нейронов может лежать в основе расторможения афферентных путей, проецирующихся на гиппокамп, и, таким образом, играть важную роль в патофизиологии височной эпилепсии [283].

Еще одним гистопатологическим признаком эпилептогенной ткани является глиоз. Известно, что активация микроглии и астроцитов в ходе ЭС приводит к повышению уровня интерлейкина-1 β [633].

Кроме того, было показано, что существенные и хронические изменения морфологии астроцитов вызывают длительное повышение уровня интерлейкина-1 β , аденозинкиназы и усиление активности цитокинов. Было установлено, что все эти факторы вовлечены в развитие склероза гиппокампа при височной эпилепсии [45, 128, 540, 550].

Активация астроцитов в ходе эпилептогенеза также приводит к снижению экспрессии каналов Kir4.1, локальной потере аквапорина 4 (AQP4) на «ножках» астроцитов, а также к дисфункции *gap junctions* (щелевых контактов). Эти изменения могут лежать в основе нарушения гомеостаза воды и ионов калия (K⁺), а также способствовать хроническому повышению возбудимости нейронов в эпилептогенной ткани (рисунок 1.5) [423].

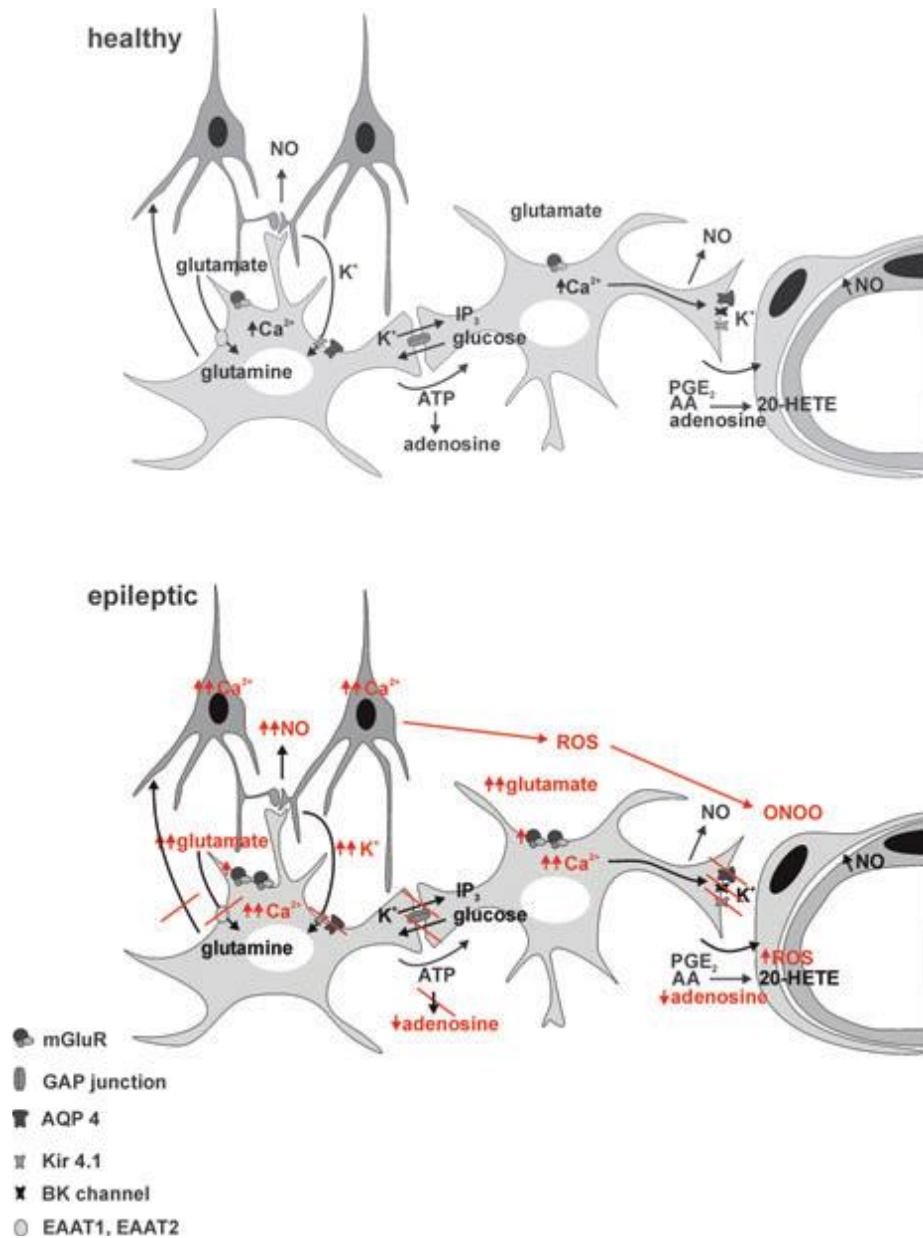


Рисунок 1.5 – Изменения функциональных свойств активированных астроцитов в эпилептогенной ткани [423]

Проращение аксонов мшистых клеток

Снижение экспрессии Kir4.1, локальная потеря AQP4 на «ножках» астроцитов, а также дисфункция *gap junctions* приводят к нарушению регуляции внеклеточного калиевого гомеостаза и повышенной возбудимости нейронов.

Это, в свою очередь, вызывает расстройство калий-зависимых взаимодействий между нейронами и сосудами.

Дисфункция *gap junctions* в астроцитах также нарушает перенос метаболитических субстратов и усугубляет энергетический дефицит, возникающий вследствие эпилептических приступов.

Кроме того, снижение экспрессии транспортеров глутамата и фермента глутаминсинтетазы может приводить к повышению уровня внеклеточного глутамата и ослаблению эффективности тормозных синаптических передач [314].

Способность астроцитов накапливать ионы калия обеспечивается работой калиевых каналов Kir4.1, AQP4, а также коннексинов Cx43 и Cx30.

Повреждение нейронов и развитие глиоза могут приводить к структурным изменениям в организации нейронных сетей.

Реорганизация синаптических связей в гиппокампе после первичного повреждения была изучена в экспериментальных моделях височной эпилепсии и описана в мозговой ткани пациентов с данной формой заболевания [9, 49, 127, 463, 633].

Гибель значительного числа мшистых клеток зубчатой извилины и их пространственное смещение могут приводить к гистопатологическому прорастанию аксонов, что, в свою очередь, способствует формированию аномальных возбуждающих связей в зубчатой извилине и области СА3 гиппокампа, создавая патологический возбуждающий контур (рисунок 1.6) [34, 274, 517].

Показано, что вновь образованные аномальные связи обладают повышенной вероятностью активации за счет увеличения количества AMPA-рецепторов в ранее существовавших синапсах и каинатных рецепторов в новообразованных контактах [67, 181].

Экспериментальные данные свидетельствуют, что дисбаланс между возбуждающей и тормозной синаптической передачей в системе «зубчатая извилина – гиппокамп», возникающий даже при незначительном увеличении числа возбуждающих коллатералей, может быть достаточным условием для хронического повышения возбудимости нейронов в этом участке ЦНС [335, 517].

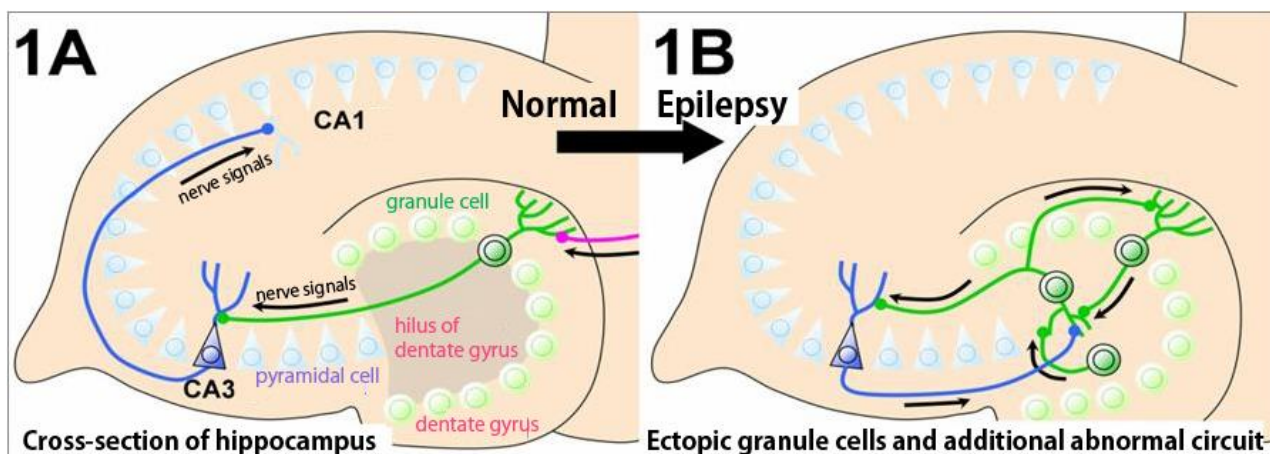


Рисунок 1.6 – Образование аномальных нейронных цепей в гиппокампе в экспериментальной модели височной эпилепсии

Слева: срез гиппокампа контрольной крысы. Гранулярные клетки (ГК, зеленый) формируют плотный слой в зубчатой извилине гиппокампа. ГК получают афферентные сигналы через дендриты, расположенные во внешней части зубчатой извилины, и передают импульсы по длинным аксонам в область СА3 гиппокампа. Пирамидные нейроны зоны СА3, в свою очередь, передают сигнал в зону СА1 (черные стрелки).

Справа: гиппокамп эпилептической крысы. Аксоны смещенных гранулярных клеток (ectopic granule cells) формируют новые проекции на нейроны зоны СА3, на соседние смещенные ГК, а также на дендриты ГК, расположенные во внешнем слое зубчатой извилины. Пирамидные нейроны зоны СА3 при этом образуют дополнительную аномальную сеть за счет иннервации ГК [517]

Нейрогенез

Нейрогенез – это процесс развития, включающий пролиферацию, миграцию и дифференцировку нейробластов, а также синаптическую интеграцию вновь образованных нейронов в существующие нейронные сети [373].

Доказано, что у взрослых млекопитающих нейрогенез происходит в субвентрикулярной зоне передних рогов боковых желудочков и в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа [13, 613].

На нейрогенез в зубчатой извилине во взрослом возрасте влияют различные факторы – в частности, старение, стресс, физическая активность, факторы роста, нейромедиаторы и гормоны.

Установлено, что нейрогенез в этой области мозга зависит от судорожной активности. Значительное его усиление наблюдается в гиппокампе человека [122, 325] и у животных после эпилептических приступов, индуцированных методами «киндлинга» [315], электрической стимуляцией [384], либо после эпилептического статуса, вызванного введением пилокарпина [21] или каиновой кислоты [469].

Также показано, что эпилептические приступы влияют на миграцию новообразованных нейронов, что приводит к формированию эктопических гранулярных клеток. Как отмечалось выше, такие клетки аномально интегрируются в сеть зубчатая извилина – СА3, устанавливая афферентные контакты с аксонами мшистых клеток [28] и способны к спонтанной генерации потенциалов действия, что в конечном итоге способствует повышению возбудимости нейронных сетей.

Внутриклеточный кальций и окислительный стресс

В последние годы накоплен значительный массив данных, свидетельствующих о тесной взаимосвязи между нарушениями внутриклеточного кальциевого гомеостаза и развитием окислительного стресса в нервной ткани. Повышение возбудимости клеток может приводить к увеличению содержания внутриклеточного Ca^{2+} , что способно усиливать образование активных форм кислорода (АФК) через несколько взаимосвязанных молекулярных механизмов [130]. Понимание этих механизмов представляет особую значимость для нейрофизиологии, поскольку нейроны отличаются повышенной уязвимостью к окислительному стрессу вследствие высокого уровня потребления кислорода (около 20 % от общего потребления организмом при массе мозга ~ 2 % от массы тела), значительного содержания полиненасыщенных жирных кислот в мембранах и относительно низкой активности отдельных антиоксидантных ферментов, прежде всего каталазы.

Кальций является универсальным вторичным мессенджером, контролирующим критические клеточные процессы во всех эукариотических

клетках [130]. Кальциевые сигналы регулируют как быстрые биологические процессы, происходящие в миллисекунды и секунды (например, сокращение мышц или генерация нервных импульсов), так и долговременные процессы, которые могут длиться несколько дней (например, пролиферацию клеток и синаптическую пластичность) [581]. Специфичность клеточных кальциевых сигналов обеспечивается сложной системой, включающей многочисленные ионные каналы, насосы и обменники, управляющие потоками кальция через плазматическую мембрану и мембраны внутриклеточных органелл. Развитие новейших технологий, направленных на изучение конкретных внутриклеточных процессов, освещает центральную роль эндоплазматического ретикулума и митохондрий в регуляции кальция [222]. Эндоплазматический ретикулум является главным внутриклеточным кальциевым запасником, от которого в значительной мере зависит уровень и динамика внутриклеточных кальциевых концентраций. В последнее время большое внимание в исследованиях уделяется механизмам кальциевого гомеостаза митохондрий. Митохондрии формируют и декодируют клеточные кальциевые сигналы и выполняют центральную роль в клеточном метаболизме и гибели клеток. Способность митохондрий активно накапливать и отдавать кальций имеет важные последствия для формирования цитозольных кальциевых сигналов [267, 268]. В возбудимых клетках митохондрии локализуются в непосредственной близости от кальциевых каналов плазматической мембраны и влияют на буферную емкость кальция в субмембранных микродоменах. Показано, что длительное повышение внутриклеточного кальция может приводить к открытию митохондриальной поры неспецифической проницаемости (mPTP), что инициирует регулируемую клеточную гибель по механизмам апоптоза и некроза [250, 454].

Повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} приводит к генерации активных форм кислорода через несколько взаимосвязанных механизмов. Во-первых, избыточное поступление Ca^{2+} в митохондриальный матрикс стимулирует активность ферментов цикла трикарбоновых кислот (изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы), что ведет к усилению потока электронов в электрон-транспортной цепи и повышению утечки электронов на комплексах I и III с

образованием супероксидного анион-радикала (O_2^-) [20, 277]. Во-вторых, Ca^{2+} прямо или опосредованно (через PKC- и Rac1-зависимые пути) активирует NADPH-оксидазы (NOX), являющиеся одним из основных источников немитохондриальной продукции АФК в нейронах [96]. В-третьих, кальций-зависимая активация кальпаин-опосредованная конверсия ксантиндегидрогеназы также вносит вклад в продукцию супероксида [87]. Наконец, Ca^{2+} -зависимая активация фосфолипазы A_2 высвобождает арахидоновую кислоту, метаболизм которой по циклооксигеназному и липоксигеназному путям сопровождается дополнительной генерацией АФК [406].

Среди кальций-зависимых сигнальных молекул, играющих роль в патогенезе окислительного стресса, особого внимания заслуживают несколько ключевых белков. Кальмодулин (CaM) – универсальный кальциевый сенсор – активирует, в частности, нейрональную NO-синтазу (nNOS), что приводит к продукции оксида азота (NO). Взаимодействие NO с супероксидным анион-радикалом приводит к образованию высокореакционного пероксинитрита ($ONOO^-$), вызывающего нитрирование белков и окислительное повреждение ДНК [444]. Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII), являющаяся ключевым регулятором синаптической пластичности, также чувствительна к окислительному стрессу: окислительная модификация остатков Met281/ Met282 приводит к ее кальций-независимой автономной активации, что замыкает порочный круг между кальциевой дисрегуляцией и окислительным стрессом [182; 434]. Кальцинейрин (PP2B) – кальций/кальмодулин-зависимая фосфатаза – участвует в активации транскрипционного фактора NFAT и регулирует экспрессию генов, связанных с нейровоспалением и клеточной гибелью [619].

Современное понимание окислительного стресса претерпело существенную концептуальную эволюцию. Классическое определение, трактовавшее это состояние как простой дисбаланс между продукцией активных форм кислорода (АФК) и ёмкостью антиоксидантной защиты, было переосмыслено в работах D.P. Jones как нарушение редокс-сигналикации и редокс-контроля, при котором ключевое значение имеет не абсолютный уровень АФК, а сдвиг стационарного

состояния редокс-пар и нарушение специфических сигнальных взаимодействий через обратимое окисление цистеиновых остатков белков-мишеней. В рамках концепции «редокс-кода» функциональное состояние клетки определяется пространственно-временной организацией редокс-сетей в субклеточных компартментах, причём основные редокс-пары (GSH/GSSG, тиоредоксин восстановленный/окисленный, NADPH/NADP⁺) регулируются независимо в цитоплазме, митохондриях и ядре [519].

Клетки ЦНС обладают системой антиоксидантной защиты, включающей ферментативные (супероксиддисмутаза – цитоплазматическая SOD1, митохондриальная SOD2; каталаза; глутатионпероксидаза – GPx; тиоредоксиновая система) и неферментативные компоненты (восстановленный глутатион – GSH, аскорбиновая кислота, α -токоферол). Нейроны особенно уязвимы к дефициту антиоксидантной защиты, поскольку глутатионовый синтез преимущественно осуществляется в астроцитах, которые затем поставляют предшественники GSH нейронам. Хроническое повышение внутриклеточного Ca²⁺ приводит к прогрессивному истощению глутатионового пула и сдвигу редокс-потенциала пары GSH/GSSG в окислительную область, что нарушает функцию Nrf2/ARE-сигнального пути – ключевого адаптивного редокс-ответа, обеспечивающего транскрипцию генов антиоксидантных ферментов [99]. Согласно современным данным, пороговое условие необратимого повреждения нейронов определяется не дисбалансом продукции/нейтрализации АФК как таковым, а компартмент-специфическим сдвигом редокс-потенциалов ключевых тиол-дисульфидных пар, прежде всего в митохондриях [440].

В условиях патологической активации глутаматная рецепция является одним из ключевых иницирующих факторов нарушения редокс-гомеостаза в нейронах. Глутамат-опосредованная эксайтотоксичность представляет собой центральный механизм, связывающий кальциевую дисрегуляцию и редокс-дисбаланс в нервной ткани. Ионотропные рецепторы (прежде всего NMDA-рецепторы, обладающие высокой проницаемостью для Ca²⁺) обеспечивают поступление Ca²⁺ из внеклеточной среды, а метаботропные стимулируют высвобождение Ca²⁺ из

внутриклеточных депо. Принципиально важно, что нейротоксические последствия активации NMDA-рецепторов зависят от их субклеточной локализации: активация синаптических NMDA-рецепторов запускает нейропротекторные сигнальные каскады (активация CREB, экспрессия BDNF) и адаптивный Nrf2-зависимый редокс-ответ, тогда как стимуляция extrasинаптических NMDA-рецепторов инициирует проапоптотические пути и сдвигает редокс-потенциал митохондриальной пары GSH/GSSG в проапоптотическую область [231, 232]. Помимо этого, обратный режим работы $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в условиях деполяризации и накопления внутриклеточного Na^+ может служить дополнительным источником патологического притока Ca^{2+} [40].

К кальций-зависимым процессам, активируемым вследствие повышения возбудимости нейронных сетей, относятся образование арахидоновой кислоты под действием фосфолипазы A_2 и синтез NO при активации NO-синтазы, которые формируют самоподдерживающийся цикл редокс-дисрегуляции через гиперокисление пероксиредоксинов и переключение H_2O_2 из режима специфической сигнальной молекулы в режим неспецифического окислительного агента [519].

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что нарушение редокс-сигналикации не только является следствием эпилептических приступов, но и играет активную роль в процессе эпилептогенеза. АФК, прежде всего H_2O_2 , способны модулировать активность ионных каналов и рецепторов через прямое обратимое окисление редокс-чувствительных цистеиновых остатков – физиологический способ редокс-сигналикации, который при патологических концентрациях АФК становится дисрегуляторным [296]. Показано, что редокс-дисрегуляция нарушает баланс между возбуждением и торможением: прямое окисление редокс-чувствительных сайтов NMDA-рецепторов оказывает ингибирующее действие, тогда как при патологических концентрациях АФК реализуются косвенные механизмы сенситизации (через супероксид-опосредованное снижение NO-зависимого ингибирования и активацию Src-киназы), а окислительная модификация β -субъединиц ГАМК(A)-рецепторов

снижает амплитуду ингибиторных токов [23, 103, 605]. Кроме того, АФК активируют редокс-чувствительные транскрипционные факторы (NF- κ B, AP-1) через окисление цистеинов, индуцируя экспрессию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6) и замыкая порочный круг «нарушение редокс-сигналикации – нейровоспаление – гипервозбудимость» [368, 474, 595]. Данные генетических исследований подтверждают эту связь: мутации в генах, кодирующих митохондриальные белки (POLG, SCO2) и полиморфизмы генов антиоксидантных ферментов (SOD2, GPx1) ассоциированы с эпилептическими фенотипами [496, 575].

Таким образом, дисбаланс возбуждающих и тормозных систем и нарушение редокс-сигналикации являются ключевыми факторами эпилептогенеза, нарушающими гомеостатическую регуляцию нейронных сетей. Взаимосвязь между повышением внутриклеточного Ca^{2+} , компартмент-специфическим сдвигом редокс-потенциалов, истощением глутатионового пула и активности митохондриальных антиоксидантных ферментов, а также активацией нейровоспалительных каскадов формирует сложную самоподдерживающуюся систему, в которой кальциевая дисрегуляция и редокс-дисбаланс взаимно усиливают друг друга, способствуя прогрессированию нейронального повреждения и хронизации эпилептического процесса, хотя последняя определяется также структурной реорганизацией нейронных сетей [31, 595, 605].

Потенциал-зависимые и лиганд-управляемые ионные каналы

NMDA-рецепторы играют ключевую роль в синаптической пластичности [80], эксайтотоксичности [392, 441] и ЭФА [118]. NMDA-рецептор является тетрамерным комплексом, обычно состоящим из двух субъединиц GluN1 и двух субъединиц GluN2 (подтипы A-D). Активация этого рецептора вызывает открытие ионного канала, проницаемого для Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Наряду с классической локализацией на постсинаптической мембране NMDA-рецепторы, содержащие GluN2B-субъединицу, также могут быть расположены на пресинаптической мембране и за пределами синапса [198, 379]. Было установлено, что в нейронах энторинальной коры животных с хронической эпилепсией наблюдается

повышенная экспрессия пресинаптических NMDA-рецепторов. Активация этих рецепторов приводит к облегчению высвобождения глутамата [631], что может способствовать эксайтотоксичности и ухудшению эпилептических приступов.

Различные изменения экспрессии мРНК или белков GluN1 и GluN2B, а также их фосфорилирование были описаны в различных отделах мозга у пациентов с эпилепсией и у животных после индукции эпилептических приступов [421] или на хронической стадии болезни [170]. Уровень GluN2B-субъединицы был повышен как в пресинаптических, так и в экстраинаптических участках. Однако снижение фосфорилирования этих субъединиц наблюдалось в процессе эпилептогенеза, спровоцированного ЭС [192]. Кроме того, эктопическая экспрессия GluN2B и GluN1 была обнаружена в астроцитах после индукции ЭС. Блокада GluN2B с помощью ифенпродила после ЭС существенно снижала уровень гибели нейронов в зонах CA1 и CA3 гиппокампа, что свидетельствует о роли GluN2B-субъединицы NMDA-рецептора в развитии эксайтотоксичности, наблюдаемой на протяжении эпилептогенеза [192].

Среди других глутаматергических рецепторов в контексте эпилептогенеза височной эпилепсии наиболее широко изучены каинатные рецепторы. Было продемонстрировано, что высокочастотная стимуляция может приводить к повышению экспрессии каинатных рецепторов с субъединицей GluK1, вовлеченных в пресинаптическую регуляцию высвобождения глутамата, что способствует дальнейшему повышению возбудимости нейронных сетей [121]. Повышение экспрессии GluK1 наблюдалось также на образцах тканей пациентов с височной эпилепсией, что может указывать на вовлечение каинатных рецепторов в генерацию и поддержание спонтанных эпилептических приступов [184]. Как отмечалось выше, повышение экспрессии каинатных рецепторов наблюдалось в новообразованных синапсах аксонов мшистых клеток, что предполагает их вовлечение в дисбаланс возбудительной и тормозной синаптической передачи в нейронной сети «зубчатая извилина – CA3». Помимо прямого воздействия, активация этих рецепторов на пресинаптической мембране может влиять на

возбудимость нейронов косвенно, через регуляцию высвобождения тормозного нейромедиатора ГАМК [121].

Участие ГАМК-рецепторов в патогенезе эпилепсии известно еще с античных времен, когда для угнетения судорог использовались различные растительные средства, действие которых основано на усилении ГАМК-эргического торможения [365]. Однако клеточные и молекулярные изменения ГАМК-эргической синаптической передачи, связанные с эпилептогенезом, и механизмы влияния этих изменений на процесс развития приобретенной эпилепсии остаются в значительной степени невыясненными. Выдвинуто предположение, что ГАМК-зависимая сигнализация снижается в рамках эпилептогенного механизма, позволяющего глутаматергической сигнализации «выйти из-под контроля» [334]. Наблюдаются также фенотипические изменения ГАМК-рецепторов, которые создают деполяризующие реакции вместо гиперполяризующих ответов на ГАМК [199]. Так, в научных исследованиях последних лет освещена двойная функция ГАМК-рецепторов. Как отмечалось выше, активация этих рецепторов в незрелом мозге может приводить к деполяризации клеточной мембраны, что, как показали исследования, играет важную роль в развитии незрелого мозга. Активация ГАМК-рецепторов в зрелом мозге, напротив, как правило, приводит к гиперполяризации мембраны клеток. Положительный сдвиг тормозных постсинаптических потенциалов (потенциала реверсии для Cl^-) наблюдается и в зрелом мозге после травмы, гипертермии, ЭС, ишемических повреждений и т.д. Установлено, что положительный сдвиг тормозных постсинаптических потенциалов после повреждений мозга опосредуется повышением внутриклеточного уровня Cl^- вследствие повышенной экспрессии ко-транспортера NKCC1 в нейронах, что облегчает накопление внутриклеточного Cl^- , а также снижением экспрессии KCC2 ко-транспортера, участвующего в транспорте K^+-Cl^- [66]. Изменения экспрессии NKCC1 и KCC2 в гиппокампе были описаны у больных височной эпилепсией и на экспериментальных моделях этой формы эпилепсии [336]. Эти наблюдения привели к предположению, что изменения в экспрессии ко-транспортеров, вовлеченных в регуляцию внутриклеточных концентраций Cl^- , могут в

значительной степени влиять на развитие приобретенной эпилепсии. Предложенная гипотеза не подтвердилась в исследованиях с использованием пилокарпиновой модели височной эпилепсии и с применением антагониста NKCC1 ко-транспортера (буметанида), но до сих пор остается привлекательной для многих исследователей [92].

Дофаминергические проекции лимбической системы также играют немаловажную роль в развитии ЭФА и эпилепсии. Дофаминергическая система обеспечивает комплексную нейромодуляторную регуляцию возбудимости нейронов, прежде всего благодаря активации D1- и D2-подтипов дофаминовых рецепторов. Было показано, что нарушение этой регуляции может способствовать распространению ЭФА в лимбической системе. Современные данные свидетельствуют об активации внутриклеточных сигнальных путей, опосредованных дофаминовыми рецепторами, вовлеченных в процесс эпилептогенеза, что подталкивает к перспективам поиска новых мишеней для лечения эпилепсии [89].

Роль калиевых каналов в процессе развития эпилепсии варьирует в зависимости от экспериментальной модели. Так, Oliveira и соавторы (2010) продемонстрировали участие Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов в регуляции возбудимости нейронов через контроль частоты потенциалов действия; их роль носит защитный характер, и дефекты калиевой сигнализации могут привести к развитию эпилептических синдромов [435]. Калиевые каналы семейства Kv7, особенно Kv7.2 и Kv7.3, являются ключевыми регуляторами нейронной активности, обеспечивая медленную активацию и деактивацию тока K^+ , что прямо или косвенно влияет на возбудимость мембраны через модуляцию синаптических ответов [519]. Как отмечалось ранее, Kir4.1-каналы могут также играть роль в эпилептогенезе вследствие нарушения аккумуляции K^+ астроцитами при снижении их экспрессии [633].

Потенциал-зависимые Na^+ -каналы играют центральную роль в развитии потенциала действия [216]. Изменения функции натриевых каналов выявлены в нервной ткани пациентов с эпилепсией [333], а также в экспериментальных

моделях ЭФА и эпилепсии [58]. Среди различных изоформ Na^+ -каналов, экспрессируемых в головном мозге [108], наибольшее изучение уделяется Nav1.6, поскольку они плотно экспрессируются на начальном участке аксонов [202]. Увеличение экспрессии Nav1.6, индуцированное ЭФА, было обнаружено как в киндлинговой модели эпилептических приступов [82], так и в моделях височной эпилепсии [233]. Также продемонстрировано, что снижение уровня экспрессии Nav1.6 уменьшает вероятность развития приступов [82], а также снижает частоту разрядов во многих типах нейронов [471, 485, 587]. Кроме того, мутации гена SCN8A, кодирующего Nav1.6, связаны с детской эпилептической энцефалопатией [592]. Недавние исследования с использованием пилокарпиновой модели эпилепсии выявили повышение амплитуды и изменения кинетических характеристик потенциал-зависимых Na^+ -токов, особенно персистентного тока, в нейронах различных участков ЦНС на протяжении эпилептогенеза, что может свидетельствовать о вовлечении Na^+ -каналов в патофизиологию развития приобретенной эпилепсии.

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы обеспечивают регуляцию возбудимости нейронов и контроль кальцийзависимых внутриклеточных сигнальных путей. Известно, что активация низкопороговых Ca^{2+} -каналов Т-типа вносит существенный вклад в генерацию пик-волновых комплексов, наблюдаемых при абсансной форме эпилепсии [112]. Экспериментальные модели этой формы эпилепсии показывают, что изоформы CaV3.1 и CaV3.2 играют важную роль в этиологии этого состояния [493]. Существенные изменения экспрессии низкопороговых и высокопороговых Ca^{2+} -каналов, вызванные высокочастотной электрической стимуляцией или эпилептогенной стимуляцией, индуцированной пилокарпином, также указывают на вовлечение Ca^{2+} -каналов в эпилептогенез [159].

Воспалительные процессы

Активация микроглии, астроцитов, эндотелиальных клеток и периферических иммунных клеток, а также экспрессия воспалительных медиаторов была впервые обнаружена у пациентов с энцефалитом Расмуссена [473]. Симптомы активации иммунной системы у некоторых пациентов с

эпилепсией, высокая вероятность приступов при аутоиммунных заболеваниях и открытие лимбического энцефалита как возможной причины эпилепсии привели к предположению, что иммунные и воспалительные механизмы играют значительную роль в патофизиологии эпилепсии [77, 552, 599]. Современные данные указывают на то, что воспаление может служить как следствием, так и причиной развития эпилепсии. Различные провоспалительные медиаторы были обнаружены после хирургической резекции мозговой ткани у пациентов с резистентной эпилепсией, включая височную эпилепсию и корковую дисплазию [132, 552].

Экспериментальные исследования показывают, что эпилептические приступы способны вызывать воспаление головного мозга, а повторяющиеся приступы могут приводить к хроническим воспалительным процессам в мозговой ткани [478, 596] (рисунок 1.7). Гибель нейронов, индуцированная судорогами, может способствовать воспалению, но не является его обязательным условием.

Модели системных воспалительных реакций и инфекций ЦНС демонстрируют, что воспаление мозга увеличивает предрасположенность к судорогам [329]. Кроме того, роль воспаления в развитии эпилепсии подтверждается фармакологическими подходами: ингибирование отдельных медиаторов воспаления снижает вероятность развития некоторых форм приобретенной эпилепсии [298, 584]. У генетически модифицированных мышей с нарушениями воспалительных путей наблюдались изменения восприимчивости к эпилептической активности [160, 498]. Таким образом, приведенные данные указывают на значимую роль воспалительных процессов в патогенезе приобретенной эпилепсии.

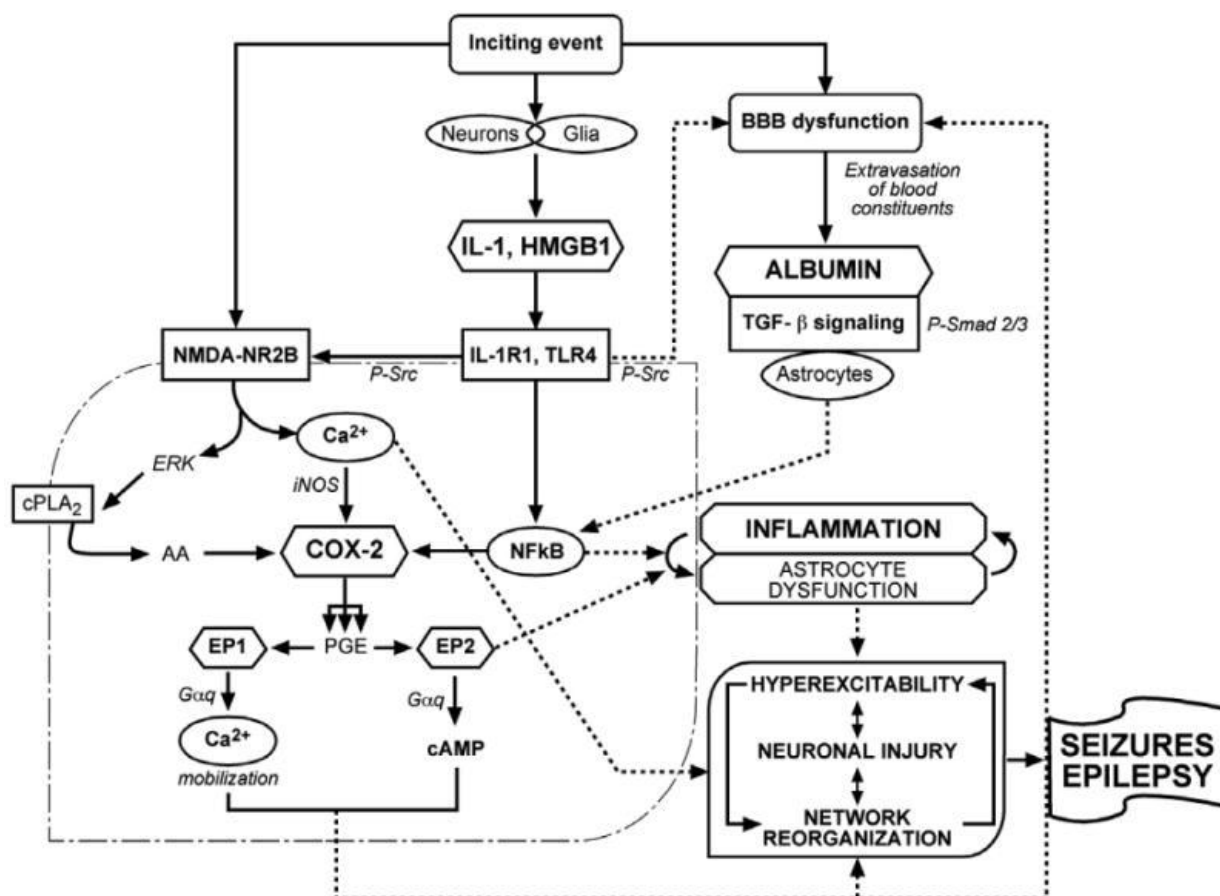


Рисунок 1.7. Схема патологического каскада после повреждения мозга, включающего три ключевых воспалительных пути: IL-1/TLR-NF-κB-COX-2, TGF-β и связанные сигнальные механизмы. Активация микроглии, астроцитов и эндотелиальных клеток, а также дисфункция ГЭБ приводят к высвобождению IL-1β и HMGB1. Активация NMDA-рецепторов через GLUN2B и Src-зависимое фосфорилирование усиливают перегрузку Ca²⁺, повышая возбудимость нейронов и способствуя реорганизации нейронных сетей; эндотелиальные клетки через Src-путь могут способствовать дальнейшему повреждению ГЭБ.

IL-1/TLR-зависимая активация NF-κB стимулирует экспрессию COX-2 и образование простагландинов (PGE₂), что поддерживает воспаление и эпилептогенез. Дисфункция ГЭБ, вызванная повреждением или воспалением (повышение активности IL-1/TLR и COX-2), обеспечивает проникновение компонентов крови в паренхиму и активацию TGF-β-сигналикации в астроцитах, что приводит к снижению экспрессии Kir4.1 и активности глутаматных транспортеров, усиливая возбудимость и реорганизацию нейронных сетей. В совокупности эти механизмы способствуют развитию эпилепсии [596]

Изменения синаптической пластичности

Синаптическая пластичность представляет собой фундаментальное свойство нервной системы позвоночных, обеспечивающее ее способность к адаптивным изменениям в ответ на воздействие внешних и внутренних факторов посредством структурной и функциональной реорганизации. Механизмы синаптической пластичности реализуются на нескольких уровнях организации: от модификации отдельных синаптических контактов между нейронами до перестройки активности нейронных ансамблей и функциональных взаимосвязей между различными системами ЦНС [135].

Обсуждая феномен синаптической пластичности, исследователи традиционно фокусируются на процессах обучения и памяти, между тем данное свойство играет ключевую роль в реализации множества других функций ЦНС. По критерию временной устойчивости изменений эффективности синаптической передачи выделяют кратковременную и долговременную ее формы.

Кратковременная синаптическая пластичность характеризуется изменениями продолжительностью от миллисекунд до секунд. Ее проявления регистрируются как модуляция амплитуды последующих постсинаптических токов, приводящая либо к синаптической депрессии (снижению амплитуды), либо к фасилитации (увеличению) эффективности передачи сигнала [135, 635]. Молекулярной основой кратковременной фасилитации служит механизм транзиторного накопления ионов Ca^{2+} в пресинаптической терминали, обеспечивающий усиленное высвобождение нейротрансмиттера при повторной стимуляции. Кратковременная депрессия, в свою очередь, может быть обусловлена инактивацией потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов либо истощением резервного пула синаптических везикул вследствие массивного экзоцитоза медиатора в ответ на первичный стимул [305].

Долговременные изменения синаптической пластичности также характеризуются снижением или повышением интенсивности постсинаптического ответа на вызванный стимул. Различают долговременную потенциацию (ДВП) и

долговременную депрессию. ДВП рассматривается как ключевой процесс, непосредственно отвечающий за формирование памяти и обучение [79, 527].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе ДВП, демонстрируют выраженную региональную специфичность. В различных структурах ЦНС идентифицированы множественные формы долговременной потенциации, реализующиеся через различные сигнальные каскады. В частности, индукция ДВП может осуществляться посредством активации ионотропных глутаматных рецепторов (NMDA- и AMPA-типа), метаботропных глутаматных рецепторов (mGluR1-3,5), а также каннабиноидных рецепторов, функционирующих через потенциал-зависимые кальциевые каналы [360, 361]. Применительно к гиппокампу – наиболее изученной в этом контексте структуре – классически различают NMDA-зависимую и NMDA-независимую формы ДВП [138].

NMDA-рецептор представляет собой ионотропный глутаматный рецептор, активируемый при одновременном связывании глутамата (агонист) и глицина (облигатный ко-агонист) с соответствующими участками рецепторного комплекса. В неактивном состоянии ионный канал рецептора блокируется ионом Mg^{2+} , расположенным в поре канала. Снижение внеклеточной концентрации магния значительно повышает возбудимость системы и вероятность индукции долговременной потенциации. При физиологических условиях деполяризация постсинаптической мембраны приводит к удалению Mg^{2+} из канала и последующей активации NMDA-рецептора. Открытие NMDA-рецептора обеспечивает входящий ток ионов Na^+ и Ca^{2+} , а также выходящий ток ионов K^+ [447]. Ионы кальция функционируют как вторичные посредники и играют ключевую роль в индукции синаптической потенциации [354].

Индукция долговременной синаптической пластичности в гиппокампе зависит от субъединичного состава NMDA-рецепторов. Экспериментальные данные, полученные на литий-пилокарпиновой модели ЭС с использованием ПЦР-анализа, свидетельствуют о том, что ЭС приводит к повышению соотношения GluN2B/GluN2A субъединиц за счет увеличения экспрессии GluN2B [465]. Фармакологическая блокада GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов в условиях

данной модели нормализовала амплитуду ДВП при стимуляции коллатералей Шаффера.

Полученные результаты указывают на то, что эпилептические приступы индуцируют перестройку субъединичного состава NMDA-рецепторов, что может представлять собой молекулярный механизм нарушения синаптической пластичности при эпилепсии.

Исследовано большое количество ферментов, которые, как считается, являются мишенью повышенной внутриклеточной концентрации кальция; активация этих ферментов является пусковым механизмом индукции долговременной потенциации. Один из таких ферментов – кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II (CaMKII), которая после активации может подвергаться автофосфорилированию и оставаться в активном состоянии [361]. CaMKII активирует AMPA-рецепторы двумя способами: во-первых, путем фосфорилирования AMPA-рецепторов, которые уже присутствуют на постсинаптической мембране, что повышает проницаемость мембраны для ионов натрия; во-вторых, путем встраивания дополнительных AMPA-рецепторов в мембрану, что повышает количество рецепторов, которые могут быть активированы.

Когнитивные нарушения и снижение способности к запоминанию, являющиеся частыми сопутствующими проявлениями височной эпилепсии, ассоциированы с патологическими изменениями гиппокампа [261]. Кроме того, электрофизиологические исследования демонстрируют существенные нарушения долговременной и кратковременной пластичности в коре головного мозга.

1.2 Гематоэнцефалический барьер и его роль в эпилепсии

Функционирование центральной нервной системы (ЦНС) существенно зависит от микроокружения нейронов и глиальных клеток, а барьер между кровью и этим микроокружением играет ключевую роль в поддержании гомеостаза нервной ткани [16]. Головной мозг имеет два основных барьера:

гематоэнцефалический барьер, образованный эндотелиальными клетками капилляров мозга, и гематоликворный барьер, образованный эпителиальными клетками сосудистых сплетений системы желудочков мозга. Эти барьеры регулируют состав и объем интерстициальной жидкости, окружающей нейроны, и спинномозговой жидкости (СМЖ), циркулирующей в желудочковой системе и периваскулярных пространствах [293, 617].

Интерстициальная жидкость мозга по составу существенно отличается от плазмы крови: в ней поддерживаются строго определенные концентрации ионов K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и H^+ , что критически необходимо для нормальной синаптической передачи. ГЭБ функционирует как точный регулятор ионного баланса посредством интегрированной активности специфических ионных каналов и транспортеров. Помимо этого, ГЭБ разделяет центральные и периферические пулы нейротрансмиттеров и макромолекул, защищает ЦНС от нейротоксических веществ крови, а также регулирует транспорт питательных веществ и метаболитов, необходимых для функционирования нервной ткани [16, 248].

1.2.1 Строение и функции гематоэнцефалического барьера

Гематоэнцефалический барьер представляет собой активный барьер между цереброваскулярной системой и тканями мозга, главным образом образованный эндотелиальными клетками, соединенными плотными контактами, функция которого также поддерживается периваскулярными астроцитами, перицитами, микроглией и нейронами. Вместе эти компоненты формируют нейроваскулярную единицу (НВЕ), регулиующую внеклеточную среду головного мозга [549, 570]. Гематоэнцефалический барьер поддерживает постоянство внутренней среды мозга, что критически важно для нормального функционирования нейронов. Он предотвращает резкие колебания концентраций ионов, аминокислот и гормонов в паренхиме мозга, которые могли бы привести к эксайтотоксичности и нарушению синаптической передачи [617].

Эндотелиальные клетки мозговых капилляров являются центральным структурным элементом ГЭБ и принципиально отличаются от эндотелия периферических сосудов по ряду ключевых характеристик [16, 152]. В отличие от эндотелия периферических капилляров, который, как правило, имеет более проницаемые межклеточные соединения, эндотелиальные клетки мозговых микрососудов соединены непрерывной сетью плотных контактов, формирующих высокоомный параклеточный барьер. Трансэндотелиальное электрическое сопротивление эндотелия церебральных капилляров *in vivo* достигает 1500-2000 Ом·см², что значительно превышает соответствующие значения для периферического эндотелия (3-33 Ом·см²) [104, 152].

Эндотелиальные клетки мозговых капилляров экспрессируют широкий спектр транспортеров, обеспечивающих селективный перенос нутриентов в мозг (например, GLUT1 для глюкозы, LAT1 для аминокислот) и удаление потенциально токсичных веществ из ЦНС (ABC-транспортеры, в том числе Р-гликопротеин) [451, 452]. Данные клетки содержат значительно больше митохондрий по сравнению с периферическим эндотелием (5-10 % объема цитоплазмы против 2-5 %), что обеспечивает энергозависимые активные транспортные процессы [152, 433].

Перициты – мезенхимальные клетки, расположенные в толще базальной мембраны церебральных капилляров и непосредственно контактирующие с абляминальной поверхностью эндотелиальных клеток. Соотношение перицитов к эндотелиальным клеткам в мозговых капиллярах составляет приблизительно 1:1-1:3, что значительно выше, чем в большинстве периферических сосудистых русел (1:10 - 1:100) [44, 616]. Роль перицитов в формировании и поддержании ГЭБ была убедительно продемонстрирована в серии работ начала 2010-х годов. Armulik и соавт. (2010) показали на мышинных моделях с генетически обусловленным дефицитом перицитов (Pdgbfret/ret), что снижение покрытия капилляров перицитами приводит к увеличению проницаемости ГЭБ, повышению уровня трансцитоза в эндотелиальных клетках и нарушению поляризации астроцитарных отростков [43]. Параллельно Daneman и соавт. (2010) подтвердили критическую роль сигнального пути PDGF-B/PDGFRβ в рекрутировании перицитов и

формировании барьерных свойств эндотелия в процессе эмбриогенеза [153]. Bell и соавт. (2010) продемонстрировали, что возрастная потеря перицитов у мышей линии *Pdgfrb*^{+/-} приводит к прогрессирующему нарушению целостности ГЭБ, накоплению нейротоксических плазменных белков в мозговой паренхиме и развитию нейродегенеративных изменений [65].

Астроциты являются одной из наиболее многочисленных популяций глиальных клеток в ЦНС и играют критическую роль в формировании и поддержании функций ГЭБ. Периваскулярные отростки (концевые ножки, *endfeet*) астроцитов покрывают более 99 % абляминальной поверхности церебральных капилляров, формируя так называемую *glia limitans perivascularis* [17, 371].

Abbott и соавт. (2006) в обзорной работе систематизировали данные о влиянии астроцитов на барьерные свойства церебрального эндотелия. Было показано, что астроциты секретируют ряд сигнальных молекул, способствующих формированию и поддержанию фенотипа ГЭБ в эндотелиальных клетках [17]: Sonic hedgehog (*Shh*) – морфоген, активирующий сигнальный путь Hedgehog в эндотелиальных клетках и стимулирующий экспрессию белков плотных контактов (клаудинов, окклюдина) [29]; ангиопоэтин-1 (*Ang-1*) – лиганд рецептора *Tie2*, стимулирующий образование плотных контактов; глиальный нейротрофический фактор (*GDNF*) – нейротрофический фактор, усиливающий барьерные свойства эндотелия; трансформирующий фактор роста β (*TGF- β*) – плеiotропный цитокин, участвующий в регуляции проницаемости ГЭБ.

Астроцитарные концевые ножки содержат высокую плотность водного канала аквапорин-4 (*AQP4*) и калиевого канала *Kir4.1*, что обеспечивает поддержание водно-ионного гомеостаза периваскулярного пространства [371, 412]. Нарушение поляризованного распределения *AQP4* ассоциировано с развитием отека мозга и рядом нейродегенеративных заболеваний [412].

Базальная мембрана (БМ) церебральных капилляров представляет собой специализированный компонент внеклеточного матрикса толщиной 20-100 нм, который окружает эндотелиальные клетки и перициты. Структурно выделяют две слившиеся базальные мембраны: эндотелиальную и паренхиматозную

(астроцитарную), между которыми в посткапиллярных венулах может формироваться периваскулярное пространство (пространство Вирхова-Робена) [152, 641]. Основными компонентами БМ являются: коллаген IV типа – формирует структурный каркас базальной мембраны; ламинины (ламинины-411, -511) – гликопротеины, выполняющие структурную и сигнальную функции; нидогены (энтактины) – связывающие белки; гепарансульфат-протеогликаны (перлекан, агрин) – обеспечивают взаимодействие с факторами роста и регуляцию сигнальных путей.

Базальная мембрана выполняет не только механическую опорную функцию, но и выступает в качестве дополнительного физического барьера, ограничивающего миграцию клеток и диффузию макромолекул. Кроме того, компоненты БМ участвуют в регуляции дифференцировки эндотелиальных клеток, перицитов и астроцитов через интегрин-опосредованную сигнализацию [259, 641].

Нейроны иннервируют мозговые микрососуды и выделяют нейромедиаторы и нейропептиды, регулирующие тонус сосудов и, опосредованно, барьерную функцию (норадреналин, серотонин, ацетилхолин, вазоактивный интестинальный пептид и др.) [647]. Механизм нейрососудистого сопряжения, обеспечивающий локальное увеличение кровотока в ответ на нейрональную активность, является фундаментальным свойством НВЕ [427].

Микроглия – резидентные иммунные клетки ЦНС – располагается в непосредственной близости от микрососудов и участвует в иммунном надзоре, фагоцитозе и регуляции нейровоспалительных процессов. При активации микроглия способна секретировать провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β , IL-6), матриксные металлопротеиназы (ММР-2, ММР-9) и активные формы кислорода, что может приводить к нарушению целостности ГЭБ [259, 647].

Плотные контакты (ПК) являются ключевым молекулярным компонентом, обеспечивающим параклеточную барьерную функцию ГЭБ. Они локализируются в апикальной части латеральных мембран эндотелиальных клеток и формируют непрерывный «пояс», запечатывающий межклеточное пространство [52, 152].

Молекулярный состав ПК включает трансмембранные и цитоплазматические белки.

Семейство клаудинов насчитывает около 24-27 членов у человека. В эндотелии мозговых микрососудов преобладающим является клаудин-5 (CLDN5), который считается наиболее важным для барьерной функции ГЭБ [52, 422]. Nitta и соавт. (2003) продемонстрировали, что мыши с нокаутом гена CLDN5 погибали в течение 10 часов после рождения и характеризовались размерно-селективным увеличением проницаемости ГЭБ для молекул массой менее 1 кДа, при сохранении непроницаемости для более крупных молекул [422]. Помимо клаудина-5, в эндотелии ГЭБ обнаружены клаудины -3 и -12, однако их вклад в барьерную функцию менее изучен [52].

Окклюдин (OCLN) – первый идентифицированный интегральный трансмембранный белок плотных контактов [197]. Окклюдин является интегральным мембранным белком с четырьмя трансмембранными доменами и двумя внеклеточными петлями. Несмотря на то, что нокаут гена окклюдина у мышей не приводил к значительному нарушению барьерной функции ГЭБ в базовых условиях, многочисленные исследования показали его роль в регуляции параклеточной проницаемости при стрессовых и патологических состояниях [52, 152].

Молекулы адгезии JAMs (Junctional Adhesion Molecules). JAM-A, JAM-B и JAM-C – трансмембранные белки суперсемейства иммуноглобулинов, участвующие в формировании плотных контактов и регуляции трансэндотелиальной миграции лейкоцитов [52, 370].

Белки семейства ZO (Zonula Occludens). ZO-1, ZO-2 и ZO-3 являются мультидоменными адапторными белками семейства MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase). Они связывают цитоплазматические домены трансмембранных белков ПК (клаудинов, окклюдина, JAM) с актиновым цитоскелетом, обеспечивая структурную стабильность и динамическую регуляцию плотных контактов [52, 152]. ZO-1, в частности, содержит PDZ-домены, SH3-домен

и домен гуанилаткиназы, посредством которых взаимодействует с многочисленными сигнальными и структурными белками.

Цингулин (cingulin) и белок 7Н6 – дополнительные адапторные белки, участвующие в связывании компонентов ПК с цитоскелетом и регуляции сигнальных каскадов [52].

Адгезивные контакты (АК) расположены базолатеральнее плотных контактов и обеспечивают механическое сцепление между эндотелиальными клетками, а также участвуют в регуляции формирования ПК. Основным трансмембранным белком АК в эндотелии является VE-кадгерин (vascular endothelial cadherin, кадгерин-5, CD144), опосредующий кальций-зависимую гомофильную межклеточную адгезию [152, 157].

Цитоплазматический домен VE-кадгерина связан с белками семейства катенинов (β -катенин, γ -катенин/плакоглобин, p120-катенин), которые, в свою очередь, взаимодействуют с α -катенином и актиновым цитоскелетом. Данный молекулярный комплекс не только обеспечивает механическую связь между клетками, но и передает сигналы, регулирующие клеточную пролиферацию, выживание и дифференцировку [157].

Стоит отметить, что PECAM-1 (CD31, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) – еще один молекулярный компонент межклеточных контактов эндотелия – участвует в адгезии и трансмиграции лейкоцитов, а также в механотрансдукции [16].

Несмотря на высокую степень «запечатанности» межклеточных пространств, ГЭБ не является абсолютно непроницаемой структурой. Мозг – метаболически чрезвычайно активный орган, потребляющий около 20 % от общего потребления кислорода и глюкозы организма при массе, составляющей лишь 2 % массы тела [450]. Следовательно, ГЭБ должен обеспечивать эффективный транспорт нутриентов в мозг и удаление метаболических отходов, одновременно ограничивая проникновение потенциально нейротоксических веществ. Это достигается благодаря сложной системе специализированных транспортных механизмов [16, 450, 452].

Пассивная диффузия через ГЭБ возможна для малых липофильных молекул (молекулярная масса < 400-500 Да) с благоприятным коэффициентом распределения октанол/вода. Согласно классическим представлениям, сформулированным Pardridge (2005, 2012), более 98 % низкомолекулярных препаратов и практически 100 % биопрепаратов не способны проникать через ГЭБ путем пассивной диффузии вследствие избыточной гидрофильности, высокой молекулярной массы или активного выведения эффлюксными транспортерами [450, 452]. Газы (O_2 , CO_2), а также небольшие липофильные молекулы (этанол, никотин, бензодиазепины) свободно диффундируют через липидный бислой эндотелиальных мембран.

Параклеточная диффузия ионов и гидрофильных молекул через ГЭБ практически полностью блокирована плотными контактами. Ионный состав интерстициальной жидкости мозга поддерживается в узких пределах и существенно отличается от плазмы крови (например, концентрация K^+ в интерстиции составляет ~2,5 мМ по сравнению с ~4,5 мМ в плазме), что критически важно для нормальной синаптической передачи [16].

Семейство Solute Carrier (SLC) – крупнейшее семейство мембранных транспортных белков, включающее более 400 членов, организованных в 65 подсемейств. В эндотелии ГЭБ идентифицирован ряд SLC-транспортеров, обеспечивающих селективный приток нутриентов в мозг [16, 450]:

- GLUT1 (SLC2A1) – глюкозный транспортер 1 типа, обеспечивающий облегченную диффузию D-глюкозы через ГЭБ. GLUT1 экспрессируется как на люминальной, так и на абляминальной мембранах эндотелия и является основным механизмом снабжения мозга глюкозой – первичным энергетическим субстратом ЦНС [450, 452]. Дефицит GLUT1 (синдром дефицита GLUT1, синдром Де Виво) приводит к тяжелой эпилептической энцефалопатии [161].

- LAT1 (SLC7A5), в гетеродимере с 4F2hc (SLC3A2) – транспортер крупных нейтральных аминокислот (лейцин, фенилаланин, тирозин, триптофан, валин), функционирующий как антипортер. LAT1 обеспечивает доставку в мозг незаменимых аминокислот – предшественников нейромедиаторов (например,

триптофана для синтеза серотонина, тирозина для синтеза дофамина и норадреналина). Данный транспортер также используется для доставки лекарственных средств (L-DOPA, мелфалан, габапентин) [450, 452].

- MCT1 (SLC16A1) – монокарбоксилатный транспортер 1, обеспечивающий перенос лактата, пирувата и кетоновых тел [16].

- CNT2 (SLC28A2) и ENT1/ENT2 (SLC29A1/SLC29A2) – нуклеозидные транспортеры, обеспечивающие доставку аденозина и других нуклеозидов [16].

- OATP1A2 (SLCO1A2), OATP2B1 (SLCO2B1) – транспортеры органических анионов, участвующие в транспорте ряда эндогенных субстратов и ксенобиотиков [304].

ABC-транспортеры (ATP-binding cassette) – семейство АТФ-зависимых эффлюксных помп, экспрессируемых преимущественно на люминальной мембране эндотелиальных клеток ГЭБ и обеспечивающих активное выведение ксенобиотиков и потенциально токсичных субстратов из мозга обратно в кровоток [294, 347, 505]. Именно ABC-транспортеры являются одной из главных причин фармакорезистентности при лечении заболеваний ЦНС.

Ключевые ABC-транспортеры ГЭБ:

- Р-гликопротеин (Р-gr, ABCB1) – наиболее изученный и функционально значимый эффлюксный транспортер ГЭБ. Р-gr экспрессируется на люминальной мембране эндотелия и активно выкачивает широкий спектр липофильных субстратов обратно в кровь, включая многочисленные лекарственные препараты (противоопухолевые агенты, ингибиторы протеаз ВИЧ, иммунодепрессанты, антибиотики, опиоиды и др.) [294, 505]. Исследования на мышинных моделях с нокаутом гена *Mdr1a* показали, что отсутствие Р-gr приводит к многократному увеличению концентрации его субстратов в мозге, что доказывает критическую роль данного транспортера в ограничении проникновения ксенобиотиков в ЦНС [294];

- BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2) – второй по значимости эффлюксный транспортер ГЭБ, субстратный спектр которого частично

пересекается с Р-гр. BCRP и Р-гр часто функционируют синергически, обеспечивая комплементарную защиту мозга от ксенобиотиков [22].

- MRP (Multidrug Resistance-associated Proteins) – семейство транспортеров ABCC, из которых MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), MRP4 (ABCC4) и MRP5 (ABCC5) экспрессируются в эндотелии ГЭБ и участвуют в эффлюксе глутатионовых и глюкуронидных конъюгатов, нуклеотидных аналогов и других субстратов [22, 294].

Для доставки крупных белковых молекул, неспособных к диффузии через клеточные мембраны, в эндотелии ГЭБ функционирует механизм рецептор-опосредованного транцитоза, когда макромолекула связывается со специфическим рецептором на люминальной поверхности эндотелия, что запускает эндоцитоз комплекса лиганд-рецептор с последующим везикулярным транспортом через клетку и экзоцитозом на аблюминальной стороне [156, 450, 452]. К основным системам рецептор-опосредованного транцитоза в эндотелии ГЭБ относят: рецептор трансферрина (TfR1) – обеспечивает транспорт железа, связанного с трансферрином, используется в фармакологии как мишень для доставки лекарственных средств в мозг с помощью би-специфических антител [450]; рецептор инсулина – опосредует транцитоз инсулина через ГЭБ; LRP1 (Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1) – мультифункциональный рецептор, участвующий в транцитозе аполипопротеина Е, α 2-макроглобулина, а также в клиренсе β -амилоида из мозга, что имеет критическое значение в патогенезе болезни Альцгеймера [Sweeney 2018]; RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products) – рецептор конечных продуктов гликирования, опосредующий транспорт β -амилоида из крови в мозг. Баланс между LRP1-опосредованным клиренсом и RAGE-опосредованным притоком А β рассматривается как один из ключевых факторов в патогенезе болезни Альцгеймера [545].

Адсорбционный транцитоз – неспецифический механизм трансклеточного транспорта, инициируемый электростатическим взаимодействием катионных молекул с отрицательно заряженной поверхностью эндотелиальных клеток (вследствие присутствия гликокаликса, богатого отрицательно заряженными

гепарансульфат-протеогликанами и сиаловыми кислотами) [450]. Адсорбционный транцитоз менее специфичен и менее насыщен по сравнению с рецептор-опосредованным транцитозом, что делает его перспективным для доставки катионизированных белков и клеточно-проникающих пептидов.

Помимо физического и транспортного компонентов, ГЭБ обладает выраженной метаболической активностью, обеспечивающей ферментативную инактивацию ряда нейроактивных и потенциально токсичных субстанций. Эндотелиальные клетки мозговых капилляров экспрессируют ряд метаболизирующих ферментов [16, 152]:

- Моноаминоксидазы – катализируют окислительное дезаминирование моноаминов (серотонина, дофамина, норадреналина), предотвращая их несанкционированное проникновение из системного кровотока в мозг;
- Катехол-О-метилтрансфераза – инактивирует катехоламины;
- Цитохромы P450 – участвуют в метаболизме ксенобиотиков;
- γ -Глутамилтранспептидаза – участвует в метаболизме глутатиона и транспорте аминокислот;
- Щелочная фосфатаза – дефосфорилирует различные субстраты;
- Пептидазы и протеазы – инактивируют нейропептиды и другие пептидные молекулы.

Таким образом, ферментативная активность эндотелия ГЭБ формирует «метаболический барьер», который дополняет физический и транспортный компоненты, создавая многоуровневую систему защиты ЦНС [16].

Обобщая изложенные структурные данные, можно выделить следующие основные функции ГЭБ:

1. Поддержание ионного гомеостаза. ГЭБ обеспечивает стабильность ионного состава интерстициальной жидкости мозга, что критически важно для нормальной нейрональной возбудимости и синаптической передачи. Концентрации K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и H^+ в интерстициальной жидкости поддерживаются в значительно более узких пределах, чем в плазме крови [16].

2. Защита от нейротоксических веществ. ГЭБ предотвращает проникновение в мозг потенциально нейротоксических эндогенных (билирубин, желчные кислоты) и экзогенных (ксенобиотики, токсины) веществ посредством комбинации плотных контактов и эффлюксных транспортеров [156, 294].
3. Обеспечение избирательного транспорта нутриентов. Посредством специфических транспортных систем ГЭБ обеспечивает доставку в мозг глюкозы, аминокислот, нуклеозидов, витаминов и других необходимых субстратов [450, 452].
4. Регуляция нейрогуморальной коммуникации. ГЭБ предотвращает несанкционированное проникновение периферических нейромедиаторов и гормонов в ЦНС, обеспечивая автономность центральной и периферической нейромедиаторных систем. Например, плазменный дофамин и норадреналин, секретируемые мозговым веществом надпочечников, не проникают через ГЭБ, что позволяет независимо регулировать периферические и центральные катехоламинергические процессы [16].
5. Иммунологическая функция. ГЭБ ограничивает миграцию иммунных клеток из системного кровотока в паренхиму мозга, обеспечивая относительную «иммунную привилегированность» ЦНС. В физиологических условиях в мозг проникает лишь незначительное количество Т-лимфоцитов, осуществляющих иммунный надзор. Эндотелий ГЭБ характеризуется низким уровнем экспрессии молекул адгезии лейкоцитов (ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин) по сравнению с периферическим эндотелием [259, 647].
6. Клиренс метаболитов. ГЭБ участвует в удалении из мозга продуктов метаболизма, в том числе β -амилоида (через LRP1-опосредованный трансцитоз и ABC-транспортеры), глутамата (через экситоаминотранспортеры EAAT1/EAAT2 астроцитов) и других потенциально токсичных метаболитов [545].

Следует отметить, что ГЭБ не является непрерывным на всем протяжении ЦНС. Существуют анатомически ограниченные области, так называемые циркумвентрикулярные органы (ЦВО), в которых капилляры имеют фенестрированный эндотелий и лишены типичных барьерных свойств [152, 174]. По функциональному принципу ЦВО разделяют на две группы:

Сенсорные ЦВО (мониторинг состава крови):

- *Area postrema* – хеморецепторная триггерная зона рвотного рефлекса;
- Субфornикальный орган – регуляция водно-солевого гомеостаза и давления (ангиотензин II, AVP);
- Сосудистый орган конечной пластинки – терморегуляция, осмосенсорика;
- Срединное возвышение (*eminencia mediana*) – нейрогуморальная интеграция гипоталамо-гипофизарной системы;

Секреторные ЦВО (выделение гормонов и белков в кровь или СМЖ):

- Нейрогипофиз (задняя доля гипофиза) – секреция вазопрессина и окситоцина;
- Эпифиз – секреция мелатонина;

Особый случай:

- Субкомиссуральный орган – формально относится к ЦВО по критерию эпендимальной специализации, однако, в отличие от других ЦВО, сохраняет нефенестрированный эндотелий и интактные барьерные свойства; секретирует гликопротеин SCO-спондин в СМЖ [174].

Функциональное значение отсутствия ГЭБ в ЦВО заключается в необходимости прямого нейрогуморального взаимодействия между гормонами крови и нейронами данных областей (например, для хеморецепции в *area postrema* или нейроэндокринной секреции в нейрогипофизе). При этом нейрональные субстанции ЦВО не поступают бесконтрольно в прилежащую мозговую паренхиму благодаря наличию «таницитарного барьера» – плотных контактов между таницитами, выстилающими желудочковую поверхность этих областей [174].

1.2.2 Дисфункция ГЭБ при эпилепсии

При физиологических условиях ГЭБ строго контролирует транспорт макромолекул и предотвращает проникновение периферических иммунных клеток в паренхиму мозга. Однако при повреждении свойства барьера и его селективная проницаемость к различным веществам существенно изменяются [344].

В частности, происходит экстравазация в паренхиму мозга сывороточных белков (альбумина), коагуляционных факторов (тромбина) и нейротрансмиттеров (глутамата) [367]. Одновременно повышается проницаемость ГЭБ к неорганическим ионам, включая K^+ , что обусловлено изменением экспрессии и функции ионных каналов и транспортеров. Это нарушение ионного гомеостаза способствует повышенной возбудимости нейронов и может приводить к эпилептогенезу [538].

Важно отметить, что даже при компрометации целостности барьера ГЭБ продолжает выполнять свою ограничительную функцию и не становится полностью проницаемым для малых ионов и других молекул [344].

Нарушение барьерной и транспортной функции ГЭБ связано со многими заболеваниями ЦНС, включая нейродегенеративные расстройства, цереброваскулярные патологии (инсульт), эпилепсию и судорожные синдромы, инфекции (энцефалит, менингит), воспалительные заболевания, опухоли, а также ЧМТ и нейротравмы [455]

Повышение проницаемости ГЭБ к различным веществам может выступать как причиной, так и следствием эпилептических приступов [188]. Увеличение проницаемости барьера влечет за собой изменения концентрации ионов, аминокислот и метаболитов в паренхиме мозга, что приводит к аномальной нейрональной активности [344].

Однако нарушение ГЭБ не всегда приводит к развитию эпилепсии, поскольку само заболевание имеет мультифакторную природу и возникает вследствие комплексных изменений в нейронных сетях. Вероятность возникновения судорог определяется степенью повреждения ГЭБ, буферной емкостью глии для K^+ и концентрацией белков крови, попавших в паренхиму мозга [538, 585].

Нарушение целостности ГЭБ может также возникать вследствие длительной судорожной активности и артериальной гипертензии [585]. Например, у крыс в течение 5-30 мин после острых судорог происходит увеличение проницаемости для ионов в лимбических структурах мозга [344].

Следовательно, судороги, возникшие вследствие дисфункции ГЭБ, дополнительно способствуют увеличению проницаемости барьера. Это приводит к структурной и функциональной перестройке нейронных связей, изменению экспрессии транспортеров и ангиогенезу, в результате чего формируется устойчивая гипervозбудимая нейронная сеть и развивается хроническая эпилепсия [585]. При хронической эпилепсии частота возникновения спонтанных судорог коррелирует со степенью нарушения целостности ГЭБ [366].

Эпилептическая активность существенно нарушает молекулярную целостность ГЭБ, что проявляется снижением экспрессии белков плотных контактов – окклюдина, ZO-1, клаудина-5 и клаудина-8, и повышением парацеллюлярной проницаемости.

В целом изменения свойств ГЭБ делят на функциональные и структурные (деструктивные).

Обычно первыми возникают функциональные изменения, происходящие на молекулярном уровне и включающие в себя высвобождение провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α) периваскулярными ножками астроцитов, эндотелиальными клетками и перицитами, а также изменение экспрессии транспортеров и молекул клеточной адгезии барьера. Впоследствии такие изменения приводят к инфильтрации лейкоцитов в мозг и могут способствовать возникновению структурных нарушений.

Структурные изменения связаны с физическим повреждением барьера и увеличением его проницаемости к различным веществам («утечка ГЭБ»). В частности, к ним относятся разрушение плотных контактов между клетками эндотелия, повреждение внеклеточного матрикса, перицитов и астроцитов, усиление трансцитоза через эндотелиоциты, а также проникновение белков плазмы крови в паренхиму мозга [217, 629].

В большинстве случаев увеличение проницаемости ГЭБ обусловлено усилением микропиноцитоза, в то время как плотные соединения между эндотелиоцитами капилляров повреждаются только при существенных травмах мозга [344].

Кратковременное и долговременное увеличение проницаемости ГЭБ во время и после эпилептических приступов выявлено как на экспериментальных моделях приобретенной эпилепсии [194], так и у пациентов с эпилепсией [386, 428].

Кроме того, повреждения ГЭБ или внутримозговые инъекции компонентов крови могут напрямую вызывать судорожные приступы и эпилептиформную активность [323]. Эти данные способствовали формированию гипотезы о прямой роли дисфункции ГЭБ в эпилептогенезе.

Данная гипотеза подтверждается недавними наблюдениями на экспериментальных моделях приобретенной эпилепсии. Так, была продемонстрирована значительная положительная корреляция между степенью нарушения целостности ГЭБ, концентрацией альбумина сыворотки крови в паренхиме мозга у крыс после эпилептического статуса и формированием эпилептического очага [583]. Также было показано, что хроническое нарушение ГЭБ в неокортексе крыс может приводить к развитию спонтанной ЭФА [279, 560].

Нарушение целостности ГЭБ приводит к попаданию компонентов крови в ткань мозга, что может вызвать деструктивные изменения, такие как астроглиоз и активация микроглии, а также эпилептические приступы (рисунок 1.8) [314, 428, 621].

Однако, несмотря на интенсивные исследования фундаментальной науки специфических механизмов эпилептогенеза, индуцируемых дисфункцией ГЭБ, связь между нарушением ГЭБ и развитием эпилепсии остается на сегодняшний день в значительной степени неизученной.

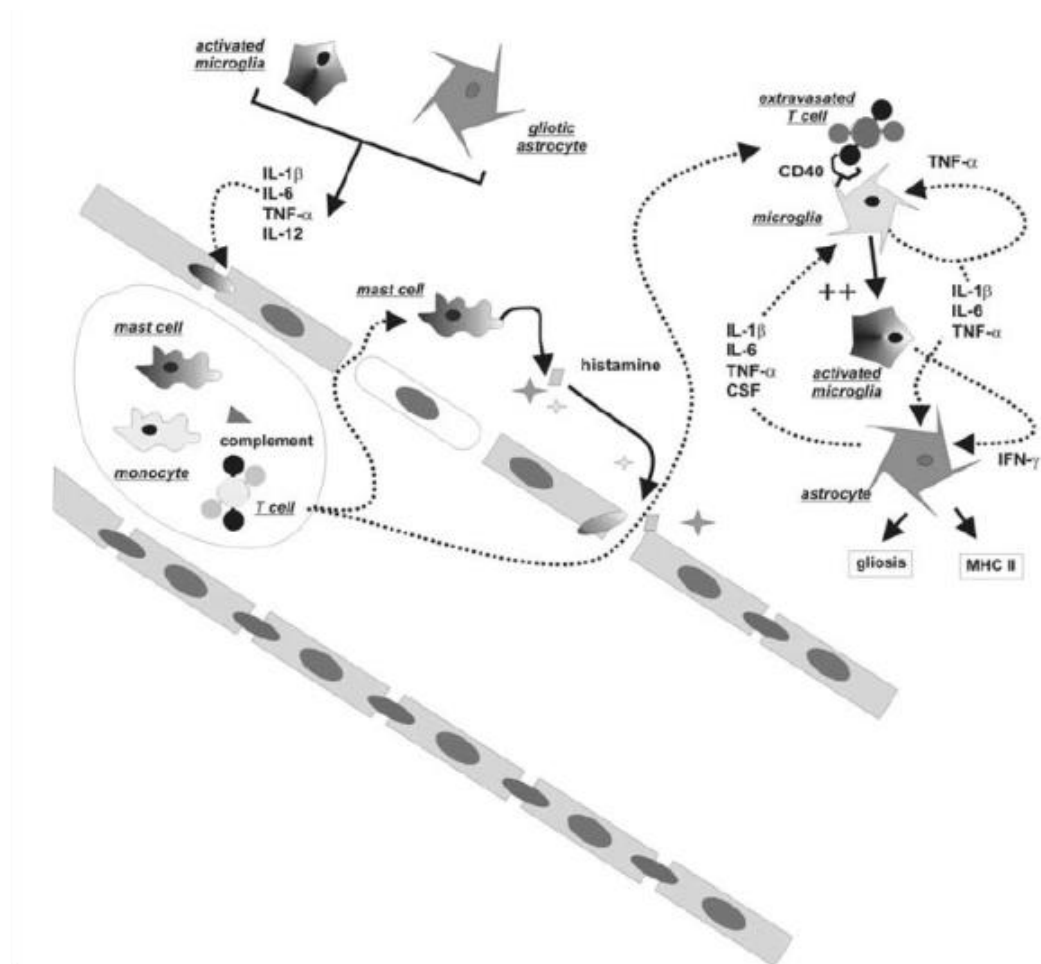


Рисунок 1.8 – Схематическое изображение патологических процессов, которые активируются вследствие дисфункции ГЭБ и могут быть вовлечены в эпилептогенез. В нормальных условиях ГЭБ отделяет иммунную систему от паренхимы ЦНС. При нарушении целостности ГЭБ компоненты крови попадают во внутрицеребральную среду. Активированные клетки крови выделяют металлопротеиназы и другие молекулы, что может способствовать дальнейшему повреждению ГЭБ. Также повышению проницаемости ГЭБ могут способствовать медиаторы воспаления, выделяемые клетками крови и активированной микроглией. Интерлейкины (IL, interleukin); фактор некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor); интерферон (IFN, interferon); колониестимулирующий фактор (CSF, colony-stimulating factor); главный комплекс гистосовместимости (MHC, major histocompatibility complex) [428]

1.3 Роль тромбина и протеаза-активируемых рецепторов в функционировании ЦНС в норме и при патологических состояниях

Сериновые протеазы, ингибиторы сериновых протеаз и протеаза-активируемые рецепторы (PAR) широко известны благодаря их роли в регуляции коагуляции, гемостаза и воспалительных процессов. Последние исследования демонстрируют, что эти белки эндогенно экспрессируются в центральной нервной системе и участвуют как в нормальной физиологии ее тканей, так и в патологических процессах, ассоциированных с различными заболеваниями ЦНС. Показано, что сериновые протеазы, их предшественники, эндогенные ингибиторы и рецепторы влияют на синаптические функции и формирование поведенческих реакций. Была продемонстрирована вовлеченность PAR в процессы формирования эмоциональной памяти и в реализацию тревожного поведения. Кроме того, нарушение активности этих молекул играет существенную роль в патогенезе многих неврологических заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, инсульт, ЧМТ и др.

1.3.1 Тромбин и его рецептор PAR1

Коагуляция – фундаментальный биологический процесс, при котором клеточные и плазменные белковые компоненты крови образуют сгусток для остановки кровотечения из поврежденных сосудов [12]. Она реализуется через каскад молекулярных событий, приводящих к активации тромбина и превращению фибриногена в фибрин, который формирует основу фибринового сгустка [520]. Тромбин – сериновая протеаза, образующаяся в результате протеолитического расщепления протромбина протромбиназным комплексом FXa-FVa на поверхности фосфолипидов в присутствии Ca^{2+} . Активность FXa существенно возрастает при образовании протромбиназного комплекса с FVa, что обеспечивает эффективную активацию протромбина и последующее формирование сгустка [630].

Человеческий протромбин (фактор II) состоит из 622 аминокислот, имеет молекулярную массу около 72 кДа и включает четыре домена: N-концевой γ -карбоксиглутаматный (Gla) домен, два kringle-домена и C-концевой серинопотеазный домен. После активации протромбина образуется тромбин, который состоит из двух полипептидных цепей – А (примерно 36 аминокислот) и В (примерно 259 аминокислот), соединенных дисульфидной связью, образуя активный серинопотеазный домен (рисунок 1.9).

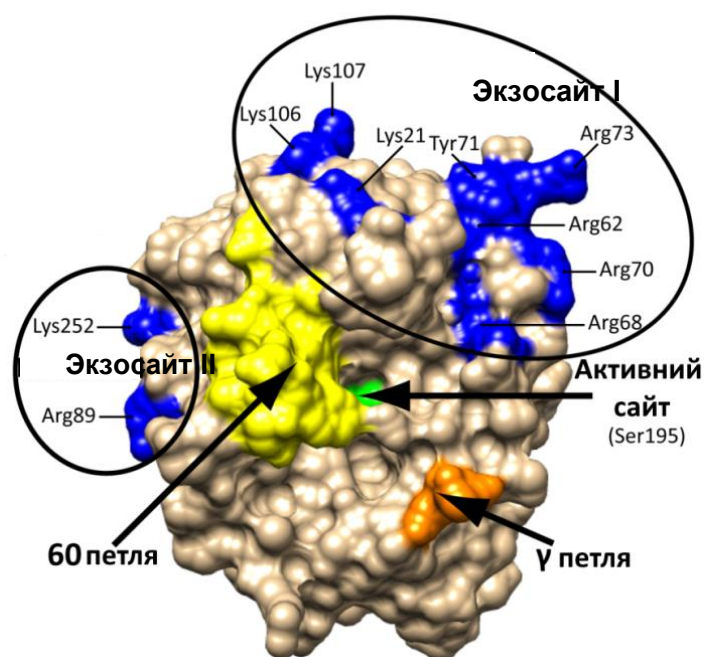


Рисунок 1.9 – Схематическая 3D модель тромбина [119]

Активный сайт тромбина ограничен двумя петлями – 60-петлей и γ -петлей. Помимо активного сайта тромбин имеет два анион-связывающих экзосайта I и II, названных так за их высокую аффинность к отрицательно заряженным лигандам [119, 567]. Протромбин производится в печени и посттрансляционно модифицируется в витамин-К-зависимой реакции, превращающей 10 глутаминовых остатков протромбина в γ -карбоксиглутаминовую кислоту (Gla). В присутствии Ca^{2+} остатки Gla способствуют связыванию протромбина и других факторов свертывания с фосфолипидными мембранами, что обеспечивает Ca^{2+} -зависимую локализацию и регуляцию процесса свертывания. Дефицит витамина К

или прием антикоагулянта варфарина ингибирует образование остатков Gla и нарушает активацию системы свертывания [151]. Помимо участия в каскаде свертывания, тромбин также способствует активации и агрегации тромбоцитов [481].

И наоборот, тромбин инициирует механизм обратной связи, что приводит к его собственному торможению. После связывания с тромбомодулином, интегральным мембранным белком, экспрессируемым эндотелиальными клетками, комплекс тромбин-тромбомодулин приобретает повышенное сродство к протеину С и активирует его.

Активированный протеин С (aPC) в свою очередь инактивирует компоненты протромбиназного комплекса (FVa и FXa) на участках с интактным эндотелием [567]. Кроме того, свободно циркулирующий тромбин ингибируется антитромбином-III, ингибитором сериновых протеаз, активность которого усиливается антикоагулянтом гепарином [567]. В совокупности активность тромбина в крови жестко регулируется набором положительных и отрицательных обратных связей, которые способствуют свертыванию в местах повреждения и предотвращают его в неповрежденных областях.

Помимо своей роли в динамическом процессе образования тромбов, тромбин оказывает выраженное провоспалительное действие [183]. Действуя через специфические протеаза-активируемые рецепторы (PAR), которые широко экспрессируются в стенках артериальных сосудов, тромбин может опосредовать проатерогенные эффекты, такие как стимуляция миграции лейкоцитов, пролиферация клеток, регуляция тонуса сосудов, активация эндотелия и тромбоцитов [528].

В 1991 году исследователями из двух независимых лабораторий, занимавшихся изучением рецепторов, сопряженных с G-белками и задействованных в тромбин-опосредованном каскаде, был открыт PAR1 [603]. В ооциты ксенопуса вводили РНК этого рецептора, в результате чего синтезировался PAR1 (рисунок 1.10).

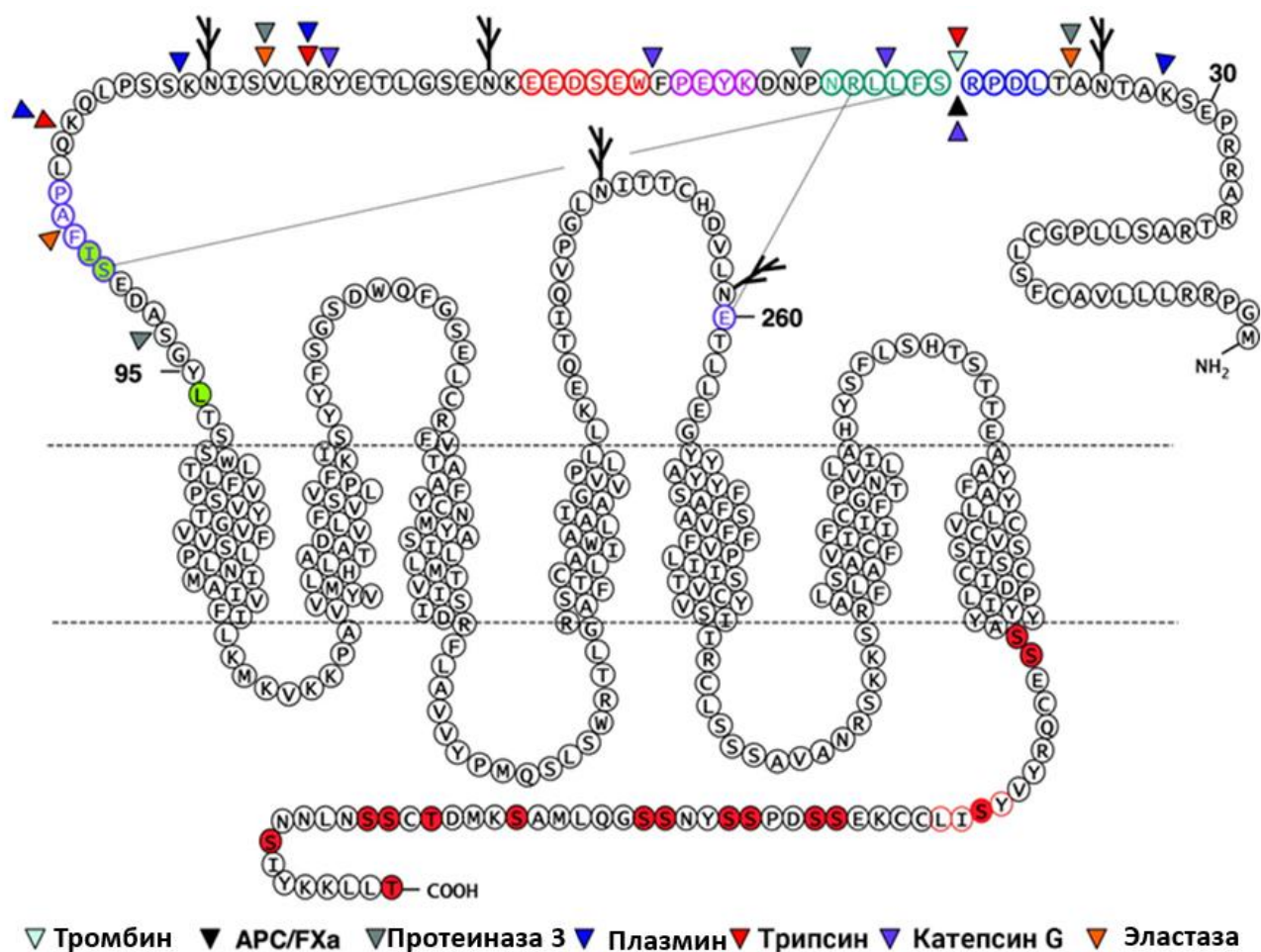


Рисунок 1.10 – Схематическое изображение структуры PAR1 и локализации сайтов протеолиза в полипептидной цепи рецептора [533]

PAR относятся к уникальному семейству рецепторов, сопряженных с G-белками [351]. PAR состоят из 7 трансмембранных α -спиралей, цитоплазматического домена, связанного с G-белком, и внеклеточного N-конца. Их активация инициируется необратимым, сайтоспецифическим протеолитическим расщеплением в N-концевой внеклеточной области, высвобождающей скрытую лигандную последовательность, активирующую протеины $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha i/o}$ или $G_{\alpha 12/13}$ [565].

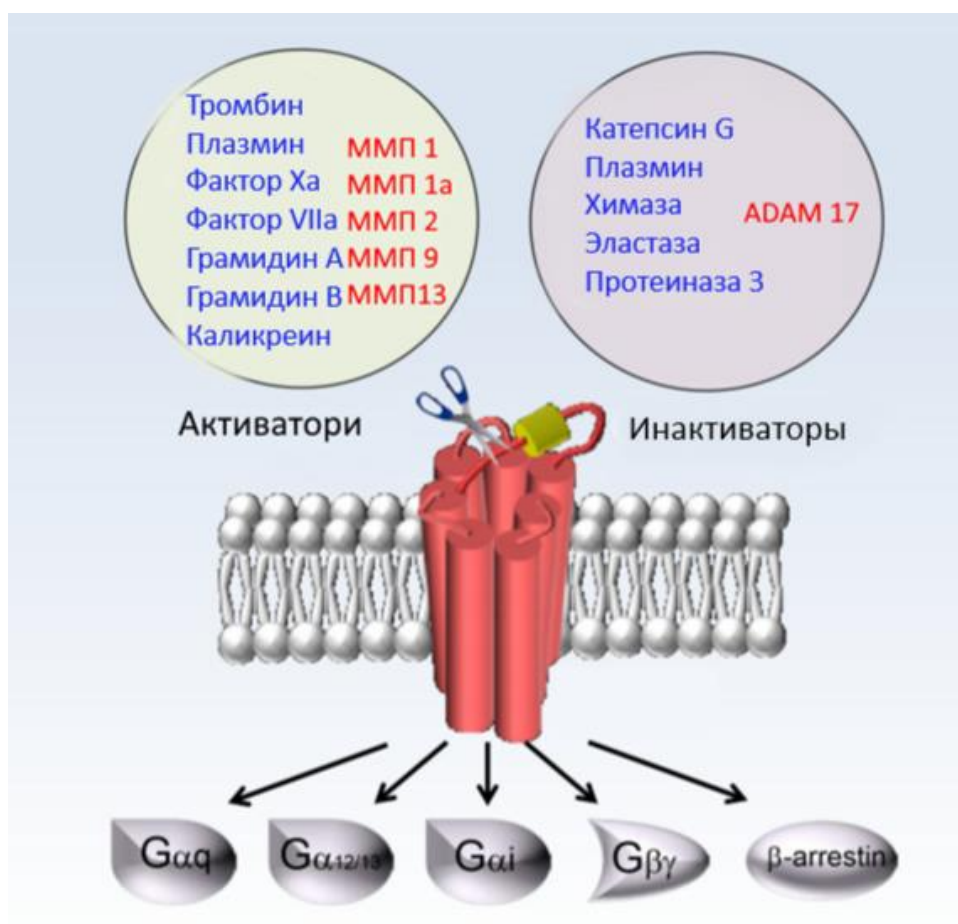


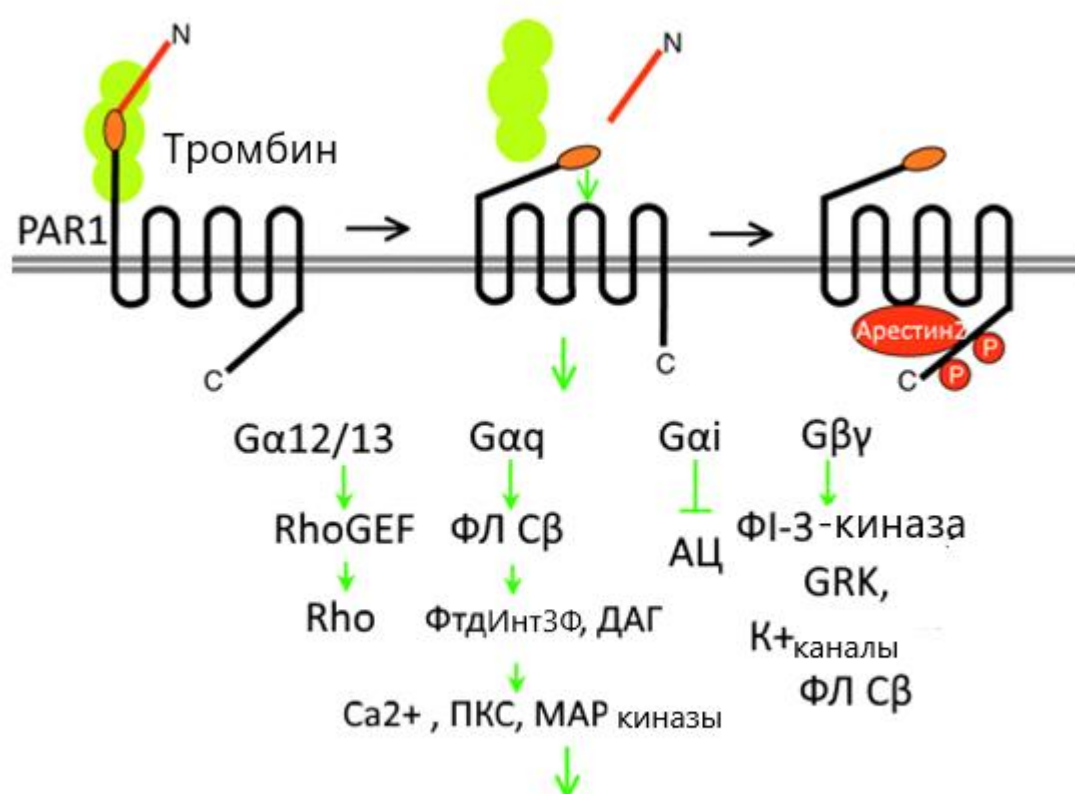
Рисунок 1.11 – Схематическое изображение рецептора PAR1, его активаторов и инактиваторов, действие которых реализуется за счет протеолиза: синим обозначены сериновые протеазы, красным – матричные металлопротеазы [191]

Механизм активации PAR более всего изучен для PAR1 [144]. Активатор PAR1, тромбин, связывается с N-концом (последовательность LDPR41-S42) и разрывает пептидную связь между аргинином и серином (R41-S42). Таким образом, эта новая последовательность выступает в качестве лиганда, который связывается с консервативной областью второй внеклеточной петли и вызывает сигнальный каскад в клетке. Известно, что PAR1 связан с Gαq-, Gαi-, Gα12/13- и Gβγ-субъединицами, а также опосредует β-аррестинный путь [567, 603].

Активация PAR может запускать несколько внутриклеточных сигнальных путей в зависимости от типа активирующего лиганда и определенной Gα-

субъединицы [291]. Это многообразие сигнальных путей и зависимость от типа активирующего лиганда являются причиной функционального разнообразия PAR (рис. 1.11) [88, 291].

Гетеротример, состоящий из PAR1 и $G\alpha_q$, ведет к активации фосфолипазы $C\beta$, запускающей процесс гидролиза фосфоинозиотида, что в свою очередь индуцирует синтез инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола, мобилизацию Ca^{2+} и активацию протеинкиназы C (рисунок 1.12).



Повышение клеточной адгезии, секреции, быстрого роста

Рисунок 1.12 – Сигнальные клеточные каскады, опосредованные активацией PAR1: ФИ-3-киназа – фосфоинозитид-3-киназа, ФЛ $C\beta$ - фосфолипаза $C\beta$, АЦ – аденилатциклаза, ФтдИнз3Ф - фосфатидилинозитол-3-фосфат, ДАГ – диацилглицерол, ПКС – протеинкиназа C [533]

Комплекс PAR1 с $G\alpha_{12/13}$ активирует малые G-белки, Rho и Rac. Комплекс PAR1 с $G\alpha_i$ ведет к ингибированию аденилатциклазы. $G\beta\gamma$ активирует

фосфоинозитид-3-киназу, киназы рецепторов, связанных с G-белками (G-protein-coupled receptor kinases, GRKs), K^+ -каналы и фосфолипазу C β . За счет фосфорилирования и связывания с аррестином PAR1 отсоединяется от G-белков. Все эти каскады ведут к повышению пролиферации клеток, улучшению адгезии и секреции воспалительных интерлейкинов [144, 567].

Рецепторы, активируемые протеазами, представлены в клетках кровеносной системы: гладкомышечных клетках сосудов, эндотелиальных клетках, тромбоцитах, макрофагах, лейкоцитах (кроме эритроцитов), а также в фибробластах [48]. Кроме того, эти рецепторы экспрессируются в эпителии, нейронах и астроцитах [567].

1.3.2 Тромбин и PAR1 в ЦНС

PAR1 является наиболее распространенным тромбиновым рецептором в ЦНС. Иммуногистохимический анализ показал высокий уровень PAR1 в гиппокампе (пирамидном слое) по сравнению с умеренной экспрессией в коре головного мозга, таламусе, гипоталамусе, стриатуме и миндалине [539]. мРНК и белок PAR1 были обнаружены в эмбриональном и зрелом мозге [438, 638].

Белок PAR3 был обнаружен в гиппокампе, коре, миндалине, таламусе, гипоталамусе и стриатуме [539]. Белок PAR4 содержится в аксонах, соме и дендритах нейронов гиппокампа, всех слоях коры, таламусе, гипоталамусе и миндалине [539]. Кроме того, функциональная экспрессия PAR1-PAR4 была обнаружена в глиальных клетках [634].

В зависимости от концентрации роль тромбина в ЦНС может быть защитной или повреждающей (рисунок 1.13). В низких концентрациях тромбин оказывает нейропротекторное действие и способствует снижению гибели нейронов и астроцитов после повреждений мозга различного генеза [289].

Установлено, что тромбин играет значительную роль в процессах пролиферации, роста и морфологических изменений нервных клеток [308].

Напротив, нарушение целостности ГЭБ при патологических состояниях приводит к резкому повышению уровня тромбина в ЦНС.

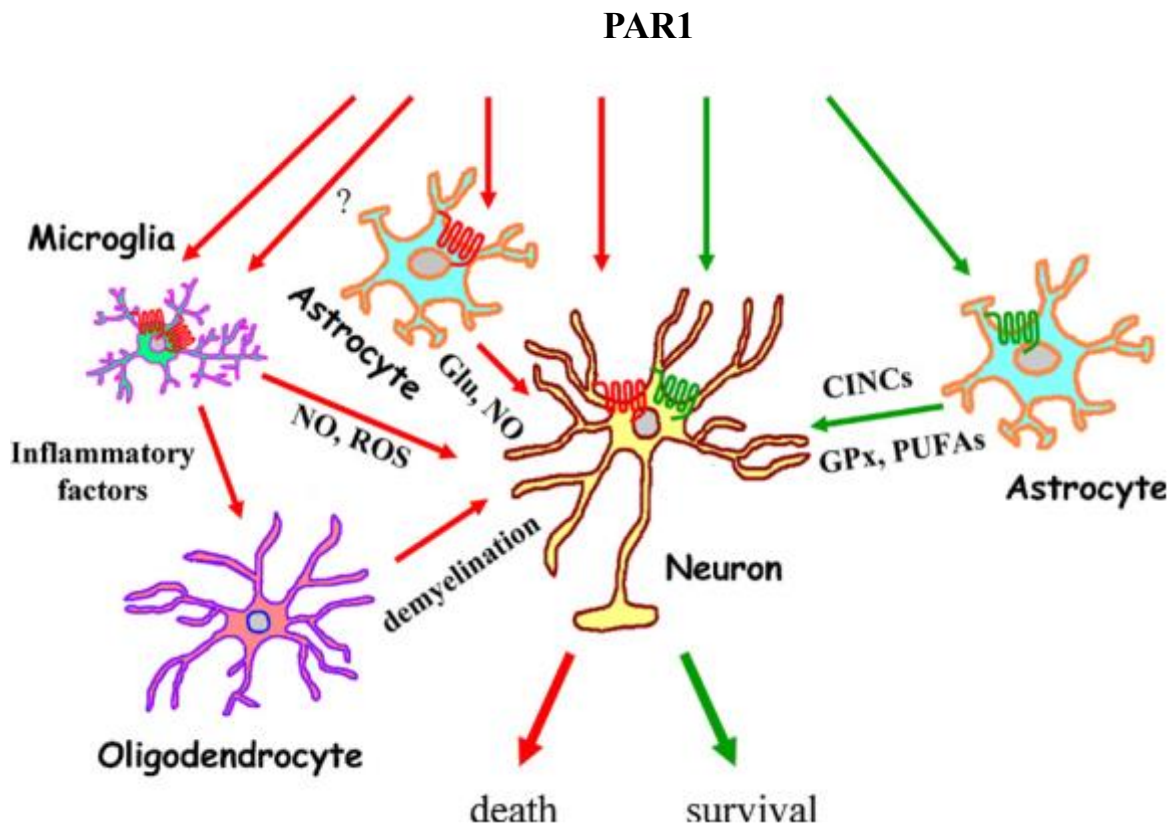


Рисунок 1.13 – Схематическое изображение различных функций рецептора PAR1 в головном мозге. В зависимости от концентрации и продолжительности действия тромбина активация PAR1 может приводить к гибели клеток или, напротив, к повышению выживаемости нейронов. Активация PAR1 индуцирует провоспалительные факторы и токсические процессы в глиальных клетках, включая астроциты и микроглию, что способствует нейродегенерации.

Спорным остается вопрос, участвуют ли PAR1 в гибели нейронов, спровоцированной активированной тромбином микроглией (обозначено знаком "?"). Высвобождение хемокинов (CINC's) и глутатионпероксидазы (GPX) при активации PAR1 в астроцитах способствует выживанию нейронов.

Индукцированное тромбином высвобождение полиненасыщенных жирных кислот (PUFAs) в астроцитах может быть дополнительным механизмом PAR-зависимой нейропротекции. Сокращения: Glu – глутамат; ROS – активные формы кислорода [351]

Через активацию PAR1 тромбин участвует в патогенезе болезней Альцгеймера и Паркинсона, ишемии головного мозга и ЧМТ [18, 76, 176].

В наномолярных и микромолярных концентрациях тромбин вызывает гибель клеток в органотипической культуре срезов мозга [196], а также индуцирует ЭФА [323].

Дефицит PAR1 приводит к снижению гибели нейронов и выраженности неврологических дефицитов в различных экспериментальных моделях повреждения головного мозга. Эти данные указывают на ключевую роль PAR1-зависимой сигнализации в развитии нейродегенеративных расстройств [126, 299, 437, 606].

1.3.3 Роль тромбина и PAR1 в развитии эпилепсии

Хотя в нервной ткани сериновые протеазы экспрессируются в очень низкой концентрации [351], их уровень значительно увеличивается в головном мозге после нарушения ГЭБ. В этом состоянии происходит значительное неселективное повышение проницаемости мозговых капилляров и плотных контактов, что обеспечивает доступ в мозг белкам с большой молекулярной массой [52] и другим компонентам крови. Это происходит при нескольких неврологических состояниях [52, 561], включая геморрагический/ишемический инсульт [11, 279] и ЧМТ [276]. Несмотря на недостаток информации о количестве тромбина, проникающего через ГЭБ, сообщается, что его уровень увеличивается более чем в 200 раз (со 100 пмоль до 25 нмоль) в спинномозговой жидкости пациентов с субарахноидальным кровоизлиянием [544]. Кроме того, при кровотечении внутри мозговой ткани активный тромбин и другие протеазы свободно диффундируют в паренхиму мозга [544]. Прямым следствием контакта тромбина с тканью мозга является развитие судорог [323]. Показано, что внутримозговые инъекции тромбина приводят к появлению эпилептиформной активности. Интересно, что введение тромбина совместно с его ингибитором α -NAPAP предотвращало развитие как клинических, так и электрографических приступов [323]. Аналогично, мыши с дефицитом Nexin1

– эндогенного ингибитора тромбина – имеют повышенную восприимчивость к судорогам, вызванным каиновой кислотой [353].

Последующие исследования продемонстрировали, что индуцированные тромбином судороги опосредуются активацией PAR1 [357]. В срезах гиппокампа тромбин в концентрации 5 нмоль (1 Ед/мл) усиливал спонтанную активность пирамидных клеток CA3 [357]. Для изучения влияния тромбина на развитие эпилептиформной активности в условиях, имитирующих нарушение ГЭБ, в срез добавляли тромбин при повышенных уровнях K^+ или глутамата [59, 69, 129]. В норме добавление 4 мМ K^+ к срезам мозга не приводило к появлению спонтанной эпилептиформной активности, которая отчетливо наблюдалась при увеличении K^+ до 15 ммоль. Аналогично, глутамат в концентрации 100 мкмоль, в отличие от 500 мкмоль, не вызывал появления спонтанной эпилептиформной активности. В присутствии тромбина эпилептиформная активность возникала при более низких концентрациях K^+ (4 ммоль) и глутамата (100 мкмоль). Этот проэпилептогенный эффект тромбина опосредовался PAR1, поскольку он воспроизводился агонистом PAR1 (PAR1-AP) и блокировался ингибитором PAR1 (SCH79797).

Гиппокампальные срезы молодых крыс на постнатальном этапе (P6-P15) подвергали воздействию высоких концентраций тромбина (10 Ед/мл). Было обнаружено, что тромбин деполяризует мембранный потенциал нейронов и вызывает гиперполяризующее смещение чувствительного к тетродотоксину персистентного натриевого тока (INaP) через активацию PAR1 [266]. Кроме того, было показано, что тромбин модулирует синаптическую передачу в нейронах гиппокампа CA3, повышая как частоту, так и амплитуду миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (mEPSC), и одновременно снижая частоту и амплитуду миниатюрных тормозных постсинаптических токов (mIPSC) [358]. Важно отметить, что ингибирование PAR1 с помощью SCH79797 после ЭС приводило к снижению смертности и уменьшению развития хронической эпилепсии, увеличению выживаемости нейронов в гиппокампе, сокращению интериктальных вспышек активности мозга и улучшению электрографических и поведенческих характеристик приступов после ЭС [266]. В совокупности эти

исследования продемонстрировали проэпилептогенный эффект тромбина, который индуцирует мембранные и синаптические изменения, приводящие к судорожным приступам через активацию PAR1. Однако влияние вызванного тромбином повышения нейронной активности на развитие эпилепсии на более поздних стадиях остается неясным. Если тромбин действительно играет важную роль в развитии приступов при данной патологии, необходимы дальнейшие исследования для оценки терапевтического потенциала антагонистов PAR1 и/или ингибиторов тромбина в качестве противоэпилептических препаратов.

1.4 Поверхностный заряд нейрональной мембраны как модулятор возбудимости

Поверхностный заряд мембраны нейронов представляет собой совокупность заряженных молекулярных групп на внешней поверхности плазматической мембраны и в гликокаликсе, формирующих локальное электростатическое поле, которое существенно влияет на возбудимость нейронов и проведение нервных импульсов.

Основные молекулярные детерминанты поверхностного заряда включают: (1) отрицательно заряженные компоненты гликокаликса (сиаловые кислоты и их производные на гликопротеинах и ганглиозидах); (2) заряженные головки фосфолипидов; (3) заряженные домены мембранных белков; (4) компоненты внеклеточного матрикса. Величина и распределение поверхностного заряда модулируются различными факторами – pH среды, концентрацией двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) и одновалентных ионов (Na^+ , K^+), ионной силой раствора, а также активностью ферментов, модифицирующих гликокаликс (например, нейраминидаз при воспалительных процессах и метаболических нарушениях).

Динамические изменения поверхностного заряда происходят как в физиологических условиях (онтогенез, синаптическая пластичность, обучение, старение), так и при патологических процессах (ишемия, инсульт, эпилепсия, нейродегенеративные заболевания). Это делает поверхностный заряд важным

параметром нейронной возбудимости и перспективной мишенью для терапевтических вмешательств.

1.4.1 Полисиаловые кислоты: структурно-функциональная характеристика

Полисиаловые кислоты (ПСК) представляют собой углеводный полимер, мономерами которого являются остатки сиаловой кислоты, связанные α 2,8-гликозидной связью [556]. Степень их полимеризации довольно велика и составляет от 50-150 до 370 остатков N-ацетилнейраминовой кислоты [338]. Эта структура отличается от типичных N-связанных гликанов, содержащих 10-12 мономеров, и по размеру сопоставима с гликозаминогликанами, которые в среднем включают 80-100 остатков [591].

ПСК преимущественно расположены на внешней поверхности клеточной мембраны и участвуют в различных клеточных процессах [507]. Структурный компонент ПСК – сиаловые кислоты – представляют собой отрицательно заряженные моносахариды, характерные для позвоночных животных и некоторых микроорганизмов [504, 591]. ПСК являются частью обширного структурного разнообразия сложных углеводов, которые преимущественно ковалентно связаны с белками и липидами клеточных мембран, а также с некоторыми секреторными макромолекулами [591]. Сиаловые кислоты обычно занимают терминальное положение на внешней части этих молекул. Разнообразие гликановых структур значительно возрастает благодаря синтезу различных форм сиаловых кислот [611], что способствует усложнению «третьего языка жизни», реализуемого глюкоконъюгатами [504]. Первый и второй языки опосредуются нуклеиновыми кислотами и белками соответственно.

Сиаловые кислоты были обнаружены у вторичноротых животных (*Deuterostomia*). Существует предположение, что возникновение этих моносахаридов способствовало ускорению эволюции высших животных [504]. Они участвуют практически во всех физиологических процессах млекопитающих, поэтому нарушения их биосинтеза или катаболизма приводят к серьезным

патологическим состояниям, включая онкологические заболевания. Кроме того, микроорганизмы выработали различные стратегии использования сиаловых кислот, экспонированных на клеточной поверхности, в качестве рецепторов для адгезии и последующей инвазии клетки-хозяина или разрушения сиалового защитного слоя с помощью гидролитических ферментов (сиалидаз) [504, 591].

Сиаловые кислоты представляют собой семейство моносахаридов, включающее более 50 разновидностей, являющихся производными нейраминовой кислоты, различающихся заместителями при амино- или гидроксигруппах [86]. Аминогруппа нейраминовой кислоты может быть ацетилирована или гликозилирована. Обычно обнаруживается только одна О-ацетильная группа, преимущественно в положении С-9, однако известны также ди- и три-О-ацетилсиаловые кислоты, особенно в слизистом секрете подчелюстной железы крупного рогатого скота и в толстой кишке человека [141]. N-ацетилнейраминовая кислота, N-гликолилнейраминовая кислота и N-ацетил-9-О-ацетилнейраминовая кислота, по-видимому, являются представителями семейства сиаловых кислот, наиболее часто встречающимися в животном мире [488]. Однако повсеместное распространение имеет только N-ацетилнейраминовая кислота, тогда как остальные обнаружены не у всех видов [162]. Именно из этой кислоты синтезируются ПСК нервной ткани. В эукариотических клетках N-ацетилнейраминовая кислота синтезируется в цитозоле путем конденсации фосфоэнолпирувата с N-ацетилманнозамин-6-фосфатом или с маннозо-6-фосфатом [355]. Ключевым регуляторным ферментом в последовательности реакций, начиная с глюкозы, является эпимераза, превращающая УДФ-N-ацетилглюкозамин в N-ацетилманнозамин-6-фосфат [247]. После дефосфорилирования свободный моносахарид активируется в ядре до нуклеотидного сахара CMP. Ацетилированная форма (CMP-Neu5Ac) может быть модифицирована до гликозилированной формы (CMP-Neu5Gc) с помощью CMP-Neu5Ac-гидроксилазы. У млекопитающих этот фермент локализован в цитозоле, предположительно с прикреплением к поверхности митохондрий [363]. Активность гидроксилазы требует присутствия нескольких кофакторов. Электроны от NAD(P)H ферментативно переносятся на

цитохром b5, который является кофактором специфической гидроксилазы, окисляющей CMP-Neu5Ac [461]. CMP-Neu5Ac и CMP-Neu5Gc затем транспортируются специфическим переносчиком в аппарат Гольджи, где под действием сиалилтрансфераз включаются в состав гликопротеинов и гликолипидов соответственно [395]. Две полисиалилтрансферазы, ST8Sia IV (PST) и ST8Sia II (STX), участвуют в синтезе ПСК с различными паттернами экспрессии. Для сравнения: синтез многих гликанов требует координированного действия множества ферментов [168]. Помимо полисиалилтрансфераз ST8Sia IV и ST8Sia II, были идентифицированы только четыре других белка-носителя полисиаловых кислот: молекула адгезии нейронных клеток (NCAM, CD56), муцины молока, α - и β -субъединицы потенциал-зависимых натриевых каналов и нейропилин-2 [149, 601, 627, 648].

Полисиаловые кислоты широко распространены в нервной ткани. Благодаря своей локализации на гликопротеинах и ганглиозидах клеточной поверхности, а также анионной природе, ПСК играют важную роль во многих клеточных функциях [137]. В головном мозге выявлены два основных белка-носителя полисиаловых кислот: NCAM и потенциал-зависимые натриевые каналы. Оба белка-носителя интенсивно гликозилированы и содержат значительное количество остатков сиаловой кислоты во внеклеточном домене [37, 60]. ПСК существенно влияют на функциональные свойства потенциал-зависимых натриевых каналов, формируя локальное электрическое поле в области потенциал-чувствительного домена канала [264, 644]. Комплекс ПСК-NCAM вовлечен в процессы синаптогенеза, миграции клеток и роста аксонов [204].

Потенциал-зависимые натриевые каналы ответственны за генерацию и распространение потенциала действия в большинстве возбудимых клеток [57]. Скоординированная активация и инактивация натриевых каналов имеет жизненно важное значение для нормальной передачи нервных сигналов, мышечного сокращения и поддержания сердечного ритма. Потенциал-зависимые натриевые каналы представляют собой гетеромерные комплексы, состоящие из порообразующей α -субъединицы и одной или нескольких вспомогательных β -

субъединиц [115]. Именно тип α -субъединицы определяет функциональную специфичность изоформы канала. α -субъединица имеет четыре гомологичных повторяющихся домена (I-IV), каждый из которых содержит 6 трансмембранных сегментов (S1-S6). Сегмент S4, содержащий положительно заряженные аминокислотные остатки, функционирует как сенсор напряжения канала [541]. При изменении трансмембранного потенциала этот сегмент перемещается в электрическом поле мембраны, что приводит к конформационным изменениям и открытию канала для прохождения ионов натрия [200]. Полисиаловые кислоты, присутствующие на внеклеточных доменах канала, модулируют его функциональные свойства, создавая локальное отрицательно заряженное электрическое поле вблизи сенсора напряжения. Ионы натрия проходят через пору, которую можно разделить на две области: внешняя часть поры образована P-петлями (область между S5 и S6) четырех доменов. Эта область является самой узкой частью поры, отвечает за избирательную проницаемость ионов и содержит множество сайтов гликозилирования натриевых каналов [443]. Внутренняя часть поры образована сегментами S5 и S6 четырех доменов. Инактивационная петля (внутриклеточный участок, соединяющий домены III и IV) после длительной активации закрывает канал, инактивируя его [295]. Было идентифицировано девять типов α -субъединиц, что позволило выделить 9 изоформ семейства натриевых каналов (Nav1.1 – Nav1.9) [175]. В нейронах головного мозга крысы обнаружено четыре типа натриевых каналов: Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 и Nav1.6. Нередко одна клетка экспрессирует несколько изоформ α -субъединиц [55]. Несмотря на то, что α -субъединица способна самостоятельно формировать функциональные каналы, она часто ассоциирована с β -субъединицей, модулирующей активность натриевых каналов [142, 272]. β 1-субъединицы обычно интенсивно гликозилированы углеводными цепями в виде сиаловых кислот [60]. Эта связь осуществляется по электростатическому механизму [295]. В целом β 1-субъединица вызывает гиперполяризационный сдвиг инактивации потенциал-зависимых каналов. В некоторых работах показано, что β 1-субъединица также смещает кривые активации потенциал-зависимых каналов в сторону гиперполяризации. Клеточное

микроокружение сильно влияет на способность $\beta 1$ -субъединицы модулировать свойства натриевых каналов [295]. Субъединица $\beta 2$ экспрессируется в ЦНС и сердечной ткани [380, 495]. В общем, $\beta 2$ вызывает деполяризационный сдвиг при активации и/или инактивации Nav1.2 и Nav1.8, но не влияет на свойства каналов Nav1.3 и Nav1.5 [380, 417]. $\beta 2$ модулирует функциональные характеристики натриевых каналов посредством механизмов, зависящих от сialовой кислоты и независимых от сialовой кислоты. Зависимые от сialовой кислоты эффекты $\beta 1$ -субъединицы на конкретную α -субъединицу, вероятно, дополняют зависимые и независимые от сialовой кислоты эффекты $\beta 2$ -субъединицы на ту же α -субъединицу [295]. Сialовые кислоты, присоединенные к α -субъединице натриевого канала, могут по-разному влиять на его функциональные свойства. Активность натриевых каналов можно модулировать, изменяя состав их функциональных субъединиц, а именно варьируя степень сialизации этих субъединиц [295].

Даже незначительные отклонения от нормального ритма проведения возбуждения могут нарушить клеточную возбудимость и функционирование организма в целом. Поскольку активность каналов напрямую зависит от мембранного потенциала, любое изменение этого параметра будет влиять на воротный механизм канала, приводя к таким расстройствам, как миотония, эпилепсия, паралич, идиопатическая фибрилляция желудочков и др. [116]. Например, внеклеточный кальций изменяет потенциал-зависимость канала таким образом, что чем выше концентрация внеклеточного кальция, тем сильнее должна быть деполяризация для достижения той же вероятности открытия канала [542]. Гипотеза поверхностного заряда предполагает, что поверхность мембраны вблизи канала содержит фиксированные отрицательные заряды, которые изменяют электрическое поле вблизи потенциал-чувствительного канала. Эти отрицательные заряды смещают локальный потенциал ближе к порогу открытия каналов. Кальций может нейтрализовать внеклеточный отрицательный заряд путем прямого взаимодействия с ним или посредством механизма электростатического экранирования [68]. Существует несколько источников, которые создают

поверхностный заряд вблизи потенциал-зависимых каналов: заряженные аминокислоты и другие гидрофильные остатки белков каналов, фосфаты, полимеризованные остатки сиаловых кислот и заряженные липиды [220]. Нейтрализация отрицательных поверхностных зарядов двухвалентными катионами сдвигает кривые активации потенциал-зависимых каналов к более положительным значениям [313]. Потенциал-зависимые натриевые каналы интенсивно гликозилированы, причем значительная часть углеводных компонентов представлена отрицательно заряженными остатками сиаловой кислоты [60]. Например, натриевый канал электрического угря содержит 30 % углеводов по массе (500 сахаридных остатков, большая часть которых – сиаловые кислоты и N-ацетилглюкозамины). Натриевые каналы мышц и мозга также содержат значительное количество остатков сиаловой кислоты на гликозилированной внеклеточной стороне. Уровень сиализации натриевых каналов изменяется в ходе постэмбрионального развития; такие изменения степени сиализации коррелируют с изменениями потенциал-зависимой проницаемости каналов [114, 574]. Описано также изоформ-специфическое влияние сиаловых кислот на проницаемость натриевых каналов, заключающееся в изменении физиологических свойств каналов в зависимости от типа экспрессирующих их клеток [68, 295, 644].

Еще одним носителем ПСК в нервной ткани являются молекулы клеточной адгезии NCAM. NCAM экспрессируются во всех типах нервных клеток, где нейрон-нейрональная и нейрон-глиальная адгезия осуществляется посредством гомофильных и гетерофильных взаимодействий с другими молекулами адгезии и молекулами внеклеточного матрикса. NCAM является первой выделенной и охарактеризованной молекулой из суперсемейства иммуноглобулинов [468]. Внеклеточная часть NCAM содержит пять иммуноглобулиноподобных доменов и два домена фибронектина III типа (рисунок 1.14).

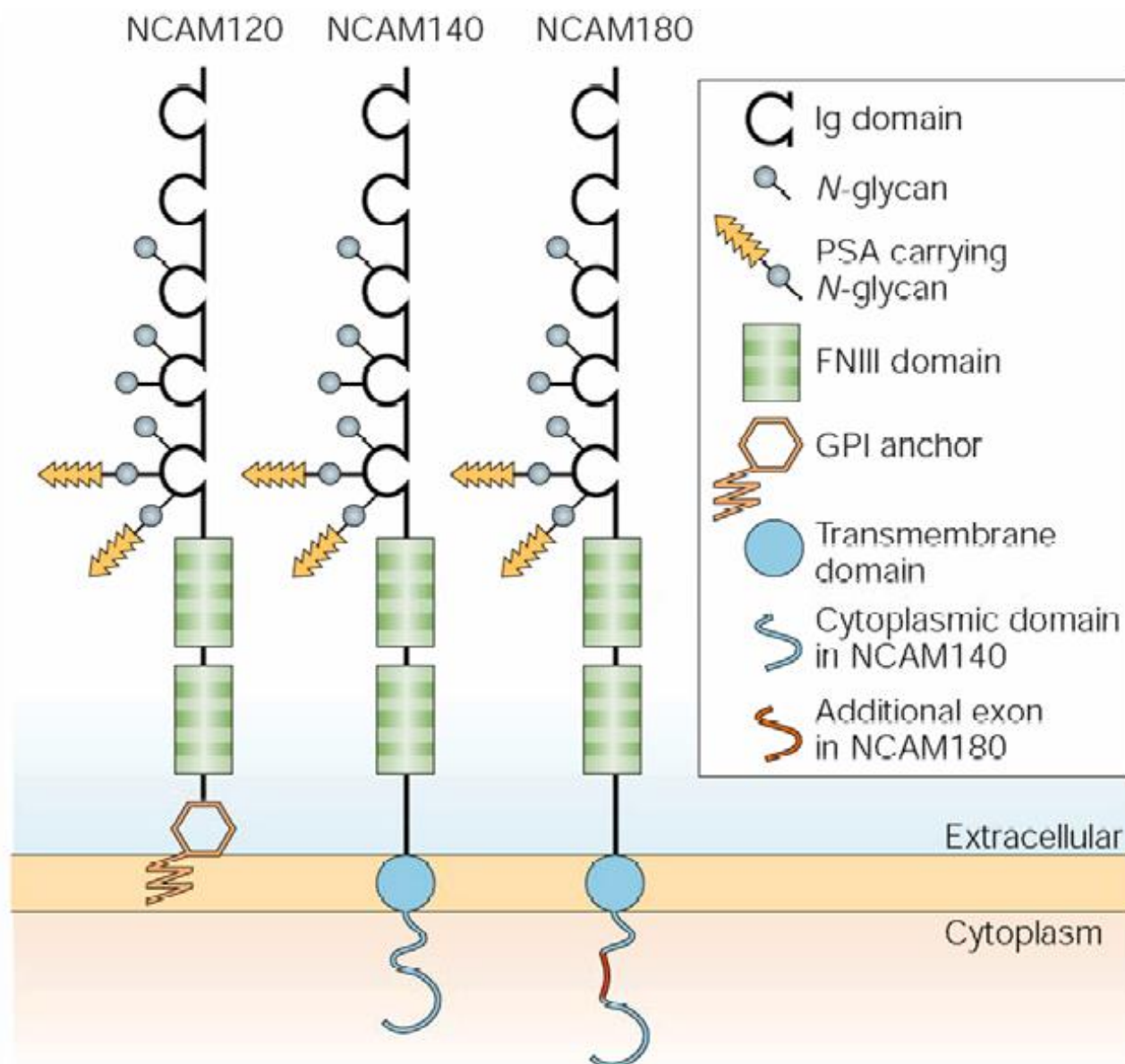


Рисунок 1.14 – Структура трех основных изоформ NCAM. Три основные изоформы NCAM названы в соответствии с их молекулярной массой (в кДа). NCAM120 заякорен в мембране через гликозилфосфатидилинозитоловый (GPI) якорь, тогда как NCAM140 и NCAM180 являются трансмембранными белками. Все три изоформы содержат пять иммуноглобулиноподобных (Ig) доменов и два домена фибронектина III типа (FNIII) во внеклеточной части. Цитоплазматические домены NCAM140 и NCAM180 различаются по длине: NCAM180 содержит дополнительную последовательность, кодируемую экзоном, отсутствующим в NCAM140, что является результатом альтернативного сплайсинга [204]

Помимо трех основных изоформ NCAM, существует несколько дополнительных форм, образующихся в результате альтернативного сплайсинга [218]. Помимо различных изоформ и их вариантов, NCAM подвергается посттрансляционным модификациям, которые осуществляются путем присоединения отрицательно заряженной ПСК различной длины.

Интересно, что только NCAM позвоночных содержит такую уникальную модификацию, как ПСК, уровень экспрессии которой на NCAM может динамично изменяться в ответ на синаптическую активность и обучение [204, 588].

Как и многие другие молекулы клеточной адгезии, NCAM несет углеводный эпитоп HNK-1 (антиген естественных киллеров человека-1), который содержит сульфатированную глюкуроновую кислоту и присоединяется к NCAM путем N-гликозилирования [620].

Экспрессия NCAM начинается на ранних стадиях развития: например, у *Xenopus* первые транскрипты NCAM обнаруживаются уже через два часа после нейральной индукции [51]. NCAM характеризуется широкой экспрессией в нервной системе.

Например, все три изоформы присутствуют в гиппокампе, а именно в зубчатой извилине, полях CA1 и CA3 пирамидного слоя, но практически отсутствуют в молекулярном слое [204].

Различные типы клеток и субклеточные компартменты демонстрируют специфическую экспрессию отдельных изоформ NCAM. NCAM120 преимущественно экспрессируется в глиальных клетках [557], тогда как NCAM140 и NCAM180 экспрессируются исключительно в нейронах. NCAM140 обнаруживается как на пре-, так и на постсинаптической мембране, в то время как NCAM180 преимущественно накапливается в постсинаптической плотности зрелых нейронов [536].

Длинный цитоплазматический домен NCAM180 взаимодействует с компонентами цитоскелета, тем самым способствуя стабилизации синаптической структуры [235].

NCAM-опосредованная клеточная адгезия возникает преимущественно за счет гомофильного взаимодействия между молекулами NCAM, локализованными на соседних клетках (транс-взаимодействие) [614]. Помимо этого, NCAM способен вступать в гетерофильные взаимодействия с другими членами семейства иммуноглобулинов (цис-взаимодействие) [139]. Кроме того, NCAM взаимодействует с некоторыми компонентами внеклеточного матрикса, такими как хондроитинсульфат- и гепарансульфат-содержащие протеогликаны, включая агрин, нейрокан и фосфакан [105, 316]. Описаны как прямые, так и непрямые взаимодействия NCAM с различными компонентами цитоскелета и внутриклеточными сигнальными молекулами. Например, NCAM180 якорится к цитоскелету посредством прямого взаимодействия его цитоплазматического домена с белком спектрином, что обеспечивает стабильную локализацию молекулы в плазматической мембране.

Функции молекул NCAM регулируются их гликозилированием, при этом полисиализация оказывает критическое влияние на их функциональные свойства. Полисиализация снижает гомофильное связывание NCAM за счет создания стерических препятствий объемными отрицательно заряженными полисиаловыми цепями, что ослабляет межклеточные контакты [163]. Полисиализованная форма NCAM (PSA-NCAM) участвует в высокодинамичных процессах, таких как миграция клеток, рост аксонов и синаптическая пластичность [514]. Присоединение полисиаловых цепей к NCAM осуществляется в аппарате Гольджи как нормальный этап биосинтетической реакции гликозилирования эукариотических белков [37]. Полисиаловые цепи могут быть присоединены к пятому иммуноглобулин-подобному домену всех изоформ NCAM [559]. На ранних стадиях эмбрионального развития молекулы NCAM не содержат полисиаловых цепей; максимальной экспрессии комплекс PSA-NCAM достигает в перинатальном периоде. Однако по мере дальнейшего развития количество полисиаловых цепей постепенно уменьшается, и лишь небольшая часть NCAM остается в полисиализованной форме [75]. Во взрослом мозге экспрессия PSA-NCAM сохраняется в популяциях нейронов, характеризующихся непрерывным

нейрогенезом, миграцией клеток, ростом аксонов и синаптической пластичностью, а именно в ростральном миграционном тракте [331], гиппокампе [512] и ядрах гипоталамуса [558].

1.4.2 Нейраминидаза – ключевой фермент дисиализации

Ключевым ферментом расщепления ПСК является нейраминидаза (сиалидаза, ЕС 3.2.1.18). Этот фермент относится к семейству гликозилгидролаз и катализирует гидролитическое отщепление концевых остатков сиаловых кислот, связанных $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - и $\alpha 2,8$ -гликозидными связями в олигосахаридах, гликопротеинах, гликолипидах и синтетических субстратах [24].

Нейраминидазы широко распространены в природе и обнаружены у различных организмов. У микроорганизмов эти ферменты выполняют важные функции: входят в состав оболочек вирусов (вирусы гриппа, парамиксовирусы), обеспечивая проникновение в клетку-хозяина и высвобождение вирионов; продуцируются патогенными бактериями (*Clostridium perfringens* – возбудитель газовой гангрены, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*), способствуя инвазии и деградации защитных глюкоконъюгатов хозяина. У животных (позвоночных и беспозвоночных) нейраминидазы участвуют в регуляции межклеточных взаимодействий, ремоделировании клеточной поверхности, процессинге сигнальных молекул и модуляции иммунного ответа [109]. В растениях нейраминидазная активность не обнаружена, что связано с отсутствием у них метаболизма сиаловых кислот [205].

Для расщепления полисиаловых цепей (гомополимеров $\alpha 2,8$ -связанных остатков сиаловых кислот) особое значение имеют эндо-N-ацетилнейраминидазы (эндо-сиалидазы), способные расщеплять внутренние $\alpha 2,8$ -связи, в отличие от обычных экзо-нейраминидаз, отщепляющих только терминальные остатки.

Существует два основных класса нейраминидаз, различающихся по механизму действия: экзо-нейраминидазы (расщепляющие концевые остатки) и эндо-нейраминидазы (расщепляющие внутрицепочечные связи) ПСК.

Экзо-нейраминидазы (КФ 3.2.1.18, сиалидазы) катализируют гидролиз $\alpha 2,3$ -, $\alpha 2,6$ - и $\alpha 2,8$ -гликозидных связей, отщепляя терминальные остатки сиаловых кислот в олигосахаридах, гликопротеинах и гликолипидах.

Эндо-нейраминидазы (КФ 3.2.1.129, эндо-N-ацетилнейраминидазы) специфично расщепляют только внутренние $\alpha 2,8$ -гликозидные связи в олиго- и полисиаловых цепях [258]. Для всех представителей обоих классов характерна консервативная структурная организация активного центра в виде шестилопастного β -пропеллера. К настоящему времени у вирусов, бактерий и млекопитающих идентифицировано 137 типов нейраминидаз [109]. Нейраминидаза КФ 3.2.1.129 обнаружена преимущественно у бактериофагов и некоторых патогенных бактерий [509]. Это гомотример с общей молекулярной массой ~ 328 кДа; молекулярная масса мономера составляет ~ 105 кДа, что соответствует 7,5 % от общего белкового содержания вирусов. Это холофермент, активный в среде с нейтральным pH. Минимальная длина субстрата для нейраминидазы это олигосиаловая кислота со степенью полимеризации ≥ 5 ($DP \geq 5$). Оптимальные субстраты: длинноцепочечные полисиаловые кислоты ($DP \sim 200$) с $K_m = 50-70$ мкмоль (по остаткам сиаловой кислоты). Короткие олигомеры ($DP 10-20$) являются менее эффективными субстратами ($K_m = 1,2$ мколь).

Нейраминидазная активность может ингибироваться молекулами ДНК (вероятно, неспецифическое ингибирование за счет электростатических взаимодействий) и некоторыми полианионами (хондроитин сульфат, поли- γ -D-глутаминовая кислота и другие сульфатированные гликозаминогликаны).

Анализ продуктов деполимеризации методом гель-фильтрационной хроматографии показал, что фермент связывается с полисиаловой цепью и расщепляет $\alpha 2,8$ -связи по случайному механизму, генерируя олигосиаловые кислоты различной длины [258].

Нейраминидаза, расщепляющая терминальные остатки сиаловых кислот (КФ 3.2.1.18), широко распространена в природе, включая вирусы, бактерии, микоплазмы, простейшие, грибы и млекопитающих [109]. Отщепление сиаловых

кислот от концевых фрагментов олигосахаридных цепей гликолипидов и гликопротеинов является первым этапом их деградации. Кроме того, считается, что сиалидаза участвует во многих биологических процессах, таких как проникновение вирусов в клетки-хозяева и высвобождение вирионов, модуляция экспрессии антигенов на клеточной поверхности, клеточная дифференцировка, сигнальная трансдукция и межклеточные взаимодействия [389]. Семейство нейраминидаз млекопитающих разделено на четыре основные группы, различающиеся по субклеточной локализации и субстратной специфичности: лизосомальная сиалидаза NEU1, цитозольная сиалидаза NEU2, сиалидаза, ассоциированная с плазматической мембраной, NEU3, и сиалидаза, связанная с внутренней мембраной, NEU4 [208].

Лизосомальная нейраминидаза человека NEU1 входит в состав мультиферментного комплекса, включающего β -галактозидазу и защитный белок/катепсин А, при этом мутации гена NEU1 связаны с развитием тяжелых лизосомных болезней, таких как сиалидоз (типы I и II) и галактосиалидоз, характеризующихся накоплением сиализированных гликоконъюгатов и прогрессирующими неврологическими нарушениями [280].

Физиологическая роль цитозольной нейраминидазы NEU2 остается дискуссионной в связи с тем, что содержание естественных сиализированных субстратов в цитоплазме крайне низкое, однако установлено, что этот фермент играет критическую роль в дифференцировке миобластов L6 крысы в многоядерные микротрубочки *in vitro* [187]. Стабильная экспрессия нейраминидазы NEU2 в клетках карциномы человека A431 приводит к снижению уровня ганглиозида GM3, что сопровождается повышением экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и усилением аутофосфорилирования рецепторных тирозинкиназ [383]. Гиперэкспрессия NEU2 приводит к значительному ингибированию метастазирования в легкие, клеточной инвазии и миграции, демонстрируя противоопухолевый эффект [125].

Нейраминидаза NEU3, ассоциированная с плазматической мембраной, является наиболее изученным представителем семейства и характеризуется

высокой субстратной специфичностью к ганглиозидам, преимущественно расщепляя сialовые кислоты в составе гликофинголипидов [391]. Нейраминидаза NEU3 способна десиализировать ганглиозиды, расположенные не только на собственной плазматической мембране, но и на наружной поверхности плазматической мембраны соседних клеток посредством трансклеточного взаимодействия. Благодаря своей локализации на наружной стороне плазматической мембраны фермент функционирует в межклеточном пространстве, модифицируя ганглиозидный состав как собственной, так и прилегающих клеток [449]. Установлено, что данный фермент ассоциирован с кавеолами липидных рафтов [612]. Сиалидаза NEU3 модулирует процессы на клеточной поверхности и играет ключевую роль в регуляции клеточной адгезии, межклеточных взаимодействий, пролиферации, дифференцировки и онкогенной трансформации [310, 391, 612].

NEU4, последний идентифицированный член семейства нейраминидаз человека, был первоначально охарактеризован как фермент, ассоциированный с внутриклеточными мембранами [140]. Позднее была обнаружена изоформа с 12 дополнительными аминокислотными остатками на N-конце, локализуемая на наружной мембране митохондрий. Эти две изоформы получили названия длинной и короткой формы нейраминидазы NEU4: длинная форма локализуется в митохондриях, тогда как короткая форма ассоциирована с эндоплазматическим ретикулумом [78, 628]. Показано также присутствие NEU4 в лизосомальном компартменте, при этом ее сверхэкспрессия в фибробластах пациентов с сиалидозом и галактосиалидозом приводит к фенотипической коррекции, подтверждая участие NEU4 в лизосомальном катаболизме [515].

Все описанные нейраминидазы характеризуются общими структурными особенностями, включая консервативный мотив F(Y)RIP, аспарагиновый блок, консенсусную последовательность каталитического центра и β -пропеллерную укладку, при этом активный центр располагается в глубокой каталитической борозде на одной из сторон молекулы [178]. Функциональная активность нейраминидаз направлена на гидролитическое удаление терминальных сialовых

кислот, включая полисиализированные структуры, с поверхности клеток, что критически важно для регуляции многочисленных клеточных процессов.

1.4.3 Патологические процессы, связанные с нарушением метаболизма нейраминидазы и полисиаловых кислот

Основной характеристикой заболеваний, обусловленных дисфункцией нейраминидазы, является нарушение баланса сиаловых кислот в организме. В зависимости от типа патологии и задействованных механизмов наблюдается либо избыточное накопление, либо дефицит сиаловых кислот, что отражает нарушения их метаболизма. Описаны несколько клинических состояний, связанных с накоплением свободных сиаловых кислот в лизосомах: болезнь Салла и инфантильное нарушение накопления сиаловых кислот – оба заболевания наследуются аутосомно-рецессивно. Для всех случаев характерно повышенное содержание свободных сиаловых кислот в моче вследствие нарушения их транспорта из лизосом [257]. Инфантильное нарушение накопления сиаловых кислот представляет собой редкое, быстро прогрессирующее заболевание, манифестирующее у новорожденных. Клиническая картина характеризуется неонатальным асцитом, эпилептическими приступами, дисморфическими признаками; летальный исход наступает в раннем детском возрасте (до двух лет) [123]. На клеточном уровне патология проявляется увеличением лизосом, содержащих высокие концентрации свободных сиаловых кислот [169]. Свободные сиаловые кислоты высвобождаются из олигосахаридных цепей сиализированных гликопротеинов и гликолипидов в процессе их лизосомальной деградации. Предыдущие исследования показали, что накопление сиаловых кислот в лизосомах при болезни Салла и инфантильном нарушении накопления сиаловых кислот обусловлено нарушением протон-зависимого транспорта сиаловых кислот [252].

Болезнь Салла была впервые описана в 1979 г. у трех родственников (сибсов), проживающих в регионе Салла на севере Финляндии [46]. При нормально протекающих беременности и родах первые признаки заболевания манифестируют

в виде мышечной гипотонии и задержки моторного развития в первые годы жизни [590]; у части пациентов отмечается транзиторный нистагм. Для большинства больных характерна атаксия, у некоторых развиваются атетоидные двигательные нарушения. Отмечается значительная задержка моторного развития: 20 % пациентов не обретают способность к самостоятельному передвижению. Интеллектуальное развитие также существенно замедлено – большинство больных осваивают лишь отдельные слова [590]. К концу второго десятилетия жизни медленно прогрессирующее течение приводит к тяжелой интеллектуальной недостаточности в сочетании со спастичностью нижних, а затем и верхних конечностей. У трети пациентов развивается эпилепсия. Нейровизуализация при болезни Салла выявляет гипоплазию мозолистого тела и дисмиелинизацию [102].

Другую группу заболеваний, связанных с нарушением метаболизма нейраминидазы, составляют сиалидоз, обусловленный мутациями в гене лизосомальной нейраминидазы, и галактосиалидоз – комбинированная недостаточность нейраминидазы и β -галактозидазы, вызванная дефицитом защитного белка/катепсина А [27, 577]. При сиалидозе и галактосиалидозе происходит накопление сиализированных олигосахаридов и гликопептидов в тканях, которые также экскретируются с мочой. В зависимости от возраста дебюта и выраженности симптомов выделяют различные клинические формы сиалидоза. Тип I представляет собой относительно легкую форму заболевания, для которой характерны миоклонус и феномен «вишнево-красного пятна» в макуле. Симптомы манифестируют во втором десятилетии жизни и ограничиваются миоклонией и прогрессирующим снижением зрения. Сиалидоз типа II манифестирует в неонатальном периоде или раннем детстве и характеризуется прогрессирующим поражением нервной системы и когнитивными нарушениями. Остаточная активность нейраминидазы составляет от 0 до 10 % по сравнению с контрольными значениями [626].

Дефицит ПСК на молекуле адгезии нервных клеток NCAM ассоциирован с развитием шизофрении – психического заболевания, поражающего около 1% населения мира. При недостаточной полисиализации NCAM наблюдаются

нарушения, характерные для шизофрении: аномальное развитие мозга, нарушение долговременной потенции и депрессия в зоне СА1 гиппокампа, дефасцикуляция мшистых волокон, нарушение формирования синапсов и пространственной памяти, а также различные поведенческие расстройства [19].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о ключевой роли метаболизма сиаловых кислот и активности нейраминидазы в функционировании нервной системы. Нарушения сиализации приводят к широкому спектру заболеваний — от тяжелых лизосомных болезней накопления до психоневрологических расстройств, что подчеркивает критическую важность поддержания гомеостаза сиаловых кислот для нормального функционирования организма.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Организация исследования

Экспериментальная часть работы выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Института биохимических технологий, экологии и фармации федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» (ФГАОУ ВО «КФУ»), а также на базе Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины (г. Киев).

Экспериментальные животные. Исследования проводили на самцах крыс двух линий: *Wistar* и *WAG/Rij* (ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», питомник лабораторных животных «Рапполово» (Филиал НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ – ПЛЖ «Рапполово»); виварий Института физиологии им. А. А. Богомольца).

Соответствие принципам этики: животных содержали в условиях вивария согласно рекомендациям ГОСТ Р-33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.) и директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Все эксперименты выполнены в соответствии с ГОСТ Р 53434-2009 от 02.12.2009, правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований, этическими стандартами, утвержденными правовыми актами Российской Федерации, принципами Базельской декларации и рекомендациями биоэтического комитета ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского».

Уход за животными и мониторинг. На протяжении всего периода исследования животных содержали под наблюдением в условиях вивария со свободным доступом к воде и пище при регулируемом световом режиме, температуре 20-24 ° С и влажности воздуха 45-65 %. Из эксперимента животных выводили путем гильотинной декапитации под хлоралгидратным наркозом в дозе 400 мг/кг.

Дизайн исследования. Для решения поставленных задач исследования было проведено 7 этапов экспериментов, объединенных в три блока, направленных на изучение механизмов модуляции эпилептиформной активности: ионный дисбаланс (Блок I), сигнализация тромбин/PAR1 (Блок II), модификация поверхностного заряда мембраны нейронов (Блок III) (рисунок 2.1).

На первом этапе исследовали влияние нарушения ионного гомеостаза на электрическую активность нейронов и нейронных сетей гиппокампа *in vitro*, Дисбаланс ионного гомеостаза, моделирующий последствия дисфункции ГЭБ, воспроизводили путём применения модифицированного раствора искусственной спинномозговой жидкости (мИСМЖ) с изменённой ионной композицией; подробный состав модифицированной мИСМЖ приведён в разделе 2.2.

Для моделирования нарушения ионного гомеостаза использовали два типа препаратов: первичную культуру нейронов гиппокампа новорожденных крыс линии *Wistar* (n = 6) применяли для *patch-clamp*-регистрации в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока, и переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 21 день (P (postnatal day) 21, n = 10) использовали для отведения внеклеточной популяционной активности пирамидного слоя области CA1. Подробные протоколы получения культуры нейронов, острых срезов гиппокампа, электрофизиологических способов регистрации активности описаны в разделе 2.2.

Второй этап был посвящен изучению влияния раствора с повышенной осмолярностью на пароксизмальную активность головного мозга крыс линии *WAG/Rij* с генетически детерминированной абсансной эпилепсией (n = 15, масса

	БЛОК I Ионный дисбаланс как триггер гипервозбудимости		БЛОК II Роль тромбина и PAR1				БЛОК III Модификация поверхностного заряда мембраны
	Этап 1 <i>in vitro</i>	Этап 2 <i>in vivo</i>	Этап 3 <i>in vitro</i>	Этап 4 <i>in vitro</i>	Этап 5 <i>in vitro</i>	Этап 6 <i>in vivo</i>	Этап 7 <i>in vitro</i>
Объект, n	1) первичная культура нейронов гиппокампа новорожденных крыс линии <i>Wistar</i> (P0, n = 6); 2) переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии <i>Wistar</i> (P21, n = 10)	Самцы крыс линии <i>WAG/Rij</i> (n = 15, масса 260–360 г)	1) первичная культура нейронов гиппокампа новорожденных крыс линии <i>Wistar</i> (P0, n = 6); 2) переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии <i>Wistar</i> (P21, n = 10); 3) Переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии <i>Wistar</i> с ЭС в острой и хронической стадии (P21, n = 20)	Переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии <i>Wistar</i> (P21, n = 60)	Переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии <i>Wistar</i> 4х групп (P27, n = 70): «контроль», «контроль + SCH», «ЭС», «ЭС + SCH».	Самцы крыс линии <i>Wistar</i> (P27, n = 201), распределенные на четыре группы: «контроль», «контроль + SCH», «ЭС», «ЭС + SCH».	Переживающие срезы гиппокампа самцов крыс линии <i>Wistar</i> (P21, n = 40)
Что делали	1) мИСМЖ → мИСМЖ + AP-5 2) мИСМЖ	Пероральное применение электролитного vs гипертонического раствора	1) мИСМЖ + тромбин → мИСМЖ + тромбин + AP-5 → мИСМЖ + тромбин + SCH 2) мИСМЖ + тромбин 3) Базовый ИСМЖ	мИСМЖ + тромбин	<i>In vivo</i> индукция ЭС в литий-пилокарпиновой модели, внутрибрюшинное введение блокатора PAR1 SCH79797 (25 мкг/кг)	<i>In vivo</i> индукция ЭС в литий-пилокарпиновой модели, внутрибрюшинное введение блокатора PAR1 SCH79797 (25 мкг/кг)	Фармакологическая блокада нейраминидазы: 2 ч инкубации с NADNA 500 мкМ
Методы регистрации	1) Patch-clamp регистрация постсинаптических токов 2) Регистрация внеклеточных потенциалов от срезов гиппокампа	Инвазивная регистрация ЭЭГ	1) Patch-clamp регистрация постсинаптических токов 2) Регистрация внеклеточных потенциалов от срезов гиппокампа 3) Регистрация внеклеточных потенциалов от срезов гиппокампа	Регистрация пВПСП, РРФ, ПТП, ДВП, пластичности, зависящей от активности	Регистрация пВПСП, РРФ, ПТП, ДВП	1) Водный лабиринт Морриса 2) «Открытое поле» 3) Тесты на возбудимость 4) «Перегорodka»	Регистрация пВПСП, синаптической эффективности, РРФ, ПТП, ДВП, пВПСП-спайк сопряжения

Рисунок 2.1. – Общая схема дизайна исследования. Три блока экспериментов, направленных на изучение механизмов модуляции эпилептиформной активности: ионный дисбаланс (Блок I), сигнализация тромбин/PAR1 (Блок II), модификация поверхностного заряда мембраны нейронов (Блок III)

260-360 г); пароксизмальную активность оценивали методом инвазивной регистрации ЭЭГ, подробно описанным в разделе 2.3. Животных случайным образом разделили на две группы: первая ($n = 8$) получала перорально электролитный раствор на основе риса вместо воды в поилках на протяжении 6 дней, вторая ($n = 7$) – гиперосмолярный раствор с осмолярностью, соответствующей электролитному (состав растворов приведен в разделе 2.3.3). В качестве контрольных использовали записи ЭЭГ, зарегистрированные у животных обеих групп на протяжении 4 дней до замены воды в поильниках на экспериментальный раствор.

Критерии включения. В исследование включали клинически здоровых самцов крыс линии *WAG/Rij* в возрасте 10 ± 1 мес. на начало эксперимента с массой тела 260-360 г, у которых при анализе фоновой (контрольной) ЭЭГ были зарегистрированы типичные для данной линии пик-волновые разряды частотой 8-10 Гц, характерные для абсансной эпилепсии.

Критерии невключения. В исследование не включали животных с массой тела вне диапазона 260-360 г, с клиническими признаками заболеваний, с отсутствием или атипичным паттерном пик-волновых разрядов на фоновой ЭЭГ, а также особей, ранее участвовавших в других экспериментальных протоколах.

Критерии исключения. Из исследования исключали животных в случае: гибели в ходе эксперимента; развития интеркуррентных заболеваний; технических нарушений регистрации ЭЭГ (смещение или отказ электродов, выраженные артефакты); отказа от потребления экспериментального раствора; выявления патологических изменений внутренних органов при аутопсии.

На третьем этапе устанавливали роль тромбина в индукции эпилептиформной активности гиппокампа в модельных условиях дисфункции ГЭБ. Этап включал три серии экспериментов, последовательно оценивающих эффекты тромбина на разных уровнях организации нейронной активности – от отдельных клеток до сетевой активности в патологических условиях.

Серия 1. Регистрировали спонтанные потенциалы действия отдельных нейронов первичной культуры гиппокампа методом *patch-clamp* в конфигурации

«целая клетка» в режиме фиксации тока. Культуру получали из гиппокампа новорожденных крыс линии *Wistar* ($n = 6$). В ходе регистрации последовательно апплицировали мИСМЖ, тромбин в концентрации 5 Ед/мл в составе мИСМЖ и селективный антагонист рецепторов PAR1 – SCH 79797 (концентрация 10 мкмоль/л).

Критерии включения. В анализ включали нейроны первичной культуры гиппокампа на 10-14-е сутки *in vitro* (DIV 10–14), имеющие морфологические признаки пирамидных клеток, стабильный потенциал покоя не выше -55 мВ, амплитуду потенциала действия не менее 60 мВ и способность генерировать регулярные ПД в ответ на деполяризующий тестовый ток.

Критерии невключения. Не включали нейроны с потенциалом покоя выше -55 мВ, с признаками нарушения целостности мембраны, с нестабильной базовой активностью в контрольном растворе.

Критерии исключения. Из анализа исключали записи с потерей гигаомного контакта в ходе эксперимента, изменением сопротивления доступа более чем на 20 % от исходного, появлением выраженных артефактов регистрации, а также нейроны, не завершившие полный протокол последовательной аппликации (мИСМЖ → тромбин → SCH 79797).

Серия 2. Проводили внеклеточную регистрацию популяционной активности пирамидного слоя области CA1 на переживающих срезах гиппокампа самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 21 день (P21, $n = 10$) при совместной аппликации мИСМЖ и тромбина 5 Ед/мл.

Критерии включения. В исследование включали переживающие срезы гиппокампа толщиной 400 мкм, полученные от клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте P21, с сохранной цитоархитектоникой пирамидного слоя области CA1.

Критерии невключения. Не включали срезы с механическими повреждениями области CA1 или CA3, отсутствием воспроизводимого популяционного ответа.

Критерии исключения. Из анализа исключали срезы, у которых в ходе регистрации отмечалось отсутствие реакции на экспериментальный раствор, смещение регистрирующего электрода, а также случаи технических сбоев перфузионной системы.

Серия 3. Отводили внеклеточную популяционную активность пирамидного слоя области CA1 на переживающих срезах гиппокампа животных с индуцированным эпилептическим статусом (ЭС) в литий-пилокарпиновой модели. ЭС индуцировали у самцов крыс линии *Wistar* ($n = 20$, исходный возраст P21) по протоколу, описанному в разделе 2.4.3 (хлорид лития 127 мг/кг, пилокарпин 60 мг/кг). В дальнейший анализ включали животных с развившимся ЭС не менее 5-й стадии по шкале Расина длительностью ≥ 60 мин. Регистрацию популяционной активности пирамидного слоя CA1 проводили в двух временных точках: на острой стадии – через 24-48 ч после купирования ЭС (P22-P23, $n = 10$) и на хронической стадии – через 2 недели после индукции ЭС (P35, $n = 10$).

Критерии включения. В анализ включали срезы гиппокампа животных, у которых в ответ на введение хлорида лития и пилокарпина развился эпилептический статус не менее 5-й стадии по шкале Расина длительностью ≥ 60 мин, регистрация проводилась в заданных временных точках (P22-P23 – острая стадия; P35 – хроническая стадия), а сами срезы соответствовали критериям сохранности, указанным в Серии 2.

Критерии невключения. Не включали животных, у которых ЭС не достиг 5-й стадии по шкале Расина либо продолжался менее 60 мин, а также срезы, не удовлетворяющие требованиям к морфологической сохранности и стабильности базового ответа.

Критерии исключения. Из исследования исключали животных, погибших до момента приготовления срезов; случаи, когда время между купированием ЭС и регистрацией выходило за пределы заявленных окон (24-48 ч или 14 сут $\pm$ 1 сут); срезы с техническими нарушениями регистрации.

На четвертом этапе проводили комплексную оценку синаптической пластичности нейронной сети CA3-CA1 гиппокампа в условиях, моделирующих

дисфункцию ГЭБ *in vitro*. Нарушение функции ГЭБ воспроизводили путем аппликации мИСМЖ в сочетании с тромбином в концентрации 5 Ед/мл; подробный состав растворов и протокол аппликации приведены в разделе 2.4.

В качестве объекта исследования использовали переживающие срезы гиппокампа клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 21 день (P21, n = 60). На срезах оценивали общий уровень возбуждающей синаптической передачи, кратковременную и долговременную формы синаптической пластичности, а также пластичность, зависимую от активности. Подробные протоколы получения срезов и регистрации синаптических ответов описаны в разделах 2.2 и 2.5.

Критерии включения. В исследование включали переживающие срезы гиппокампа толщиной 400 мкм, полученные от клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте P21, с сохранной морфологией пирамидного слоя CA1 и коллатералей Шаффера, стабильной входно-выходной характеристикой и воспроизводимыми пВПСП амплитудой не менее 0,1 мВ на протяжении контрольного периода не менее 10-15 мин.

Критерии не включения. Не включали срезы с механическими повреждениями исследуемой области, отсутствием стабильного пВПСП, признаками спонтанной эпилептиформной активности в контрольном растворе.

Критерии исключения. Из анализа исключали эксперименты, в которых наблюдалось: изменение амплитуды контрольного пВПСП более чем на 20 % за время базовой регистрации; смещение или отказ электродов; технические артефакты стимуляции или регистрации.

На пятом этапе исследовали PAR1-зависимую модуляцию синаптической пластичности гиппокампа крыс после эпилептического статуса, индуцированного в молодом возрасте. Для данной цели применяли селективный блокатор PAR1 вещество SCH 79797 в концентрации 25 мкг/кг. В исследовании использовали клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 27 дней (P27, n = 70).

ЭС индуцировали в литий-пилокарпиновой модели по протоколу, подробно описанному в разделе 2.4.3. В дальнейший анализ включали только тех животных

групп «ЭС» и «ЭС + SCH», у которых развился ЭС не менее 5-й стадии по шкале Расина длительностью ≥ 60 мин. Через 15 мин после купирования ЭС животным ежедневно в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили селективный антагонист рецепторов PAR1 SCH 79797 в дозе 25 мкг/кг (группы «контроль + SCH» и «ЭС + SCH») либо эквивалентный объем 0,9 % раствора NaCl (группы «контроль» и «ЭС»).

Показатели синаптической пластичности оценивали на переживающих срезах гиппокампа, приготовленных через 2-3 недели после индукции ЭС (P41–P48). Протокол получения срезов и регистрации синаптических ответов приведён в разделах 2.2.3 и 2.5.

Критерии включения. В исследование включали клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте P27 на момент индукции, с массой тела, соответствующей возрастной норме, распределённых рандомизированно на четыре группы. Для групп «ЭС» и «ЭС + SCH» дополнительным условием включения являлось развитие ЭС не менее 5-й стадии по шкале Расина длительностью ≥ 60 мин. Для оценки синаптической пластичности использовали срезы гиппокампа с сохранной citoархитектоникой CA3–CA1 и стабильным базовым ответом.

Критерии не включения. Не включали животных с клиническими признаками заболеваний, ранее участвовавших в других экспериментальных протоколах, а также животных группы «ЭС»/«ЭС + SCH», у которых ЭС не достиг 5-й стадии или продолжался менее 60 мин.

Критерии исключения. Из исследования исключали животных в случае: гибели в ходе индукции ЭС или в постстатусном периоде; развития интеркуррентных заболеваний; нарушения протокола ежедневных инъекций (пропуск более одного введения); отклонения от заявленного временного окна регистрации (P41–P48); технических сбоев при получении или регистрации срезов.

Животных рандомизированно распределяли на четыре группы: «контроль» (без индукции ЭС, инъекции 0,9 % раствора NaCl; $n = 16$), «контроль + SCH» (без индукции ЭС, инъекции SCH 79797; $n = 16$), «ЭС» (индукция ЭС, инъекции 0,9 % раствора NaCl, $n = 20$) и «ЭС + SCH» (индукция ЭС, инъекции SCH 79797, $n = 18$).

На шестом этапе оценивали влияние фармакологической блокады PAR1 на поведенческие нарушения, развивающиеся у крыс после ЭС.

В исследовании использовали клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 27 дней ($n = 201$), распределенных рандомизированно на четыре группы аналогично пятому этапу: «контроль», «контроль + SCH», «ЭС» и «ЭС + SCH».

Протокол индукции ЭС и введения SCH 79797 (25 мкг/кг внутривенно, ежедневно в течение 10 дней) идентичны описанным в пятом этапе и приведены в разделе 2.4.3.

Поведенческое тестирование проводили через 2-3 недели после индукции ЭС (P41-P48); оно включало оценку пространственного обучения (водный лабиринт Морриса; $n = 35$), уровня тревожности и локомоторной активности («открытое поле»; $n = 51$), эмоциональной возбудимости (тесты на возбудимость; $n = 49$) и социального взаимодействия (тест «Перегородка»; $n = 66$). Протоколы поведенческих тестов приведены в разделе 2.6.

Критерии включения. В исследование включали клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте P27 на момент индукции ЭС, с массой тела в пределах возрастной нормы, распределённых рандомизированно на четыре группы. Для групп «ЭС» и «ЭС + SCH» – с развившимся ЭС не менее 5-й стадии по шкале Расина длительностью ≥ 60 мин. Поведенческое тестирование проводили в возрастном окне P41–P48; каждый тест выполнялся строго по стандартизованному протоколу (раздел 2.6).

Критерии невключения. Не включали животных с клиническими признаками заболеваний, ранее участвовавших в других поведенческих или фармакологических протоколах, с выраженными сенсорными или моторными нарушениями, способными исказить результаты тестирования, а также животных, у которых ЭС не достиг 5-й стадии или был короче 60 мин.

Критерии исключения. Из анализа исключали животных в случае: гибели в ходе эксперимента; развития интеркуррентных заболеваний; нарушения протокола введения препаратов; отказа от выполнения теста (неподвижность в водном

лабиринте Морриса, «замирание» в открытом поле, полный отказ от исследовательской активности); технических сбоев видеорегистрации и трекинга.

На седьмом этапе изучали влияние модификации поверхностного заряда мембраны нейронов вследствие фармакологической блокады нейраминидазы на синаптическую эффективность, кратковременную и долговременную пластичность, а также пВПСП-спайк-сопряжение в CA3-CA1 нейронных сетях гиппокампа. На переживающих срезах гиппокампа клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 21 день (P21, n = 40) проводили электрофизиологическую регистрацию пВПСП в условиях фармакологического ингибирования нейраминидазы – фермента, отщепляющего остатки полисиаловых кислот от гликопротеинов нейрональной мембраны. Использованный ингибитор, его концентрация и подробный протокол приведены в разделе 2.7.

Критерии включения. В исследование включали переживающие срезы гиппокампа толщиной 400 мкм, полученные от клинически здоровых самцов крыс линии *Wistar* в возрасте P21, с сохранной цитоархитектоникой области CA1 и коллатералей Шаффера, стабильными пВПСП амплитудой не менее 0,1 мВ и воспроизводимой входно-выходной характеристикой.

Критерии невключения. Не включали срезы с механическими повреждениями исследуемой области, отсутствием воспроизводимого пВПСП.

Критерии исключения. Из анализа исключали срезы, в которых: наблюдалась флуктуация базовой амплитуды пВПСП более чем на 20 % за время контрольной регистрации; возникали технические артефакты стимуляции или регистрации; нарушалась работа перфузионной системы или контроль температуры раствора.

2.2 Исследование влияния измененного ионного состава внеклеточной среды, имитирующего дисфункцию ГЭБ, на спонтанную активность нейронов гиппокампа в первичной культуре и переживающих срезах

Одним из последствий нарушения ГЭБ является изменение ионного состава межклеточной среды мозга: в зонах поражения она по концентрации ионов приближается к плазме крови [477, 643]. Подобные сдвиги способны модулировать импульсную активность нейронов и эффективность синаптической передачи, что в совокупности повышает возбудимость нейронных сетей гиппокампа.

Для моделирования последствий дисфункции ГЭБ контрольный внеклеточный раствор заменяли на модифицированную искусственную спинномозговую жидкость (МИСМЖ; таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Состав адаптированной ИСМЖ для имитации ранних последствий ГЭБ (в ммоль/л)

Состав	Концентрация, ммоль/л
NaCl	125,00
KCl	5,00
CaCl ₂	1,00
MgSO ₄	0,80
NaHCO ₃	24,00
NaH ₂ PO ₄	1,25
Глюкоза	11,00
pH	7,35

В качестве объекта исследований был выбран гиппокамп, что связано с его анатомической, физиологической и патологической особенностями [32, 186, 241, 307]. Аксоны пирамидных нейронов СА3 (коллатерали Шаффера) формируют возбуждающие синапсы на апикальных дендритах нейронов СА1 и служат

морфологической и функциональной основой для классических феноменов долговременной потенциации и депрессии [80, 419]. Вместе с тем тот же путь демонстрирует высокую склонность к гипервозбудимости, что делает его наиболее уязвимым в процессах эпилептогенеза [172].

Пирамидные нейроны поля CA3 объединены своими ветвящимися аксонами, формируя сеть, способную к произвольной генерации синхронных разрядов [387]. Коллатерали Шаффера проецируются в слой апикальных дендритов (*Stratum Radiatum*) и в лакунозно-молекулярный слой поля CA1. Синапсы характеризуются высокой плотностью AMPA- и NMDA-рецепторов и четко выраженными формами пластичности. Сигналы, приходящие из энторинальной коры (контралатеральная височная информация), сходятся со входом из области CA3, в результате чего участок CA1 функционирует как сравнивающее звено между «предполагаемыми» и «действительными» потоками информации [414].

2.2.1 Получение первичной культуры нейронов гиппокампа

Культура нервной ткани, предложенная еще в начале XX века, служит моделью для исследования процессов развития нервной системы, механизмов синаптической передачи и других ключевых нейробиологических явлений [234].

Клеточный состав культур различных отделов ЦНС отличается значительным разнообразием и во многом напоминает таковой *in situ*. Помимо нейронов, в них присутствуют клетки соединительной ткани (фибробласты), макрофаги, а также элементы нейроглии – астроциты и олигодендроциты. Считается, что в условиях культуры нейроны сохраняют способность к дифференцировке и по своей морфологии во многом воспроизводят структуру клеток соответствующих отделов ЦНС *in situ* [302, 407, 458].

Ранее высказывалось предположение, что в условиях культуры синапсы не формируются заново, а лишь сохраняются в уже существующем виде. Однако впервые образование *de novo* синаптических структур было зафиксировано при помощи электронно-микроскопических исследований в эксплантатах спинного

мозга эмбрионов крыс [101]. Установлено, что окончательное формирование синапсов завершается к 12-му дню культивирования.

Главным преимуществом культуры диссоциированных нейронов является ее высокая доступность для методов электрофизиологии, в первую очередь для *patch-clamp*-регистрации. В отличие от срезов мозга, в которых сохранены плотные тканевые связи и трехмерная структура, в диссоциированных культурах нейроны лежат в более разреженной среде. Это обеспечивает легкий доступ микропипетки к мембране отдельной клетки, уменьшая вероятность механических повреждений и повышая стабильность записи [64].

Кроме того, культивируемые нейроны отличаются высокой стабильностью: они могут поддерживаться на протяжении нескольких недель и даже месяцев, что позволяет исследовать не только острые эффекты фармакологических воздействий, но и долгосрочные процессы, такие как созревание синапсов, формирование дендритных шипиков или механизмы синаптической пластичности [189, 385, 632].

Для получения культуры диссоциированных нейронов гиппокампа использовали новорожденных крыс линии *Wistar*. Животных декапитировали, головной мозг помещали в минимальную среду Игла («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 20 ммоль/л буфера HEPES, 25 Ед/мл натриевой соли бензилпенициллина и 25 мкг/мл сульфата стрептомицина. Гиппокамп отделяли с помощью скальпеля и нарезали на поперечные полоски толщиной 1-2 мм. Ферментативную обработку производили 0,05 %-м раствором трипсина (тип II «Sigma-Aldrich», США) при комнатной температуре (23-25 °C) в течение 7 мин. Далее ткань дважды промывали раствором для культивирования следующего состава: минимальная среда Игла, лошадиная сыворотка – 10 %, инсулин – 6 мкг/мл, бикарбонатный буфер NaHCO_3 – 2,3 мг/мл, натриевая соль бензилпенициллина – 25 Ед/мл и сульфат стрептомицина – 25 мкг/мл. Суспензию клеток получали с помощью механической диссоциации набором пастеровских пипеток с диаметром кончиков, которые последовательно уменьшались. Клетки высаживали в чашку Петри, которая была предварительно обработана поли-L-орнитином. В стеклянное кольцо диаметром 6 мм, которое отграничивало площадь

посадки, наливали 200 мкл суспензии. Чашки Петри с суспензией помещали в инкубатор («Jouan», Франция) с контролируемым содержанием углекислого газа (5 % CO₂) в воздушно-газовой смеси и температурным режимом (37 °C) и постоянным пассивным увлажнением. На 3-и сутки культивирования для угнетения пролиферации глиальных клеток в среду добавляли цитозин-в-D-арабинофуранозид (5 мкмоль/л). Режим обработки культуры с помощью последнего подбирали для угнетения пролиферации глиальных клеток на такой стадии, когда количество астроцитов было достаточным для образования глиального монослоя. Повторную полную замену раствора для культивирования производили через 24 ч. На протяжении дозревания культуры нейронов дополнительно не обогащали факторами роста. Реактивы для приготовления клеточной культуры приобретали у фирмы «Sigma-Aldrich» (США).

2.2.2 Регистрация потенциалов действия от одиночных нейронов

Электрофизиологические исследования проводили на 16-22 день культивирования. Для эксперимента выбирали участок покровного стекла с относительно низкой плотностью клеток (2-5 нейрона в поле зрения диаметром 400 мкм, рисунок 2.2). Пипетки для регистрации изготавливали из тугоплавкого боросиликатного стекла.

С использованием метода *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока регистрировали и анализировали спонтанные потенциалы действия (ПД) в нейронах гиппокампа. Для нейронов измеряли параметры отдельного ПД (порог, амплитуду, длительность и амплитуду следовой гиперполяризации).

Контрольный внеклеточный раствор по ионному составу соответствовал межклеточной жидкости мозга крыс и содержал (ммоль/л): NaCl – 150; KCl – 3,4; CaCl₂ – 1; MgCl₂ – 1,3; глюкоза – 6; HEPES – 10; pH 7,3. Внутриклеточный раствор в *patch*-пипетках содержал (ммоль/л): калия глюконат – 155; EGTA – 0,5; MgCl₂ – 2;

HEPES – 10; MgATP – 5; pH 7,3. Эксперименты проводили при температуре 20-22°C. Замену растворов производили со скоростью 2 мл/мин.

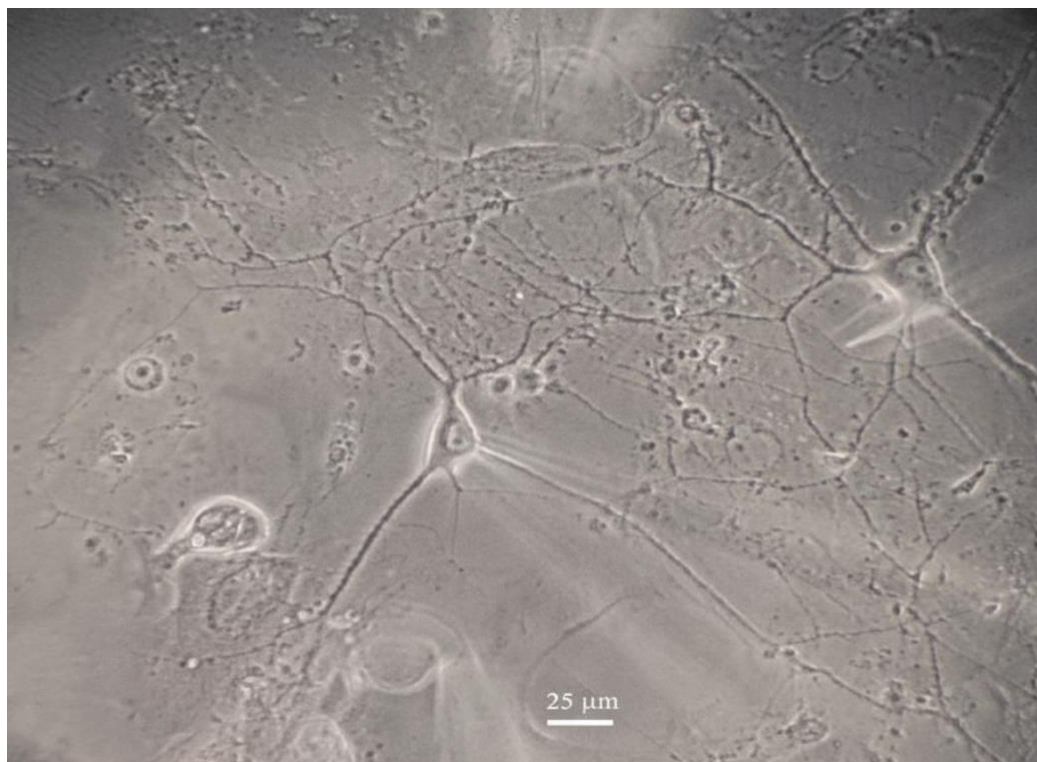


Рисунок 2.2 – Диссоциированная культура нейронов гиппокампа низкой плотности. Синаптические ответы регистрировали с помощью метода фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка».

Сопротивление пипетки для регистрации составляло 4-6 МОм. Пипетку заполняли внутриклеточным раствором. Фиксация потенциала поддерживалась за счет подачи разницы потенциалов на два хлорсеребряных электрода, один из которых индифферентный электрод, погруженный во внеклеточный раствор рабочей камеры, второй – во внутриклеточный раствор стеклянной микропипетки, которая контактирует с клеткой. По достижению плотного гигаомного контакта между микропипеткой и мембраной клетки, инициировали прорыв участка контактной мембраны, и внутриклеточная среда постепенно заменялась содержимым микропипетки. Таким образом данный метод позволяет контролировать внутриклеточный ионный состав.

2.2.3 Приготовление переживающих срезов гиппокампа

Переживающие срезы гиппокампа получали из мозга 21-дневных самцов крыс линии *Wistar*. Все манипуляции производили в ледяном аэрированном карбогеном (95 % O₂/ 5 % CO₂) растворе искусственной спинномозговой жидкости (ИСМЖ) следующего состава (ммоль/л): NaCl – 119; KCl – 3,5; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 1,3; NaHCO₃ – 26; NaH₂PO₄ – 1; глюкоза – 11; pH = 7,35. В день проведения эксперимента крыс анестезировали диэтиловым эфиром с последующей декапитацией гильотиной (ООО «ИнтерЛаб, СПб, Россия).

С помощью шпателя мозг извлекали из черепной коробки и помещали в чашку Петри, заполненную охлажденным оксигенированным раствором и фильтровальной бумагой на дне, таким образом, чтобы вентральная сторона мозга касалась бумаги. С помощью острого хирургического лезвия отсекали сначала мозжечок, а потом лобные доли (приблизительно 1/3 мозга). Далее мозг разворачивали на 180° и отрезали обе вентролатеральные части под углом 20-30°. Полученный фрагмент переносили из чашки Петри на фильтровальную бумагу для устранения лишней влаги (рисунок 2.3).

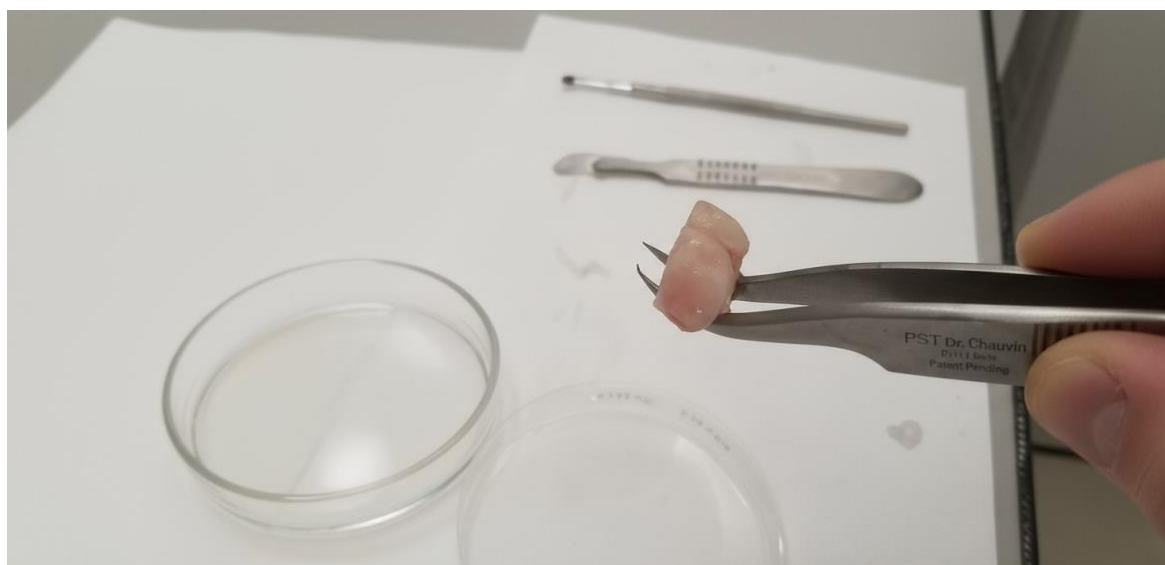


Рисунок 2.3 – Фрагмент мозга для изготовления комбинированных переживающих срезов гиппокампа.

Для фиксации мозга на тарелке вибратома (Vibroslice NVSL, «World Precision Instruments Inc.», США) использовали заранее приготовленный агаровый блок (3,7 % агар), приклеенный к поверхности. Несколько капель водостойкого клея наносили вблизи агарового блока и аккуратно размещали фрагмент мозга так, чтобы его каудальная часть находилась напротив блока, а вентральная – на тарелке (рисунок 2.4).

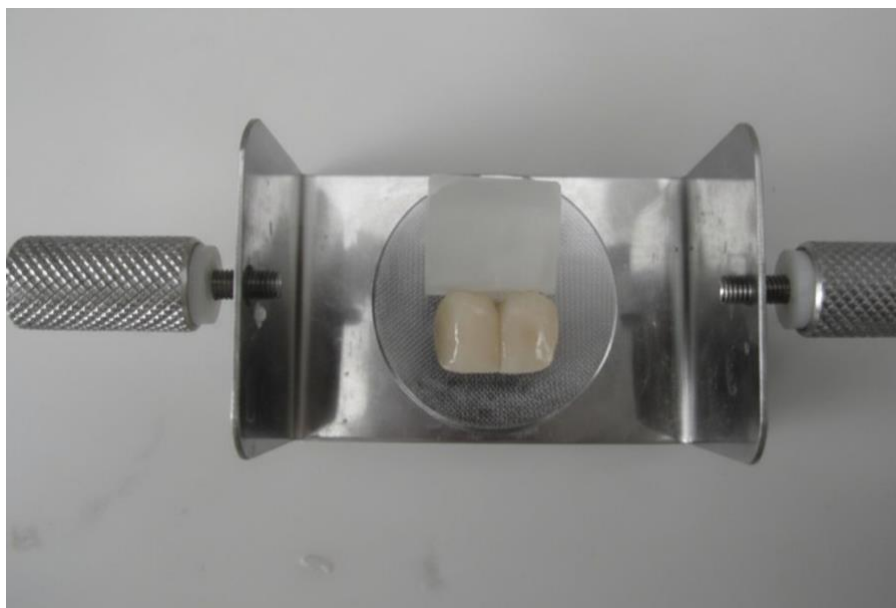


Рисунок 2.4 – Расположение полученного фрагмента мозга на тарелке вибратома

Далее выполняли сагиттальный надрез, тем самым разделяя полушария между собой и помещали тарелку с зафиксированным мозгом в охлажденную камеру вибратома, заполненную ледяным аэрированным раствором. С помощью вибратома нарезали поперечные срезы толщиной 500 мкм (рисунок 2.5).

Данная толщина срезов является оптимальной как для регистрации эпилептиформной активности, так и синаптической пластичности, поскольку при нарезке сохраняется достаточное количество нервных связей и нейронов, необходимых для генерации внеклеточной активности.

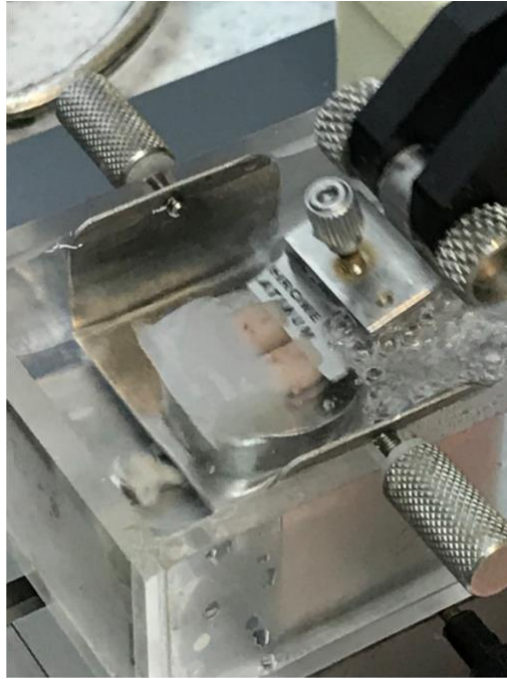


Рисунок 2.5 – Нарезка срезов гиппокампа на вибраторе

После нарезки срезы переносили в инкубационную камеру с помощью пипетки. Срезы содержали на специальной капроновой основе во избежание их травматизации (рисунок 2.6). Инкубацию срезов в растворе при температуре 28-30 °C продолжали 90 мин.

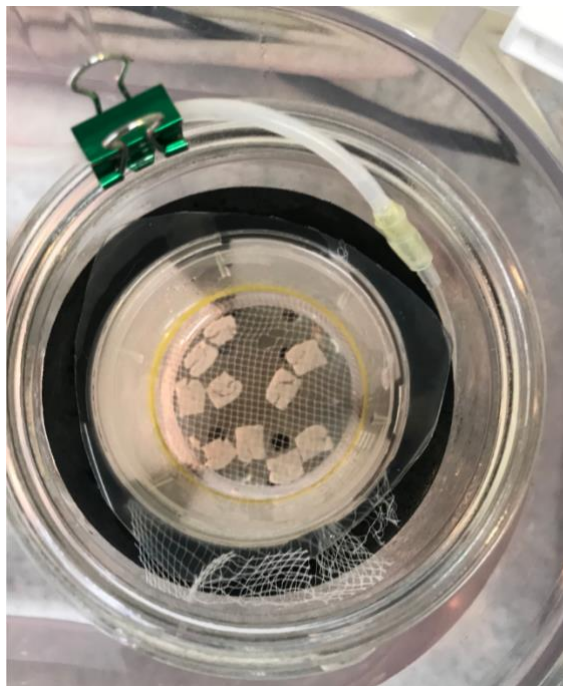


Рисунок 2.6 – Инкубация срезов в камере на водяной бане

2.2.4 Регистрация эпилептиформной активности

Эпилептиформную активность переживающих срезов гиппокампа регистрировали путем внеклеточного отведения полевых потенциалов в специально-оборудованной электрофизиологической установке. Для эксперимента, срез помещали в термостатическую камеру полностью погруженного типа (Warner Instrument Corp., США), где он находился под постоянной перфузией аэрированным раствором ИСМЖ со скоростью 2-4 мл/мин (28-32 °С). Популяционные потенциалы отводили от пирамидного слоя сом нейронов области СА1 гиппокампа (рисунок 2.7) с помощью стеклянных микроэлектродов (2-3 МОм), заполненных ИСМЖ, с использованием дифференциального усилителя (RK-400, Bio-Logic Science Instruments, Франция). Полученные записи оцифровывали на частоте 10 кГц с использованием аналогово-цифрового преобразователя («National Instruments», США) и сохраняли на компьютер с помощью программы WinWCP («Strathclyde Electrophysiology Software», ВБ).



Рисунок 2.7 – Типичное расположение регистрирующего электрода на поверхности среза гиппокампа

2.3 Оценка влияния раствора с повышенной осмолярностью на пароксизмальную активность мозга крыс линии *WAG/Rij*

В эксперименте использовали взрослых крыс самцов линии *WAG/Rij* ($n = 15$) весом 260-360 г. Взрослые животные данной линии характеризуются частыми абсансами со всплесками пик-волновой активности в 8-10 Гц. Исследуемая модель отвечает на аналогичную противоабсансную терапию, которую применяют среди пациентов [348, 349, 522]. Животных содержали в условиях 12-часового цикла день-ночь со свободным доступом к еде и воде. По окончании экспериментальных процедур животных выводили из опыта путем гильотинной декапитации под хлоралгидратным наркозом в дозе 400 мг/кг.

2.3.1 Процедура имплантации ЭЭГ-электродов

Для электрофизиологических исследований *in vivo* каждому животному имплантировали регистрационный электрод для дальнейшего отведения электроэнцефалограммы. В день операции животных анестезировали смесью кетамин/ксилазин (80/8 мг/кг) внутривбрюшинно. Кетамин – это анестетик, который вызывает состояние транса, мышечную ригидность, а также произвольные движения, которые выглядят как подергивания [409]. Для нивелирования такого эффекта кетамина на мышечный аппарат, использовали другой анестетик – ксилазин, который является седативным средством, анальгетиком и миорелаксантом [593]. Дозировка 80 мг/кг кетамина и 8 мг/кг ксилазина давала дополнительные 20 мин хирургической анестезии [480].

После введения смеси анестетиков (приблизительно через 2 мин) животное входило в состояние, подобное трансу с потерей болевой чувствительности. В этом состоянии с животным проводили дооперационные манипуляции: обривали область головы (начиная от носа до линии ушей), фиксировали на стереотаксе, дезинфицировали йодом обритую область головы крысы и для локального

обезболивания вводили 3-4 инъекции лидокаина по 0,1 мл в область кожи головы, где производили надрез. После проведения описанных процедур (15 мин от времени инъекции) проверяли рефлексы. Первыми показателями, что животное вошло в анестезию, являлось притупление рефлекса зажмуривания глаз. Однако, для того чтобы проверить как животное реагирует на боль, проводили диагностику рефлекса отдергивания задней лапы в ответ на раздражение (пинцетом сжимали палец или между пальцев). Если после введения смеси анестетиков все еще наблюдали данный рефлекс, то вводили дозу в два раза меньшую (2 мл/кг) и через 10-15 мин снова проверяли рефлекс отдергивания. Хирургические манипуляции производили только при полной уверенности в отсутствие рефлекса.

Процедура имплантации электродов вместе со временем, которое уходило на анестезию, занимала около 60-80 мин. Операцию проводили при комнатной температуре +23 °C.

Первым этапом операции было очищение участка черепа от покровных тканей. Для этого производили разрез стерильным скальпелем по центру головы начиная от средней точки между глаз до средней точки между ушей крысы. Стерильными зажимами захватывали края кожи и отводили в стороны. Далее очищали поверхность черепа от соединительной ткани так, чтобы на нём были видны точки брегмы и лямбды.

Вторым этапом была работа со стереотаксом M900 («David Kopf Instruments», США) и установление необходимых координат. Для начала устанавливали координаты брегмы, которые принимали за точку отсчета для установления и обозначения других координат. В местах обозначения необходимых точек производили краниальные отверстия в черепе крысы. Два электрода симметрично располагали в моторной коре, используя следующие координаты: 2 мм каудальнее брегмы (AP); 3,5 мм латеральнее средней линии (ML), и два микровинта из нержавеющей стали вкручивали в кость над мозжечком (AP = -11 мм, ML = 2,5 мм от брегмы), которые служили в качестве референтного и заземляющего электродов. Фиксирующие болты закручивали выше брегмы, а индифферентный электрод в месте лямбды (рисунок 2.8).

Третьим завершающим этапом была фиксация электрода и болтов специальным полимером – протакрилом-М, который в медицине используется для изготовления зубных протезов. Протакрил-М разводили раствором до образования пастообразной смеси, которую после наносили непосредственно на череп до полного застывания.

Края разреза зашивали шелковой нитью или склеивали медицинским клеем БФ-6. Далее животное еще около 40-60 мин находилось в состоянии транса, после чего действие анестезии постепенно угасало, и крыса возвращалась к нормальному состоянию.

Следует отметить, что гипотермия – одна из основных причин смертности крыс после проведения операции [480]. Поэтому после операции крысе обеспечивали надлежащие условия – животное находилось в сухом, теплом и изолированном месте.

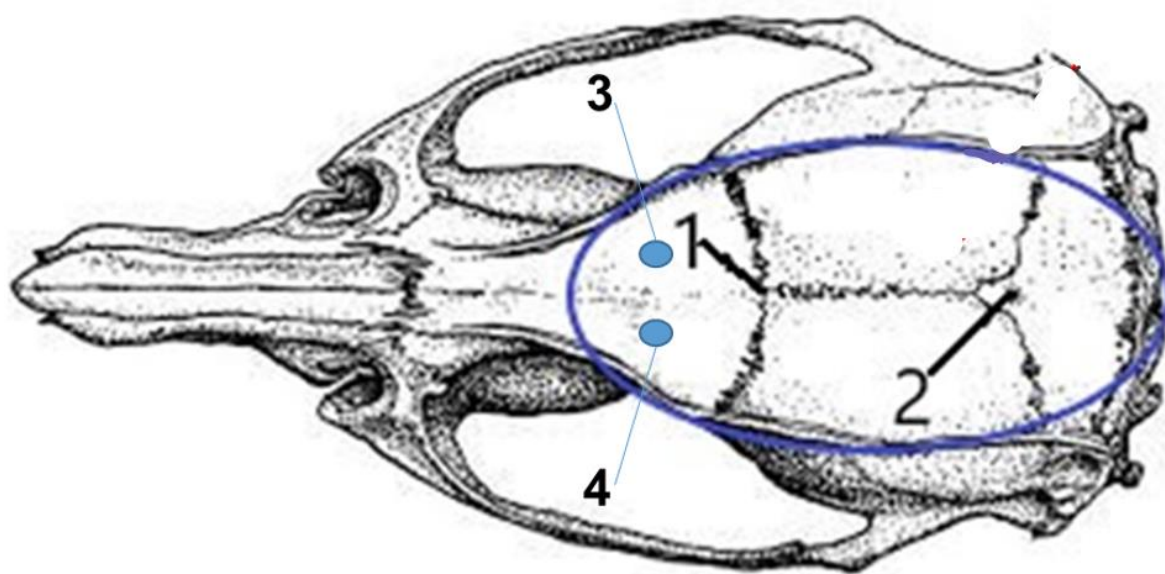


Рисунок 2.8 – Графическое изображение черепа крысы (вид сверху): 1 – брегма, 2 – лямбда, 3,4 – места фиксирующих болтов. Синим обозначено место скальпирования

2.3.2 Регистрация внеклеточных потенциалов *in vivo*

Для электрофизиологических регистраций, животных помещали в специально оборудованную камеру. В ходе эксперимента регистрировали спонтанную электрическую активность мозга в условиях естественного бодрствования, что позволяло фиксировать паттерны генерализованной пик-волновой активности, характерные для данной линии. Для отведения внеклеточных потенциалов использовали многоканальный усилитель переменного тока (AC-916, CWE Inc., Ardmore, PA, США), обеспечивающий одновременную запись сигналов высокой точности по нескольким каналам. Регистрацию проводили в условиях свободного поведения животного, что исключает влияние анестезии на электрофизиологические параметры. Сигналы усиливали в диапазоне 0,1-3000 Гц, дискретизацию проводили с частотой 10 кГц, что обеспечивало адекватное воспроизведение как медленных локальных полевых потенциалов, так и быстрых спайковых разрядов. На этапе предобработки данные фильтровали с использованием цифровых полосовых фильтров (0,3-100 Гц для локальных потенциалов, 300-5000 Гц при регистрации единичных спайков). Запись и накопление данных осуществляли с использованием специализированного программного обеспечения Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Spike2 обеспечивал одновременный мониторинг многоканальных сигналов в реальном времени, автоматическую маркировку артефактов (двигательные артефакты, мышечные потенциалы), а также экспорт полученных фрагментов для дальнейшего анализа. Для анализа нейронной активности применяли встроенные и пользовательские скрипты Spike2, позволяющие детектировать эпилептиформные разряды по заранее заданным критериям (амплитуда, длительность, частота повторений), а также проводить спектральный анализ ЭЭГ-регистраций. Дополнительно производили усреднение полей и построение карт распределения мощности по частотным диапазонам, что обеспечивало количественную оценку пик-волновой активности.

Использование данного метода позволило одновременно регистрировать как локальные корковые потенциалы, так и сеть-специфические паттерны пик-волновой активности, отражающие функциональное состояние кортико-таламических цепей. В совокупности полученные данные служили основой для оценки нейрофизиологических параметров эпилептогенности и их динамики под влиянием экспериментальных воздействий.

2.3.3 Дизайн эксперимента по применению гиперосмолярной терапии

Контрольные записи производили от свободно перемещающихся *WAG/Rij* крыс в течение 3-х часов в день на протяжении 4 дней. После последней контрольной регистрации и в дальнейшем в промежутках между тестами, воду в поилке заменяли на электролитный пероральный раствор на основе риса (раствор электролитов) или гиперосмолярный раствор, и записи производили с использованием того же протокола в последующие 6 дней. Раствор электролитов содержал: NaCl (3,4 г/л), KCl (1,3 г/л), $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (2,9 г/л) и раствор рисовых углеводов (40 г/л), содержащий натрий (90 мЭкв/л) и калий (20 мЭкв/л), с осмолярностью 270 мОсм. Гиперосмолярный раствор имел следующий состав: NaCl (90 ммоль), KCl (20 ммоль), CaCl_2 (5 ммоль), MgCl_2 (5 ммоль), глюкоза (20 ммоль) и сорбитол (10 ммоль), осмолярность 270 мОсм. Раствор электролитов был приобретен у компании Cera Products Inc. (Cera Lyte 90, Хилтон-Хед-Айленд, Южная Каролина, США). Все остальные реагенты были приобретены у компании Sigma (Сент-Луис, штат Миссури, США). Осмолярность растворов измеряли методом депрессии точки замерзания (криоскопически) на осмометре Osmomat 030 (Gonotec, Берлин, Германия).

2.4 Исследование роли тромбина в индукции эпилептиформной активности гиппокампа в модельных условиях дисфункции ГЭБ.

Протокол, имитирующий ранние последствия дисфункции ГЭБ *in vitro*, включал в себя модификацию раствора ИСМЖ (таблица 2.1) и добавление тромбина в концентрации 5 Ед/мл. Нарушение ГЭБ приводит к повышению концентрации тромбина в паренхиме мозга, что способствует возникновению воспаления, спонтанной нейронной активности и судорог [266]. Высокие концентрации тромбина способны вызывать апоптоз нейронов, а также опосредованную глутаматом их гибель вследствие активации NMDA-рецепторов и гипервозбудимости клеток [69, 207, 359]. Тромбин способен облегчать начало эпилептических приступов через активацию PAR1 на пирамидных нейронах СА3 области гиппокампа, имеющих более низкий порог для генерации судорог. Распространение спонтанной активности от СА3 до СА1 поля зависит от наличия целостных анатомических связей и преодоления усиленного торможения в зоне СА1 [357, 358]. При компретации ГЭБ происходит более, чем 200-кратное увеличение концентрации тромбина в мозге: со 100 пмоль до 25 нмоль [544]. Используемая нами концентрация (5 Ед/мл $\approx$ 25 нмоль) сопоставима с уровнем фермента в ликворе при внутрижелудочковом кровоизлиянии, при которой тромбин оказывает влияние на PAR1 без повреждения ткани.

2.4.1 Влияние тромбина на импульсную активность нейронов в культуре гиппокампа

Методика приготовления культуры нейронов гиппокампа не отличалась от описанной ранее (см. разд. 2.2.1). Спонтанные ПД в нейронах гиппокампа регистрировали с использованием метода *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока (см. разд. 2.2.2) при аппликации мИСМЖ с тромбином в концентрации 5 Ед/мл. Блокаду PAR1 и NMDA-рецепторов

осуществляли путем добавления во внеклеточный раствор их специфических антагонистов SCH 79797 («Tocris», ВБ) и AP-5 («Sigma-Aldrich», США) соответственно.

2.4.2 Влияние тромбина на спонтанную активность пирамидных нейронов переживающих срезов гиппокампа

Использовали две группы животных: контрольных ($n = 10$) и с эпилептическим статусом самцов крыс линии *Wistar* в возрасте 21 день ($n = 20$). На гиппокампальных срезах контрольных животных изучали влияние тромбина в мИСМЖ с целью моделирования ранних последствий нарушения ГЭБ в условиях *in vitro* (18 срезов). Срезы эпилептических животных использовали для сравнения их эпилептиформной активности с активностью контрольных срезов, индуцированной тромбином в мИСМЖ сразу после индукции ЭС (14 срезов) и через 2 недели в хронической фазе эпилептогенеза (14 срезов). Процедура моделирования эпилептического статуса подробно описана в разделе 2.4.3. Протокол регистрации эпилептиформной активности от поверхности срезов гиппокампа крыс подробно описан в разделе 2.2.4.

2.4.3 Литий-пилокарпиновая модель эпилептического статуса

Для проведения экспериментальных исследований по изучению патофизиологических механизмов эпилептогенеза, использовали пилокарпиновую модель височной эпилепсии. Ранее было показано, что системное введение высоких концентраций пилокарпина может приводить к нарушению ГЭБ и развитию генерализованных эпилептических приступов в результате попадания этого вещества в мозг [147].

Было показано, что внутрибрюшинное введение пилокарпина у крыс приводит к поведенческим и лимбическим изменениям, после которых через 1-2 ч

наступает развитие эпилептического статуса и нейродегенеративных процессов [573]. Данная животная модель адекватно воспроизводит височную эпилепсию человека, что обуславливает ее широкое применение в лабораторных исследованиях, включая тестирование противоэпилептических препаратов [327].

Пилокарпиновая модель имеет ряд важных особенностей:

- индукция острого ЭС при внутрибрюшинном введении возникает быстрее, в сравнении с другими распространенными моделями, например каинатной;

- наличие латентного периода с дальнейшим возникновением спонтанных повторных приступов [117, 326];

- возникновение широко распространенных повреждений головного мозга, которые локализуются в тех же областях, которые страдают у пациентов с височной эпилепсией, и связаны с реорганизацией сети нейронов в областях гиппокампа и парагиппокампа (например, прорастание мшистых волокон, потеря интернейронов и клеточная пролиферация гранулярных клеток являются явлениями, которые наблюдаются как у пациентов с височной эпилепсией, так и у животных, которым вводили пилокарпин [615]);

- приступы у животных, вызванные пилокарпином, как и у пациентов с височной эпилепсией, плохо поддаются контролю противоэпилептическими препаратами [120, 211].

Чаще всего в экспериментальных исследованиях используют два протокола введения пилокарпина: в высоких дозах (300-400 мг/кг) или низких дозах (40-60 мг/кг) в комбинации с хлоридом лития, который опосредует эпилептогенный эффект пилокарпина [402]. Препараты на основе лития широко используются в терапии психических расстройств, а также при лечении острых травм мозга и хронических нейродегенеративных расстройств [604]. Литий повышает чувствительность к пилокарпину через опосредованную активацию Т-лимфоцитов и моноклеарных клеток, что в свою очередь приводит к повышению уровня IL-1 β в плазме крови, тем самым изменяя проницаемость ГЭБ и способствуя увеличению поглощения пилокарпина паренхимой мозга. Также предварительное введение лития увеличивает высвобождение ацетилхолина и усиливает его влияние

на рецепторы M1 [301]. Было показано, что синдромы, индуцированные как высокими, так и низкими дозами пилокарпина в присутствии лития, проявляют сходство по поведенческим, метаболическим, нейropатологическим и электроэнцефалографическим характеристикам. Основное очевидное отличие заключается в повышенной чувствительности к пилокарпину у крыс, которым предварительно вводился литий [136]. Следует отметить, что уровень успешного развития тонико-клонических приступов и ЭС у животных, которым вводили хлорид лития, приближается к 100 %, по сравнению с данным показателем при использовании высокой дозы пилокарпина, который составляет приблизительно 60 % [213]. Преимуществами литий-пилокарпиновой модели является быстрая индукция, сходство с проявлениями на приступы пациентов и возможность изучения фармакорезистентной эпилепсии. Недостатком является побочное холинергическое воздействие на периферическую нервную систему [148]. Оба экспериментальных протокола, однако, связаны с высоким уровнем смертности животных.

Уровень смертности в пилокарпиновой модели остается очень высоким при дозе пилокарпина 400 мг/кг. Снижение дозы пилокарпина у крыс, получивших инъекцию лития, приводило к снижению смертности, но не вызывало снижения уровня успешности инициации ЭС [297]. Кроме того, смена очередности введения пилокарпина и лития не приводила к развитию приступов, хотя совместное введение агентов вызывало приступы у трех из пяти крыс. Важным фактором выступает временной параметр, поскольку пилокарпин инициирует развитие приступов лишь при его введении в течение 24 ч после инъекции лития. Так, у животных, получивших пилокарпин спустя 48 ч после введения лития, судорожные приступы не фиксировались [136].

В эксперименте использовали дальнейшую модификацию пилокарпиновой модели, предложенную Glien с коллегами [210]. В эксперименте пилокарпин вводили крысам однократно, в дозе 40 мг/кг, спустя 24 часа после инъекции лития. Продолжительность ЭС ограничивали 90 мин. По итогам наблюдений смертность составила 20 %, при этом у 80 % выживших животных развилась спонтанная

активность. Кроме того, когда у животных развивался ЭС, им вводили низкую дозу центрального мышечного релаксанта – ксилазина, который уменьшал выраженность клонических сокращений мышц, при этом не влияя на электрографические приступы [631]

В целях снижения смертности инициацию эпилептического статуса проводили путем многократного введения низких доз пилокарпина в комбинации с введением хлорида лития, как описано ранее [210].

Крысам внутрибрюшинно вводили хлорид лития (127 мг/кг, 1 мл/кг), растворенный в 0,9 % хлориде натрия. Через 20-22 ч после введения лития животным начинали вводить пилокарпин в 0,9 % растворе хлорида натрия с интервалом 30 мин с начальной дозой 40 мг/кг и последующими дозами 10 мг/кг до момента появления эпилептического статуса. Началом ЭС считали развитие у крыс V стадии эпилептических приступов по шкале Расина (таблица 2.2) [470].

Животных, которые не достигали V стадии эпилептических приступов при дозе пилокарпина 60 мг/кг, считали резистентными к инъекции пилокарпина и исключали из эксперимента.

Таблица 2.2 – Шкала оценки тяжести приступов в условиях экспериментальной эпилепсии

Стадия	Поведенческие проявления
0	Нормальное поведение животного
1	Гиперсаливация, беспокойность, повышенный уровень двигательной активности, усиление дефекации
2	Атипичные миоклонические судороги головы
3	Миоклонические судороги конечностей, туловища
4	Поза «кенгуру»: клонические судороги конечностей, тонические судороги туловища
5	Тяжелые тонико-клонические судороги с потерей позы

Через 60 мин после начала ЭС эпилептические приступы останавливали с помощью двух инъекций диазепама (по 20 мг/кг каждая) с интервалом 5 мин. Время начала ЭС варьировало в диапазоне от 26 до 150 мин (среднее время начала ЭС составляло $78,8 \pm 4,5$ мин). Для исследования эпилептиформной активности в острой фазе литий-пилокарпиновой модели животных использовали в первый день после индукции ЭС. Животных для хронических экспериментов выдерживали на протяжении 2-3 недель после ЭС. На 2-й день после ЭС производили инъекцию глюкозы (7 мг/кг).

Резистентных к пилокарпину крыс и тех животных, которые прошли все экспериментальные процедуры, выводили из опыта путем гильотинной декапитации под хлоралгидратным наркозом в дозе 400 мг/кг.

2.5 Исследование изменения синаптической пластичности CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа в экспериментальных условиях дисфункции ГЭБ и при блокаде PAR1

В исследованиях влияния экспериментальных условий дисфункции ГЭБ на синаптическую пластичность использовали 21-дневных самцов крыс линии *Wistar* (P21, $n = 60$). Методика приготовления переживающих срезов гиппокампа соответствовала описанной ранее (разд. 2.2.3). Для моделирования дисфункции ГЭБ применяли протокол, представленный в разделе 2.4, который заключается в сочетанном воздействии МИСМЖ и тромбина в концентрации 5 Ед/мл, что сопоставимо с его содержанием в ликворе при внутрижелудочковом кровоизлиянии, а также после церебральной ишемии [544].

При установлении роли PAR1 в процессах синаптической пластичности гиппокампа крыс с ЭС вводили селективный ингибитор SCH 79797 в концентрации 25 мкг/кг. ЭС индуцировали в литий-пилокарпиновой модели, описанной в разделе 2.4.3. Объектом исследования служили крысы линии *Wistar* в возрасте 27-28 дней. Перед началом эксперимента животных рандомизированно распределяли на 4 группы: «контроль», «ЭС», «контроль + SCH», «ЭС + SCH». Крысам групп

«контроль + SCH» и «ЭС + SCH» в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили SCH 79797 в дозе 25 мкг/кг; группы «контроль» и «ЭС» получали эквивалентный объем 0,9 % NaCl по той же схеме. Через 2 недели после индукции ЭС животных декапитировали. Срезы гиппокампа получали описанным ранее методом (см. разд. 2.2.3). Перфузию срезов осуществляли базовым раствором ИСМЖ, аэрированным карбогеном.

Для регистрации пластичности CA3-CA1 синапсов, переживающие срезы мозга помещали в регистрационную камеру электрофизиологической установки, где они находились в условиях непрерывной перфузии раствором со скоростью потока 2-4 мл/мин (30-32 °C). Отведение полевых потенциалов производили от радиального слоя поля CA1 гиппокампа с помощью усилителя переменного тока (PC501A, «Warner Instruments Corp.», США) с использованием стеклянных микроэлектродов (сопротивление 2-3 МОм), заполненных раствором ИСМЖ. Стимулирующий и регистрирующий электроды располагали на поверхности среза на расстоянии примерно 400 мкм друг от друга. Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) вызывали путем стимуляции коллатералей Шаффера на уровне поля CA3 гиппокампа с помощью концентрического биполярного стимулирующего электрода («FHC Inc.», США), подключенного к стимулятору с изолированным выходом (ISO-Flex, «A.M.P. Instruments», Израиль). Интенсивность стимуляции варьировала от 150 до 400 мкА. В начале каждого эксперимента определяли максимальный синаптический ответ путем постепенного увеличения силы тока от 25 до 800 мкА с шагом 25 мкА. Для регистрации базовых условий текущие значения стимуляции устанавливали на уровне 30 % от максимального ответа. Раздражение осуществляли каждые 20 с. Запись стабильной базовой линии производили в течение 10 мин.

Протокол стимуляции синаптической пластичности применяли после 10-20 мин записи стабильной базовой линии. В экспериментах по исследованию парной фасилитации (PPF), 2 стимула подавали на коллатерали Шаффера CA3-области гиппокампа с интервалом от 25, 50, 100, 200 и 300 мс. Величину PPF определяли как соотношение амплитуды второго ответа к первому (A_2/A_1). При

изучении посттетанической потенциации (ПТП) применяли протокол высокочастотной тетанической стимуляции, состоящий из 15 пульсов, подаваемых с частотой 50 Гц. Посттетанические ответы записывали с той же периодичностью, что и базовую линию, в течение 10 мин. Пластичность, зависящую от активности, оценивали путем измерения амплитуды пВПСП внутри стимуляционного трека, после каждого из 15 импульсов. Амплитуда наносимого раздражения оставалась постоянной на протяжении всего эксперимента.

В экспериментах по исследованию долговременных форм пластичности применяли высокочастотную тетаническую стимуляцию частотой 100 Гц (длительностью 1 с). Данный протокол генерировал кратковременную ПТП, за которой следовала долговременная потенция постсинаптических потенциалов, регистрируемая не менее 30 мин. ПТП анализировали в первые 5 мин после тетануса, ДВП оценивали путем усреднения синаптического ответа в течение 20-30 мин после стимуляции.

Электрофизиологические данные оцифровывали на частоте 10 кГц с использованием аналогово-цифрового преобразователя («National Instruments», США) и сохраняли на компьютер с помощью программы WinWCP («Strathclyde Electrophysiology Software», ВБ).

2.6 Оценка влияния блокады PAR1 на поведенческие нарушения после эпилептического статуса

Исследование проводили на 27-дневных крысах-самцах линии *Wistar*. Животных содержали в стандартных условиях при 12-часовом цикле «день/ночь», с постоянным свободным доступом к пище и воде.

Для проведения экспериментальных исследований, направленных на изучение патофизиологических механизмов эпилептогенеза и сопровождающих его изменений поведения, использовали классическую постстатусную модель, описанную в разделе 2.4.3.

На рисунке 2.9 представлена схема экспериментального протокола – от момента введения LiCl до формирования хронической стадии эпилептогенеза.



Рисунок 2.9 – Схема проведения экспериментального исследования и этапов формирования эпилепсии

Для исследования влияния блокады PAR1, через 15 мин после остановки эпилептических приступов, развившихся при инициации ЭС, крысам вводили внутривенно селективный блокатор SCH79797 (SCH) или соответствующий объем инъекции 0,9 % раствора хлорида натрия. SCH вводили в дозе 25 мкг/кг. Инъекции SCH (для экспериментальных групп) и 0,9 % NaCl (для контрольных групп) повторяли в течение 10 дней [83]. Установлено, что концентрация блокатора PAR1 25 мкг/кг является оптимальной для уменьшения некроза сердечных мышц, индуцированного экспериментальной ишемией, и для оптимального снижения отека мозга и улучшения состояния животных после травмы головного мозга [364, 537].

Поведенческие тесты проводили через 2-3 недели после индукции ЭС. Животные были распределены на четыре группы: «контроль», «контроль + SCH», «ЭС», «ЭС + SCH».

2.6.1 Водный лабиринт Морриса

Водный лабиринт Морриса является классической моделью для изучения пространственной памяти и процесса обучения у лабораторных грызунов, разработанной Ричардом Моррисом в 1984 году [35]. Тест широко используется для

изучения разнообразных нейрокогнитивных нарушений и механизмов их фармакологической коррекции [376].

Принцип метода состоял в размещении экспериментального животного на стартовых точках в разных углах бассейна с замутненной водой, откуда животное должно было доплыть до установленной подводной платформы. Поскольку платформа находилась в непрозрачной воде, животное не было способно использовать зрение и обоняние во время поиска. В ходе тестирования фиксировали время от старта до нахождения платформы. С каждой новой попыткой время сокращалось, а маршрут упрощался, что свидетельствует о формировании у животного представления о пространственном размещении платформы на основе зрительных ориентиров (рисунок 2.10).

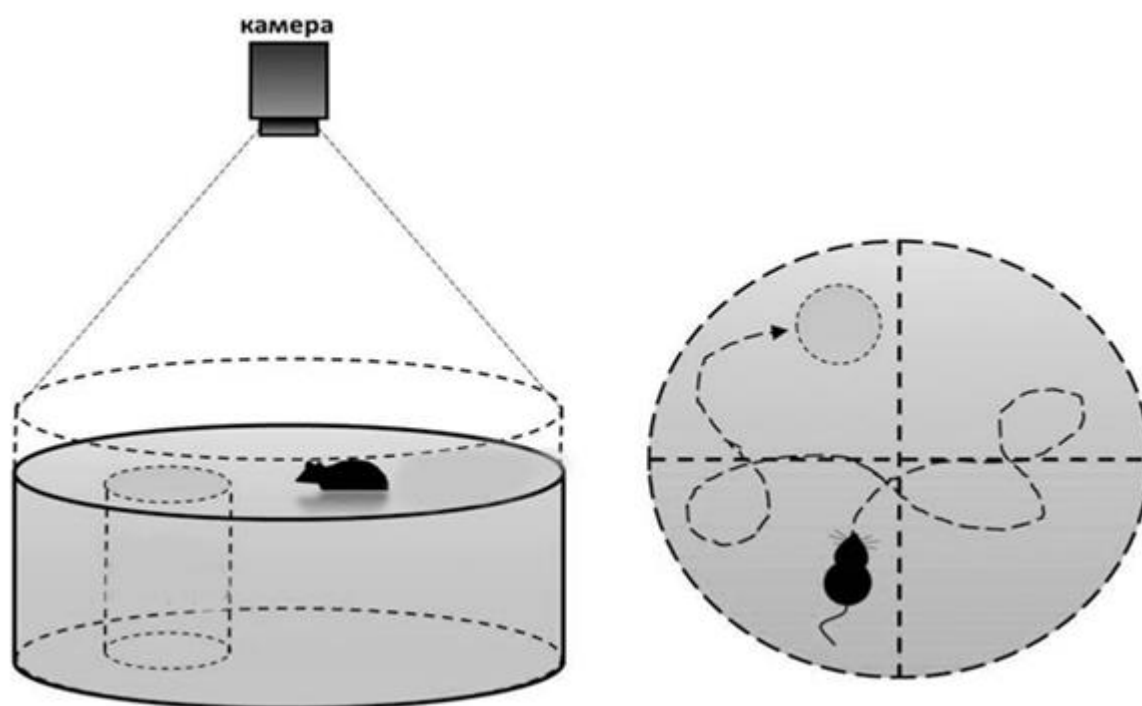


Рисунок 2.10 – Общая схема водного лабиринта Морриса (вид сбоку и вид сверху).

Пунктирной линией обозначена траектория движения животного [263]

Пространственное обучение зависит от скоординированного действия разных отделов мозга и систем нейромедиаторов, которые составляют функционально интегрированную нейронную сеть. Разрушение, также как и нарушение взаимосвязи областей мозга, вовлеченных в процессы

пространственного обучения (гиппокамп, базальные ганглии, базальные структуры переднего мозга, мозжечок, кора головного мозга), ухудшают качество обучения в водном лабиринте. С помощью этого теста оценивают динамику формирования животным ориентировочного навыка, стратегию поведения в ходе эксперимента, устанавливают поведенческие различия.

Тестирование проводили в круглом бассейне, диаметром 1,5 м и высотой 40 см. Воду предварительно подогревали до температуры 25-26 °С и окрашивали безопасным для животных пищевым красителем. Эксперимент состоял из одного тренировочного дня, в ходе которого животное выполняло задание по нахождению видимой платформы размером 0,1 м x 0,1 м, приподнятой над поверхностью воды, и четырех экспериментальных дней со скрытой подводной платформой [425]. Во время тренировки платформа находилась над водой, а каждое животное перемещали на нее и удерживали в течение 20 с. Далее крысу выпускали из четырех различных стартовых точек, предоставляя 60 с для поиска платформы. Если животное не успевало найти ее за отведенное время, экспериментатор направлял его, помогая достичь цели. Во время основной части исследования экспериментальное животное помещали на старт, при этом платформа находилась под водой. В тестовые дни каждую крысу запускали из восьми разных стартовых точек (одинаковых для всех животных). Время достижения платформы фиксировали и анализировали для каждой попытки. Для анализа поведения животных в тесте водного лабиринта Морриса были использованы следующие экспериментальные группы: $n = 11$ – контрольная группа, $n = 10$ – контроль + SCH, $n = 6$ – ЭС и $n = 8$ – ЭС + SCH.

2.6.2 Тест «открытое поле»

Методика «открытое поле» позволяет оценить уровень общей двигательной активности, исследовательского поведения и эмоционального состояния (в частности, тревожности и уровня стресс-реактивности) крыс в условиях новой для

них обстановки, что делает ее одним из базовых тестов для анализа адаптационно-поведенческих реакций животных.

Экспериментальная установка «открытое поле» представляла собой камеру размером 100×100 см с высотой стенок 30 см, условно разделенную на 25 равных квадратов (5×5). Квадраты подразделяли на две области: внешние (16 по периферии) и внутренние (9 в центре арены). Для оценки эмоционального состояния животных рассчитывали соотношение времени, проведенного в центральной части поля, ко времени, проведенному на периферии (рисунок 2.11).

Каждое животное помещали в один из углов установки и предоставляли возможность свободного передвижения в течение 5 мин. Освещение осуществляли двумя светодиодными лампами мощностью 60 Вт, расположенными на высоте 2 м. Видеозапись эксперимента вели при помощи IP-камеры, а обработка данных – с использованием программного пакета MATLAB. До начала тестирования животным предоставляли адаптационный период в новой обстановке для снижения уровня стресса. На протяжении эксперимента крысы имели свободный доступ к еде и воде. Основными параметрами оценки служило время, проведенное животным во внутренних и внешних секторах установки [158].



внешний периметр



внутренний периметр

Рисунок 2.11 – Структура установки «открытое поле» (Maze basics¹)

¹ Ссылка на электронный ресурс: <https://mazeengineers.com/>

Новое окружение, в котором оказывалось животное, вызывало две противоположные поведенческие тенденции: страх перед неизвестным пространством и стремление к исследовательскому поведению. Эти тенденции различаются по временной динамике и пространственным предпочтениям. В норме считается, что в течение пяти минут теста «открытое поле» животное преимущественно держится близко к стенкам арены – во внешнем периметре – и лишь изредка выходит во внутреннюю, «открытую» зону.

На рисунке 2.12 приведен пример анализа траектории движения контрольного животного в экспериментальной арене. Предполагается, что повреждение гиппокампа и других структур мозга, являющееся последствием эпилептического статуса, приведет к повышению локомоторной активности и уровня тревожности. Таким образом, крысы с эпилепсией должны демонстрировать увеличение общей длины пути (пройденной дистанции) и времени, проведенного во внутреннем периметре [244, 345].

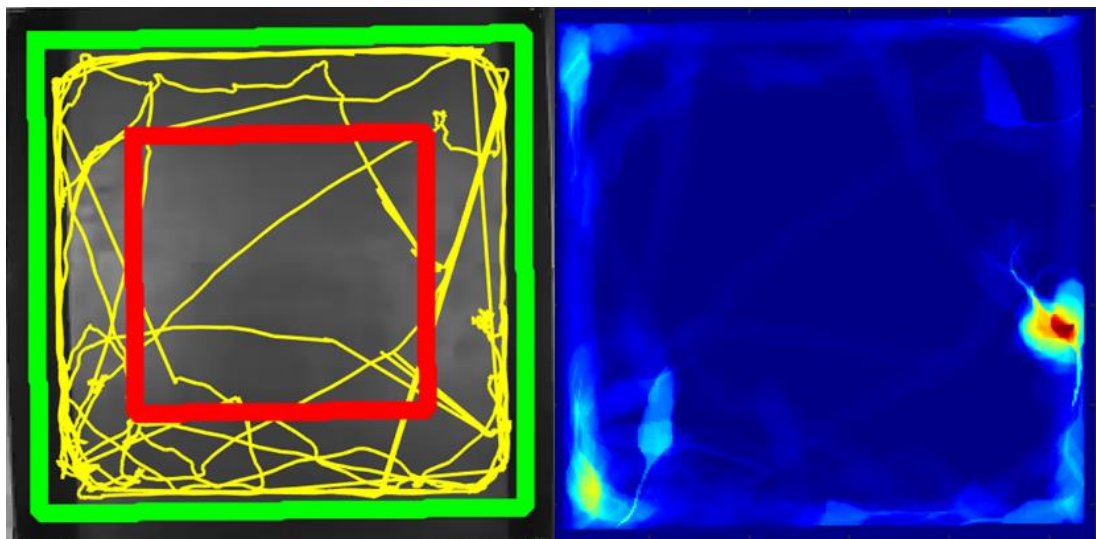


Рисунок 2.12 – Траектория движения и кумулятивная карта распределения времени местонахождения животного в установке «открытое поле» за 5 минут наблюдения

В ходе эксперимента оценивали общую длину пройденного пути и время, проведенное животным в центральной зоне поля. Для анализа поведения в тесте

«открытое поле» использовали следующие группы животных: $n = 13$ – контрольная группа, $n = 12$ – контроль + SCH, $n = 11$ – ЭС и $n = 15$ – ЭС + SCH.

2.6.3 Тесты на возбудимость

Исследование проводили на крысах линии *Wistar* в возрасте 27 дней. Животных распределяли на 4 группы: контрольная группа ($n = 15$), группа контроль + SCH ($n = 10$), животные с ЭС ($n = 10$), и животные с ЭС + SCH ($n = 14$). Всех животных тестировали в собственных клетках, что позволяло минимизировать реакцию на незнакомое окружение. Между экспериментальными процедурами животным предоставляли не менее 5 мин отдыха. Тесты проводили в порядке повышения интенсивности предполагаемой эмоциональной реакции, чтобы избежать влияния на результаты менее чувствительных методик. Используемая шкала тестов характеризовала спектр поведенческих реакции – от нейтральных до тревожных и агрессивных.

Поведенческие тесты на возбудимость проводили через 14 дней после индукции ЭС в течение 3 дней. Разработанные в лаборатории DeLorenzo тесты на оценку возбудимости [479] широко используются для проверки противоэпилептических соединений и могут служить поведенческими маркерами эпилептогенеза [90, 91, 464]. Эти тесты, в свою очередь, были заимствованы из комплекса обсервационных тестов функционального состояния животных, описанных в работе Moser и соавторов [398].

В настоящем исследовании нами были проведены три теста, считающиеся наиболее чувствительными при моделировании эпилепсии: тест на приближение предмета, тест на прикосновение и тест на поднятие животного.

Результаты каждого теста оценивали по соответствующей шкале.

Тест на приближение предмета использовали для определения характера реакции животного на неживой объект (например, стеклянную палочку), появляющийся в поле его зрения. Проведение теста заключалось в том, что предмет

в вертикальном положении медленно и постепенно приближали к мордочке животного, фиксируя особенности его реакции (таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Шкала оценки поведенческих реакций животных в тесте на приближение предмета

Реакция	Балл
нет реакции	1
исследовательская реакция	2
реакция избегания	3
реакция страха (замирание)	4
отпрыгивает от предмета	5
агрессивная реакция (нападение)	6

Тест на прикосновение использовали для оценки реакции животного на неожиданное тактильное раздражение. Проведение теста заключалось в аккуратном прикосновении к животному тупым концом карандаша, когда экспериментатор слегка дотрагивался до спины крысы в области основания хвоста (таблица 2.4).

Тест на поднятие животного использовался для оценки характера реакции крысы на подъем экспериментатором. Животное аккуратно поднимали, обхватив его рукой вокруг туловища, после чего фиксировали особенности поведенческой реакции (таблица 2.5).

2.6.4 Тест «перегородка»

Для определения влияния антагониста PAR1 на различные формы социального поведения у контрольных животных и крыс с ЭС использовали тест «перегородка» (*three-chamber test*), разработанный в лаборатории Кроули [146, 410].

Данный тест широко применяется для оценки особенностей социального поведения лабораторных животных.

Таблица 2.4 – Шкала оценки поведенческих реакций животных в тесте на прикосновение

Реакция	Балл
нет реакции	1
исследовательская реакция	2
реакция избегания	3
реакция страха (замирание)	4
вздрагивает и разворачивается к предмету	5
отпрыгивает от предмета	6
отпрыгивает с вокализацией	7

Таблица 2.5 – Шкала оценки поведения животных в тесте на поднятие

Реакция	Балл
нет реакции	1
дает себя поднять с вокализацией	2
сложно поднять, поворачивается по направлению к руке	3
при поднятии замирает	4
отпрыгивает от руки	5
агрессивная реакция, атакует руку	6

Идея теста основана на том, что, в соответствии с природной склонностью, крысы как высоко социальные животные стремятся проводить больше времени в присутствии другой особи, чем рядом с неживыми объектами.

Тестовая установка состояла из трех камер, разделенных между собой непрозрачными перегородками. Общая длина установки – 122 см, высота – 40,5 см.

Ширина центральной камеры составляла 25 см, а прилежащих боковых – по 47 см (рисунок 2.13).



Рисунок 2.13 – Схема установки теста «Перегородка». В боковых камерах расположены клеточные отсеки для незнакомых тестируемому крыс. В первой сессии теста одна из клеток остается пустой и используется в качестве неживого объекта. (**Maze basics²**)

По окончании первой сессии тестируемую крысу извлекали из установки, после чего в пустую клетку помещали новую, незнакомую особь (субъект 2).

В правой боковой камере находилась крыса того же возраста, пола и массы, что и испытуемое животное (социальный раздражитель). Ее помещали в круглую прозрачную клетку, что исключало возможность ее передвижения во время эксперимента, а также непосредственного контакта с тестируемой крысой.

В левой боковой камере располагали неживой объект, также помещенный в круглую прозрачную клетку (несоциальный раздражитель).

Тест состоял из двух частей (сессий). В первой сессии тестируемому животному предоставляли возможность в течение 10 мин исследовать тестовую установку, в которой в одной из боковых камер находилась клетка с незнакомой

² Ссылка на электронный ресурс: <https://mazeengineers.com/>

крысой (субъект 1), а во второй – пустая клетка, которую использовали в качестве неживого объекта.

Известно, что грызуны, как правило, стремятся проводить больше времени на общение с другим грызуном (общительность).

Оценивали время, проведенное животным с субъектом 1 и с объектом, а также общее количество переходов между камерами.

В соответствии с природной склонностью к социальному взаимодействию крысы стремятся проводить больше времени с новым субъектом 2 – реакция, отражающая социальную новизну.

Во второй сессии сравнивали время, проведенное экспериментальным животным с субъектами 1 и 2.

Дополнительно рассчитывали общее время социальной активности за две сессии – суммарное время взаимодействия с субъектом 1 в первой сессии и с субъектами 1 и 2 во второй.

Животные были распределены на 4 группы: контрольная группа ($n = 21$), группа контроль + SCH ($n = 20$), животные с ЭС ($n = 10$), и животные с ЭС + SCH ($n = 15$).

2.7 Оценка влияния модификации поверхностного заряда мембраны нейронов путем блокады нейраминидазы на синаптическую эффективность и пластичность сети CA3-CA1

Модуляция поверхностного заряда мембраны нейронов является важным механизмом регуляции возбудимости и межклеточных взаимодействий в нервной ткани. Существенный вклад в формирование отрицательного заряда клеточной поверхности вносят полисиаловые кислоты (ПСК), локализованные преимущественно на гликопротеидах и ганглиозидах наружного слоя мембраны. Благодаря своей анионной природе ПСК участвуют в множественных событиях клеточной сигнализации и существенно влияют на электрические свойства клеточной мембраны.

Регуляция уровня синализации осуществляется ферментом нейраминидазой – ключевым звеном в метаболизме сиаловых кислот.

Блокирование нейраминидазы специфическим блокатором N-ацетил-2,3-дегидро-2-деоксинейраминовой кислотой (NADNA) приводит к морфологическим изменениям в гиппокампе крыс, включая накопление остатков сиаловых кислот во внеклеточном пространстве и синаптогенез. Ранее влияние угнетения активности нейраминидазы *in vitro* на концентрацию ПСК оценивали путем определения наличия сиализированных гликопротеидов с помощью гистохимического лектинового окрашивания (рисунок 2.14).

Срез помещали в термостатическую камеру полностью погруженного типа (Warner Instrument Corp., США), где он находился под постоянной перфузией аэрированным раствором ИСМЖ со скоростью 2-4 мл/мин (28-32 °C). Популяционные потенциалы отводили от пирамидного слоя сом нейронов области CA1 гиппокампа с помощью стеклянных микроэлектродов (1-3 МОм), заполненных ИСМЖ, с использованием дифференциального усилителя (RK-400, Bio-Logic Science Instruments, Франция). Полученные записи оцифровывали на частоте 10 кГц с использованием аналогово-цифрового преобразователя («National Instruments», США) и сохраняли на компьютер с помощью программы WinWCP («Strathclyde Electrophysiology Software», ВБ).

Для эксперимента использовали срезы гиппокампа, полученные от 21-дневных самцов крыс линии *Wistar* по методике, описанной ранее (см. разд. 2.2.3).

Процедура регистрации базовых условий, индукция кратковременных и долговременных форм пластичности подробно описаны в разделе 2.5.

Эффективность преобразования возбуждающих постсинаптических потенциалов в популяционный спайк оценивали при одновременном отведении полевых потенциалов от радиального и пирамидного слоев области CA1 гиппокампа, что позволяло регистрировать полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) и популяционные спайки (ПС). Для оценки ВПСП-спайк передачи строили кривые зависимости амплитуды полевых

ответов от силы стимуляции, которую ступенчато увеличивали от 100 до 500 мкА с шагом 50 мкА.

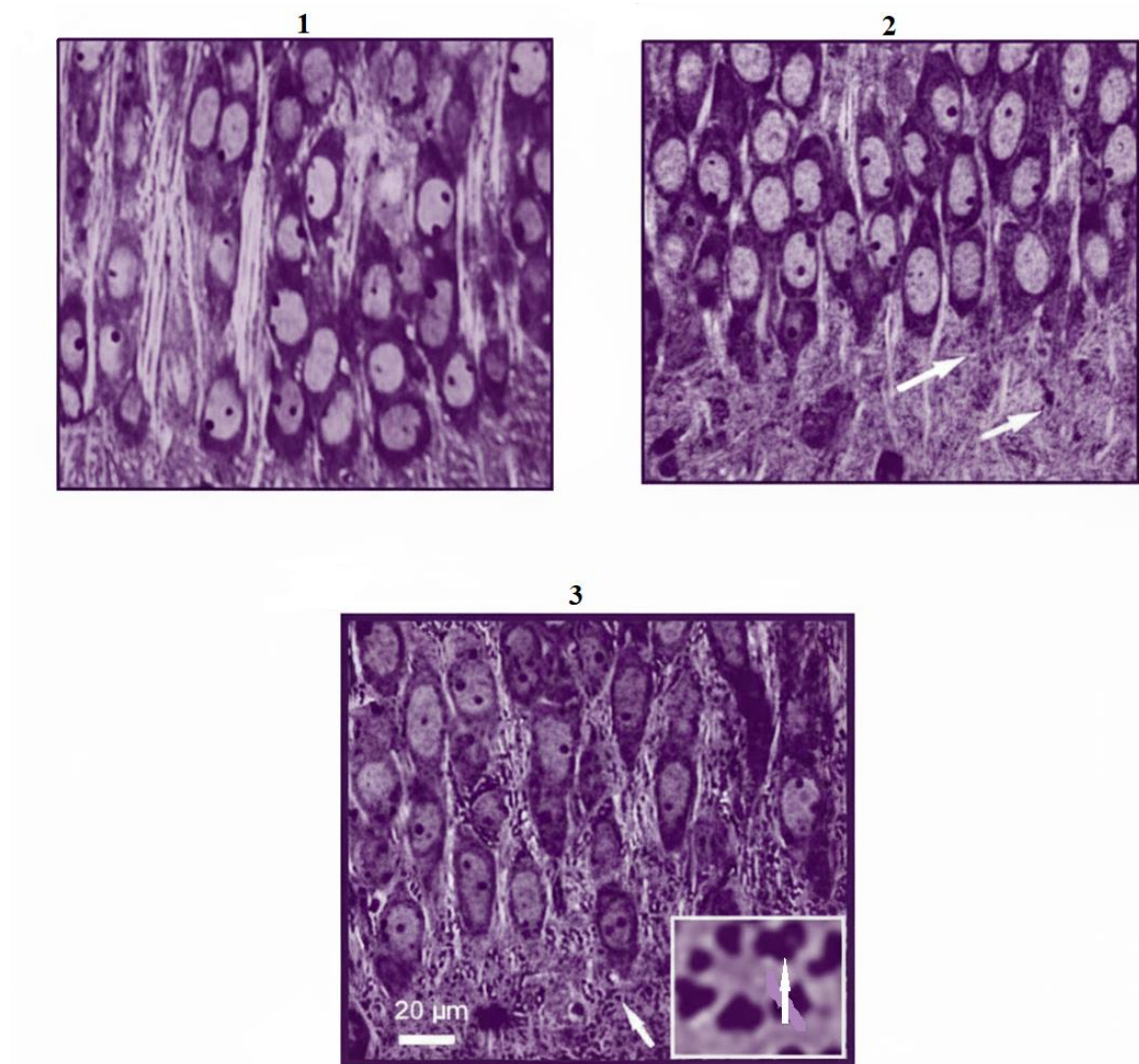


Рисунок 2.14 – Влияние преинкубации с NADNA на концентрацию ПСК в срезах гиппокампа. Световые микрофотографии области CA1. (1) Контрольный срез, окрашенный толуидиновым синим. (2) Контрольный срез, окрашенный комбинацией лектина SNA-I совместно с толуидиновым синим. (3) Срез, окрашенный лектином SNA-I совместно с толуидиновым синим, после обработки блокатором нейраминидазы. (2, 3) Связанный с пероксидазой хрена и DAB-окрашенный лектин SNA-I визуализируется как темные гранулы разных размеров (обозначены стрелками). Увеличенная в 10 раз область микрофотографии отображает гранулы [271]

На основе полученной кривой «вход-выход» интенсивность стимуляции для регистрации базовых условий устанавливали на уровне, соответствующем 30 % от максимальной амплитуды пВПСР, и подавали стимулы каждые 20 с. После записи стабильного фонового ответа продолжительностью 10 мин (в течение которой, в частности, определяли наклон кривых «вход-выход» для пред-тетанического контроля), применяли протокол индукции долговременной потенциации, состоящий из 100 импульсов с частотой 100 Гц. Посттетанические ответы регистрировали в течение 40 мин после индукции ДВП. Наклон кривых «вход-выход» определяли повторно через 40 мин после высокочастотной тетанической стимуляции.

2.8 Методы статистического анализа

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программ Clampfit («Axon Instruments», США), Origin 7.5 («OriginLab», США) и GraphPad Prism 8 («GraphPad», США). Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро-Уилка. Выбор статистических критериев определяли по характеру распределения данных. В случаях, когда распределение соответствовало закону Гаусса, применяли параметрические методы анализа: для сравнения двух независимых выборок использовали непарный t-критерий Стьюдента; для сравнения трёх и более групп – однофакторный или двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим post-hoc-тестом Тьюки или Сидака. Данные, полученные в результате параметрического анализа, представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). В случаях, когда распределение выборок отличалось от нормального, применяли непараметрические методы. В частности, при анализе амплитуды популяционных спайков в срезах гиппокампа для сравнения двух независимых групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Данные, полученные в результате непараметрического анализа, представлены как медиана и межквартильный размах ($Me [Q_1; Q_3]$). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Размеры выборок указаны в скобках при описании соответствующих результатов.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Исследование эффекта нарушения ионного гомеостаза вследствие дисфункции ГЭБ на активность нейронов гиппокампа

3.1.1 Эффект модифицированного раствора ИСМЖ на фоновую импульсную активность культивированных нейронов гиппокампа

Изучение влияния модифицированного раствора ИСМЖ, аналогичного по составу плазмы крови, на фоновую импульсную активность культивированных нейронов гиппокампа показало, что изменение ионного состава внеклеточной среды культивирования приводит к существенному повышению частоты спонтанных потенциалов действия в нейронах с фоновой генерацией, а также к появлению эпилептиформной тонической активности в нейронах без фоновой генерации (рисунок 3.1).

Нейронам с фоновой генерацией ПД была свойственна низкочастотная импульсная активность в контрольном внеклеточном растворе при мембранном потенциале, близком к потенциалу покоя. В группе этих нейронов при замене внеклеточного раствора на плазматический средняя частота ПД значительно возрастала на $65,1 \pm 0,4$ Гц ($n = 6$) на протяжении всего периода экспозиции.

Параллельно наблюдали незначительное, однако статистически достоверное снижение амплитуды ПД на $14,1 \pm 5,3$ % ($n = 5$; $p < 0,05$) и существенное снижение амплитуды следовой гиперполяризации ПД на $56,1 \pm 10,4$ % ($n = 5$; $p < 0,001$) при небольшом уменьшении разницы потенциалов на мембранах нейронов на $9,5 \pm 1,5$ % ($n = 5$; $p < 0,005$). Изменения ширины отдельных ПД не достигали статистически значимого уровня.

Замена ионного состава внеклеточной среды на плазматический вероятно оказывает воздействие на функционирование потенциал-управляемых мембранных каналов исследуемых нейронов. Так, повышение концентрации внеклеточного K^+ в

ИСМЖ кроме влияния на мембранный потенциал и синаптическую передачу, потенцирует в нейронах постоянный (персистентный) Na^+ ток [526].

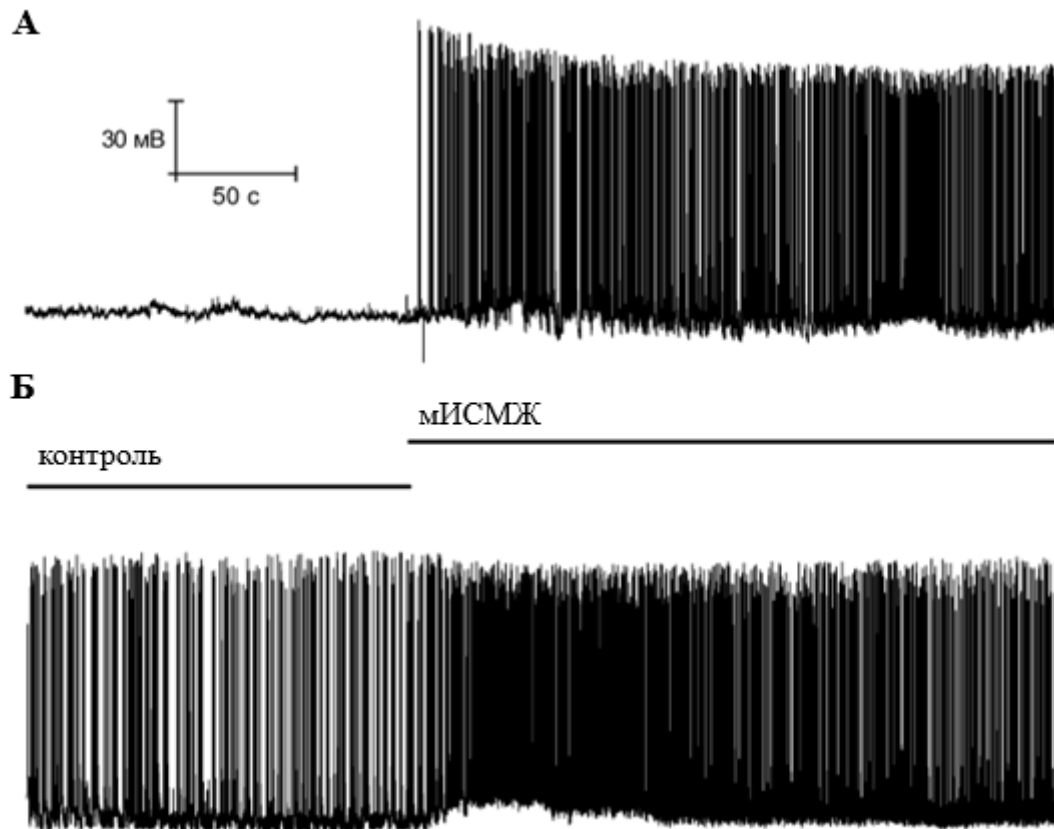


Рисунок 3.1 – Изменение импульсной активности в нейронах гиппокампа под воздействием модифицированного раствора искусственной спинномозговой жидкости. Типичные примеры регистрации мембранного потенциала одиночных нейронов в режиме фиксации тока в контроле и под влиянием модифицированного раствора искусственной спинномозговой жидкости (мИСМЖ). А – тип нейронов без фоновой импульсной активности; Б – тип нейронов с фоновой генерацией потенциалов действия

Последний в свою очередь способствует усилению синаптических потенциалов и повышает способность нейронов к повторной регулярной спайковой активности [530], что и наблюдалось в наших экспериментах. Замена ионного состава внеклеточной среды на плазматический ассоциирована также с

изменениями концентраций Ca^{2+} и Mg^{2+} , которые играют существенную роль в обеспечении стабилизации нейрональных мембран, в том числе и за счет экранирования поверхностных зарядов около потенциал-зависимых ионных каналов. В наших экспериментах изменения концентрации определенных ионов соответственно плазматическим нивелировали влияние друг друга, что способствовало сохранению экранирования отрицательных зарядов на мембранах нейронов относительно контрольного уровня. Значит, тоническая активность нейронов гиппокампа в модифицированной ИСМЖ вряд ли связана с изменениями концентрации двухвалентных катионов.

Таким образом, ионный дисбаланс, характерный для внеклеточной среды, эквивалентной по составу плазме крови, вызывает устойчивое повышение возбудимости нейронов гиппокампа.

3.1.2 Роль NMDA-рецепторов в изменениях спонтанной импульсной активности нейронов гиппокампа под влиянием модифицированного раствора ИСМЖ

Хорошо изучена роль активации NMDA-рецепторов в индукции эпилептического статуса, а также в повышении пароксизмальной нейрональной активности [322]. В данном контексте изменение ионного состава внеклеточной жидкости на плазматическую увеличивает способность NMDA-рецепторов к активации, в частности посредством снятия Mg^{2+} -блока, уменьшения разницы потенциалов на мембране и прочее. В наших экспериментах на фоне блокады NMDA-рецепторов в культуре нейронов гиппокампа экспозиция модифицированного раствора ИСМЖ не вызывала достоверного увеличения частоты ПД в группе нейронов с фоновой генерацией ПД. Однако в нейронах без фоновой генерации ПД специфический блокатор NMDA-рецепторов AP-5 в концентрации 20 мкмоль/л не влиял на частотную импульсную активность нейронов, которая возникала вследствие замены внеклеточного раствора на модифицированный ИСМЖ (рисунок 3.2).

Следовательно, под воздействием модифицированного раствора ИСМЖ NMDA-рецепторы вносят значительный вклад в формирование эпилептиформной тонической активности в гиппокампальных нейронах с фоновой генерацией ПД, тогда как их роль в обеспечении тонической активности в нейронах без фоновой импульсной активности оказывается несущественной. Такие различия могут быть обусловлены неоднородностью уровней экспрессии NMDA-рецепторов и их субъединичного состава в нейронах гиппокампа в дорсовентральном направлении [445].

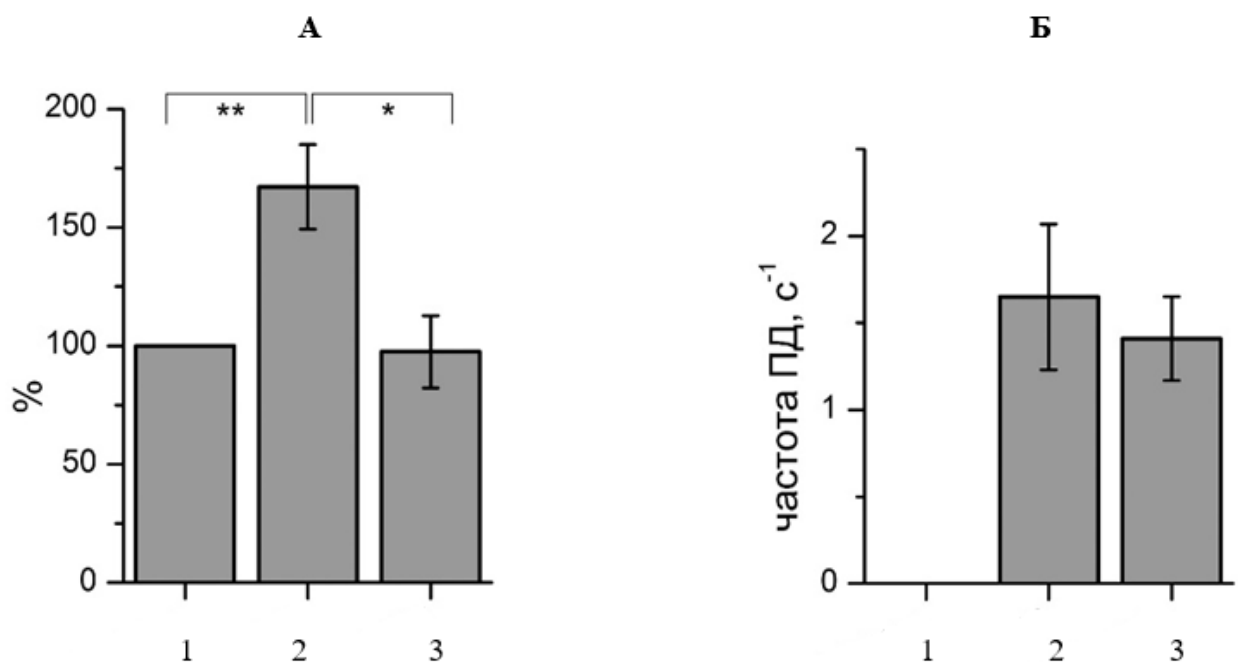


Рисунок 3.2 – Влияние активации NMDA-рецепторов на импульсную активность нейронов гиппокампа в модифицированном растворе искусственной спинномозговой жидкости (мИСМЖ). Результаты статистического сравнения значений средней частоты потенциалов действия (ПД) в нейронах с фоновой активностью (А) и в нейронах без фоновой активности (Б): 1 – в контроле; 2 – под действием раствора мИСМЖ; 3 – после блокады NMDA-рецепторов.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$

Известно, что в составе этих рецепторов вентрального гиппокампа, наиболее склонного к генерации пароксизмальной активности, доминируют GluN2B-

субъединицы, которые характеризуются низким сродством Mg^{2+} к каналу рецептора. И это, по-видимому, связано с большим участием NMDA-рецепторов в развитии эпилептиформной активности в нейронах вентрального гиппокампа по сравнению с дорсальным в среде с низким содержанием Mg^{2+} [448]. Вероятно, нейроны с фоновой генерацией ПД в представленном исследовании соответствуют нейронам из вентрального гиппокампа, что и демонстрирует высокую зависимость частоты их тонической импульсации от активации NMDA-рецепторов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы формирования тонической эпилептиформной активности при переходе к внеклеточной среде плазматического состава различаются в двух функционально неоднородных субпопуляциях нейронов гиппокампа. В нейронах с фоновой генерацией ПД ключевую роль играет активация NMDA-рецепторов – по-видимому, за счёт снятия Mg^{2+} -блока и повышенной представленности GluN2B-субъединиц, характерных для вентрального гиппокампа. В нейронах без фоновой активности индукция тонического разряда реализуется по NMDA-независимому механизму и, вероятно, связана с прямой модуляцией потенциал-управляемых каналов при изменении ионного состава внеклеточной среды.

3.1.3 Влияние модифицированного раствора ИСМЖ на активность пирамидных нейронов области CA1 переживающих срезов гиппокампа

Вначале устанавливали влияние модифицированного раствора ИСМЖ на активность пирамидных нейронов гиппокампа. Отведение полевых потенциалов производили от пирамидного слоя тел нейронов области CA1 переживающих срезов гиппокампа. Во время перфузии срезов базовым раствором ИСМЖ ЭФА отсутствовала во всех исследуемых срезах.

При замене стандартной перфузионной жидкости на модифицированный раствор плазматического ионного состава в срезах гиппокампа регистрировали ЭФА ($n = 17$, рисунок 3.3), которая сохранялась на протяжении всего периода воздействия.

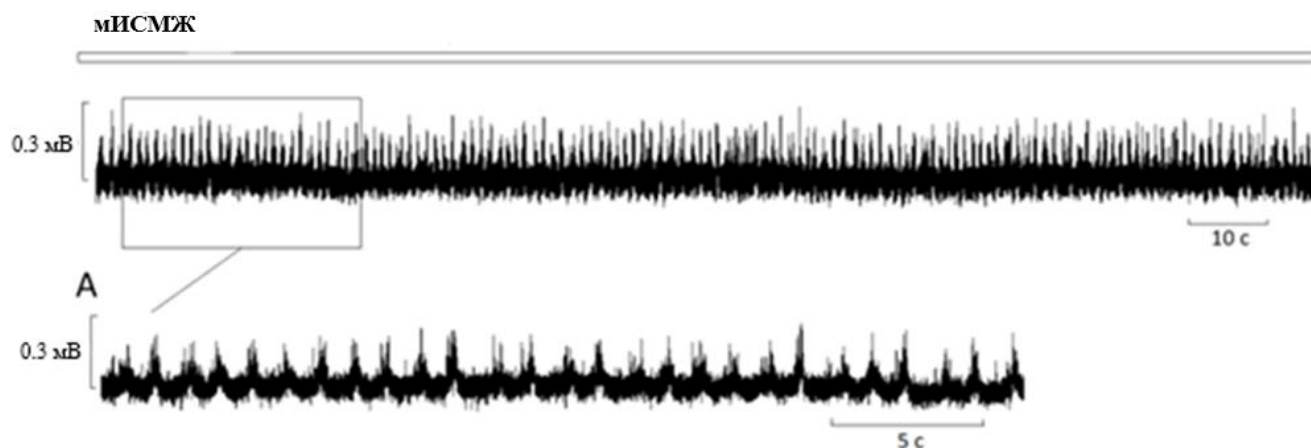


Рисунок 3.3 – Регистрация повторяющихся пароксизмальных событий в области СА1 гиппокампа во время перфузии модифицированным раствором искусственной спинномозговой жидкости. (А) Популяционные разряды

При аппликации мИСМЖ регистрировали ритмические популяционные всплески амплитудой $0,27 \pm 0,03$ мВ и частотой $1,34 \pm 0,11$ Гц. Всплески преимущественно возникали на пиках транзиторных сдвигов внеклеточного потенциала продолжительностью $320,0 \pm 11,8$ мс ($n = 10$; рисунок 3.3).

Первые проявления ЭФА возникали через 10-15 мин после поступления экспериментального раствора в камеру регистрации. Развитие стабильной активности происходило постепенно путем нарастания амплитуды и частоты пароксизмальных явлений.

Также при аппликации раствором мИСМЖ наблюдали низкоамплитудные всплески активности со значением амплитуды $0,10 \pm 0,03$ мВ и длительностью $936,0 \pm 50,0$ мс ($n = 7$; рисунок 3.4).

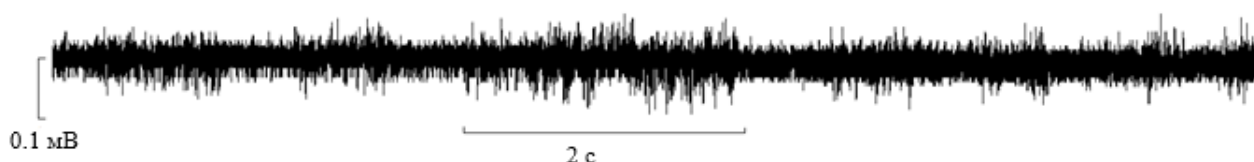


Рисунок 3.4 – Регистрация низкоамплитудной эпилептиформной активности в условиях перфузии модифицированным раствором искусственной спинномозговой жидкости в области СА1 гиппокампа

Также тестировали проявление ЭФА в области СА3 пирамидного слоя гиппокампа. Активность здесь имела более выраженный эпилептогенный профиль, что объясняется плотной сетью рекуррентных коллатералей пирамидных нейронов, обеспечивающих условия для самоподдерживающихся разрядов. В этой области генерировались спонтанные высокоамплитудные популяционные вспышки, нередко комплексные и многокомпонентные, однако они носили транзиторный характер. Известно, что поле СА3 служит пейсмекером эпилептических разрядов, которые впоследствии распространяются на область СА1.

Раствор плазматического ионного состава имеет подпороговые для индукции ЭФА концентрации ионов, однако суммарное их действие способно формировать условия повышенной возбудимости нейронных сетей и приводить к пробуждению ЭФА в срезах гиппокампа. Так, повышение концентрации K^+ до 5 ммоль/л вызывает длительную деполяризацию мембран нейронов за счет снижения электрохимического градиента, что усиливает спонтанную возбудимость и снижает порог генерации потенциалов действия. Кроме того, повышение K^+ во внеклеточном растворе усиливает персистентные натриевые токи [526], что способствует длительному поддержанию состояния деполяризации мембраны. Подобный эффект приводит к увеличению амплитуды синаптических потенциалов и повышает способность нейронов к повторным синхронным разрядам, что является основным условием для возникновения сетевых эпилептиформных паттернов [530].

Снижение концентрации Mg^{2+} до 0,8 ммоль/л ослабляет потенциал-зависимый блок NMDA-рецепторов при потенциалах покоя, что способствует избыточному входу Ca^{2+} через эти каналы. Это приводит к усилению глутаматергической передачи и повышению возбудимости нейронных сетей, создавая условия для возникновения гиперсинхронных разрядов [265].

Одновременное уменьшение концентрации Ca^{2+} до 1 ммоль/л сопровождается не только снижением уровня входа кальция в клетки, но и вторичными изменениями в работе мембранных каналов. Было показано, что понижение концентрации Ca^{2+} увеличивает натриевую проницаемость мембраны и

изменяет работу Ca^{2+} -зависимых механизмов торможения, что приводит к дополнительной деполяризации мембраны и нарушению процессов пресинаптического контроля высвобождения медиатора [240]. Это, в свою очередь, снижает эффективность как быстрых, так и медленных форм тормозной нейротрансмиссии.

Дополнительно уменьшение концентрации двухвалентных катионов Mg^{2+} и Ca^{2+} , которые в нормальных условиях частично экранируют отрицательные поверхностные заряды мембраны, ведет к облегчению активации потенциал-зависимых натриевых и кальциевых каналов [265]. Таким образом, мембрана нейрона становится более лабильной к деполяризации, что усиливает вероятность возникновения разрядов даже при незначительных возмущениях со стороны синаптического входа.

Комбинированное действие описанных сдвигов формирует проэпилептический фон, при котором усиливаются как внутриклеточные, так и синаптические механизмы генерации возбуждения. В условиях такой среды в срезах гиппокампа начинают наблюдаться спонтанные эпилептиформные разряды, отражающие дестабилизацию процессов сетевой интеграции возбуждающих и тормозных влияний [502].

3.2 Оценка эффектов осмолярных сдвигов на судорожную активность на системном уровне у животных с абсансной эпилепсией

Основным методом лечения эпилепсии выступает фармакотерапия с использованием ПЭП. Несмотря на высокую клиническую эффективность ПЭП у большинства пациентов [319], доступность современных противоэпилептических средств остается ограниченной во многих регионах мира [111, 356, 431]. В подобных условиях терапия чаще всего базируется на препаратах старого поколения, таких как фенobarбитал и фенитоин [111]. Эти средства проявляют эффективность при парциальных и вторично генерализованных приступах, однако не дают положительного результата в отношении абсансных форм эпилепсии. В то

время как этосуксимид, вальпроат натрия и ламотриджин доказали свою эффективность при абсансах [209], доступ к этим препаратам в ряде стран затруднен. Это обуславливает необходимость поиска альтернативных, экономически доступных и легко реализуемых терапевтических подходов.

Одним из таких направлений является использование рисового электролитного раствора, применявшегося в качестве регидратационной терапии. Было показано, что он способен уменьшать частоту резистентных абсансных приступов у пациентов с семейной дизавтономией [429]. Данный метод представляется перспективным благодаря простоте применения и низкой стоимости, что потенциально делает его доступным в странах с ограниченными ресурсами.

Была выдвинута гипотеза о том, что противосудорожный эффект рисового электролитного раствора в значительной мере определяется его гиперосмолярностью. Настоящее исследование было направлено на проверку этой гипотезы с использованием классической экспериментальной модели абсансной эпилепсии у животных.

Абсансная эпилепсия характеризуется спонтанным возникновением серий двусторонних синхронных комплексов «пик-волна», сопровождающихся кратковременным нарушением состояния сознания. Известно, что даже относительно короткие эпизоды генерализованных «пик-волна»-разрядов связаны с тонкими изменениями когнитивной активности и внимания [98].

В рамках проведенного исследования для оценки противосудорожного действия электролитного/гиперосмолярного раствора анализировали показатели эпилептиформной активности у крыс линии *WAG/Rij*. В частности, регистрировали изменения частоты появления, пиковой частоты и продолжительности комплексов «пик-волна» до и после начала терапии электролитным/гиперосмолярным раствором (рисунок 3.5).

В группе, получавшей электролитный раствор, число SWD было меньше. Следует отметить, что у крыс частота SWD выше (8-10 Гц), чем у человека. Влияние электролитного раствора проявлялось только в снижении частоты

разрядов в час, тогда как морфология, длительность и пиковая частота оставались неизменными.

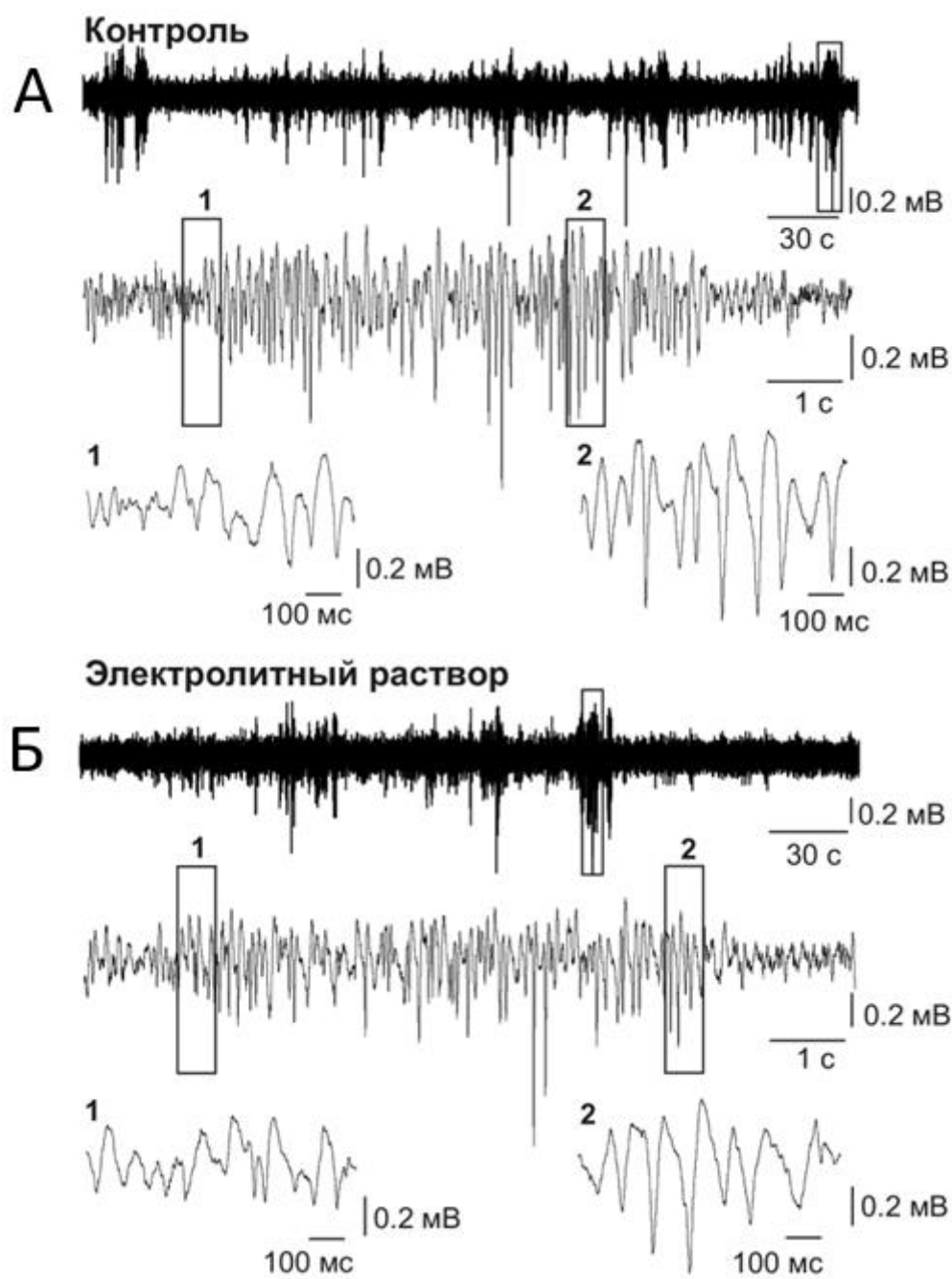


Рисунок 3.5. – ЭЭГ-записи комплексов «пик-волна» (SWD) в левой моторной коре крыс линии *WAG/Rij*: до (А) и после 4-дневного потребления электролитного раствора (Б). Отмечается уменьшение числа разрядов в час при сохранении их морфологии, длительности и пиковой частоте

В контрольных условиях количество комплексов «пик-волна» (SWD) варьировало у разных животных от 12 до 54 эпизодов в час, среднее значение составило $24,7 \pm 1,2$ события в час ($n = 15$). При этом у каждой особи показатели частоты возникновения, пиковой частоты и длительности SWD оставались стабильными на протяжении четырех дней контрольных регистраций. Среднее значение пиковой частоты комплексов SWD в контроле составила $6,9 \pm 0,6$ Гц, средняя длительность – $7,6 \pm 2,6$ с.

В первой серии экспериментов ($n = 8$) после контрольных регистраций животные получали электролитный раствор на протяжении 6 дней.

Анализ ЭЭГ-показателей выявил постепенное снижение числа SWD в час в период потребления электролитного раствора (до $33,0 \pm 2,9$ % от исходного уровня, $p < 0,01$). Пиковая частота ($7,2 \pm 0,4$ Гц) и длительность разрядов ($6,4 \pm 1,5$ с) статистически значимо не отличались от контрольных значений. Поведенческих нарушений и признаков обезвоживания у животных не наблюдали.

После шести дней потребления электролитного раствора животные вновь получили доступ к воде из поилки. После возврата к обычной воде в течение недели частота SWD вновь увеличивалась и составляла $88,7 \pm 3,7$ % от исходных значений (рисунок 3.6).

Известным является тот факт, что осмолярность представляет собой один из ключевых факторов, регулирующих возбудимость нейронов [510]. Во второй серии экспериментов крысы ($n = 7$) потребляли гиперосмолярный физиологический раствор с осмолярностью, соответствующей электролитному. В течение шести дней наблюдали постепенное снижение числа SWD в час, однако этот эффект был менее выраженным, чем в группе с электролитным раствором ($p < 0,05$). Сравнительный анализ показал небольшое, но статистически значимое различие между действием электролитной и гиперосмолярной терапии ($p = 0,01$; ANOVA для повторных измерений). Пиковая частота SWD составила $7,9 \pm 0,3$ Гц, средняя длительность – $5,6 \pm 0,8$ с; эти показатели не отличались от контрольных. Через неделю после прекращения потребления гиперосмолярного раствора частота SWD восстанавливалась до контрольного уровня ($91,4 \pm 3,7$ % от исходного, рисунок 3.6).

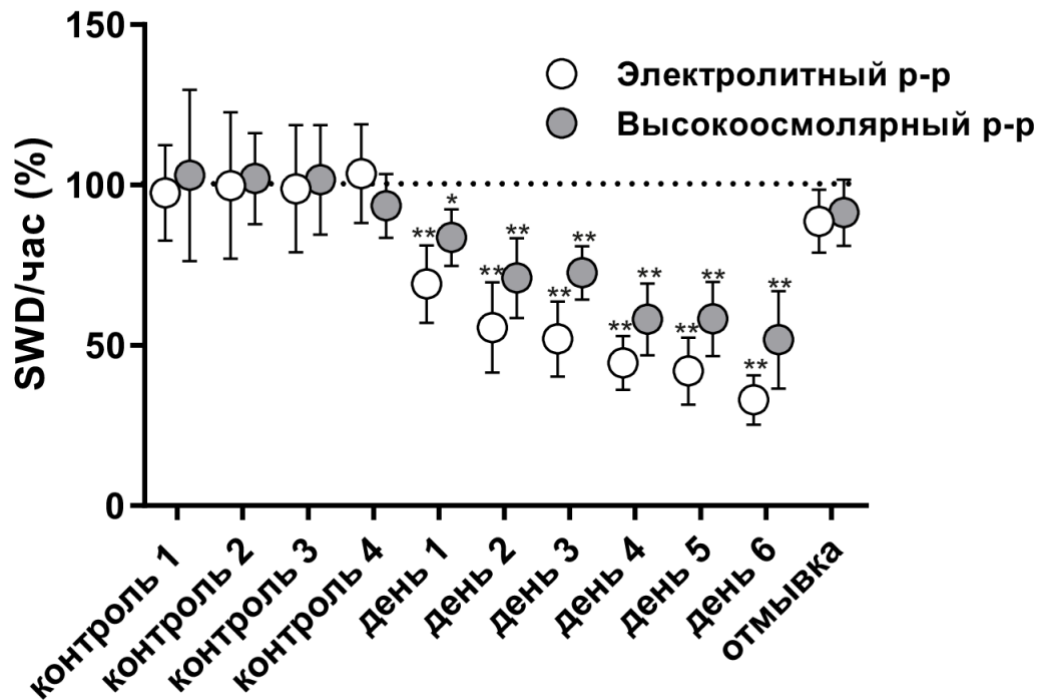


Рисунок 3.6 – Динамика изменения частоты комплексов «пик-волна» (SWD) у крыс линии *WAG/Rij* при потреблении электролитного и гиперосмолярного растворов. Сводный график демонстрирует влияние электролитного (белый) и гиперосмолярного (серый) растворов на частоту SWD, зарегистрированных в моторной коре крыс линии *WAG/Rij*. Все данные и статистический анализ представлены относительно среднего контрольного уровня, полученного в течение четырех дней регистрации до начала электролитной терапии. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Статистический анализ выполнен с использованием критерия Уилкоксона для парных выборок,

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Основные результаты настоящего исследования можно суммировать следующим образом:

- электролитная/гиперосмолярная терапия на генетической модели абсансной эпилепсии у крыс приводила к быстрому началу и постепенному подавлению частоты комплексов «пик-волна» (SWD);

- лечение электролитными/гиперосмолярными растворами не вызывало изменений пиковой частоты и длительности SWD по сравнению с контрольными записями;
- прекращение любой из терапий сопровождалось быстрым восстановлением частоты и длительности SWD до исходных значений.

Предполагается, что выявленные эффекты в значительной степени опосредованы осмотическими изменениями во внеклеточной среде. При увеличении концентрации солей в потребляемом растворе возрастает осмотическое давление, и клетки теряют способность столь же эффективно извлекать воду, как при гипоосмолярных условиях. Даже при одинаковом объеме выпитой жидкости в контрольных и экспериментальных условиях эффективная гидратация снижается вследствие возросшей осмолярности внутренней среды.

Взаимосвязь между осмотическим давлением и судорожной готовностью неоднократно отмечалась в предыдущих научных исследованиях. К клиническим примерам повышения судорожной предрасположенности вследствие гипергидратации относятся: быстрая регидратационная терапия, синдром диализного дисбаланса, компульсивная полидипсия и синдром неадекватной секреции антидиуретического гормона [39]. Напротив, методы, направленные на дегидратацию или снижение уровня жидкости в организме, демонстрировали протективное действие против неспровоцированных эпилептических приступов [39, 224, 245].

Экспериментальные исследования на животных показали, что снижение внеклеточной осмолярности усиливает возбудимость нейронов и индуцирует эпилептиформные разряды [38, 53, 113], тогда как повышение внеклеточного осмотического давления подавляет спонтанные припадки, вызванные повышением $[K^+]_{нар.}$ в срезах гиппокампа [564], и блокирует потенциалы действия в миелинизированных сенсорных волокнах у крыс [374]. Существует несколько возможных механизмов, объясняющих влияние осмолярности на активность нейронов. Один из них заключается в том, что гиперосмолярные условия вызывают уменьшение объема клеток, что приводит к снижению эфферентной передачи, то

есть проведению токов через внеклеточное пространство [286]. Кроме того, сдвиги осмолярности способны изменять механическую активность ионных каналов мембраны, что объясняется механочувствительными механизмами их регуляции [321, 446, 489, 490].

Оба экспериментальных раствора снижали количество SWD у крыс линии *WAG/Rij*, однако электролитный раствор демонстрировал более выраженный эффект. Это оказалось неожиданным, поскольку осмолярность и концентрации Na^+ и K^+ ионов, участвующих в генерации потенциала действия, были одинаковыми в обоих растворах. Более того, в «гиперосмолярный» раствор дополнительно вводили Ca^{2+} (5 ммоль) и Mg^{2+} (5 ммоль) – двухвалентные катионы, известные своим противосудорожным и тормозным действием на активность нейронных сетей [265]. Различия между эффектами электролитного и гиперосмолярного растворов могут объясняться различием в составе углеводов: рисовые углеводы и тринатрийцитрат обладают большей гипертоничностью по сравнению с растворами, содержащими глюкозу и сорбитол. Мембраны, обладающие высокой проницаемостью для глюкозы и сорбитола, облегчают поступление молекул воды в клетку по диффузионному градиенту, что в итоге приводит к эффекту, противоположному гиперосмолярному.

Другими диетическими подходами, применяемыми при лечении эпилепсии, являются кетогенная диета и диета с низким гликемическим индексом [193, 324, 408, 600]. Обе они обладают высокой клинической эффективностью и применяются для терапии различных форм эпилепсии, включая абсансные приступы. Однако механизмы их действия в настоящее время остаются недостаточно изученными.

Таким образом, настоящее исследование показало, что применение электролитной терапии может рассматриваться в качестве вспомогательного метода лечения абсансной эпилепсии. Полученные результаты подтверждают клинические наблюдения [429] и демонстрируют воспроизводимость эффекта электролитного раствора на модели абсансных приступов у животных, что создает основу для дальнейшего изучения клеточных механизмов данного явления. Наши данные согласуются с выводами Ochoa [429], показавшего эффективность электролитной

терапии у пациентов с абсансной эпилепсией. Применение рисовых электролитных растворов для лечения рефрактерных форм абсансов может представлять собой экономически доступный и результативный метод терапии. Вместе с тем следует подчеркнуть, что ни один из растворов не обеспечивал полного подавления комплексов «пик-волна», и в настоящее время отсутствуют данные о том, будет ли подобное диетическое вмешательство эффективным при других типах эпилептических приступов.

3.3 Влияние тромбина в модифицированном ИСМЖ на эпилептиформную активность нейронов гиппокампа крыс

С использованием модельных условий дисфункции ГЭБ в культуре нейронов гиппокампа, изучали влияние модифицированного раствора ИСМЖ на характер импульсации гиппокампальных нейронов и роль сывороточного белка тромбина в регуляции эпилептиформной импульсной активности данных нейронов. Прозэпилептическое действие тромбина реализуется прежде всего посредством активации PAR1. Механизмы PAR1-ассоциированной тромбиновой регуляции нейрональной активности вовлекают разнообразные внутриклеточные сигнальные системы модуляции функций ионных каналов и регуляции синаптической пластичности [273, 357]. В качестве потенциальной мишени активации данной сигнализации рассматривается функция NMDA-рецепторов [228, 322, 432, 453], однако определение их роли в развитии тромбин-индуцируемой эпилептиформной импульсной активности в нейронах гиппокампа при нарушении ГЭБ требует дальнейших исследований.

Целью данного этапа работы являлось установление влияния модифицированного раствора ИСМЖ на параметры импульсной активности нейронов гиппокампа и на их способность генерировать ЭФА, а также определение роли сывороточного белка тромбина в регуляции импульсной активности этих клеток в модельных условиях, имитирующих последствия нарушения ГЭБ.

3.3.1 Влияние тромбина на импульсную активность культивированных нейронов гиппокампа и роль PAR1 в регуляции частотной генерации потенциалов действия

В группе нейронов без фоновой генерации ПД добавление в модифицированный раствор ИСМЖ тромбина стимулировало повышение частоты ПД в нейронах гиппокампа до $2,67 \pm 0,37$ Гц ($n = 6$); частота ПД возрастала на $61,8 \pm 11,5$ % ($p < 0,05$) по сравнению с таковой в растворе модифицированной ИСМЖ. Последующая блокада тромбиновых рецепторов PAR1 с помощью специфического ингибитора SCH 79797 (10 мкмоль/л) вызывала существенное (почти вдвое) снижение частоты ПД в тех же нейронах гиппокампа до $1,46 \pm 0,2$ Гц. В таких условиях дальнейшее блокирование глутаматных NMDA-рецепторов с помощью их специфического антагониста AP-5 (20 мкмоль/л) приводило к незначительному снижению частоты ПД до $1,14 \pm 0,24$ Гц (рисунок 3.7).

Представленные результаты согласуются с данными предыдущих исследований [266, 358], подтверждая проэпилептическое действие тромбина через стимуляцию тонической электрической активности нейронов и эффективность антагонистов PAR1 в угнетении эпилептиформной нейрональной активности в гиппокампе. Известно, что активация NMDA-рецепторов стимулирует индукцию эпилептиформной нейрональной активности в гиппокампе [243, 479]. По данным многочисленных исследований эти рецепторы становятся мишенями активации каскадов PAR1-зависимой специфической модуляции синаптической пластичности [228, 322, 453], характерной для нейронов эпилептического очага. Таким образом, в данной серии экспериментов определяли их вклад в формирование эпилептиформной тонической активности в исследуемых нейронах.

Как указано ранее, при блокаде NMDA-рецепторов в культуре нейронов гиппокампа экспозиция раствора модифицированной ИСМЖ не вызывала достоверного увеличения частоты ПД в группе нейронов с фоновой импульсной активностью. При этом добавление в раствор модифицированной ИСМЖ тромбина значительно увеличивало частоту ПД на $117,3 \pm 25,6$ % ($n = 6$; $p < 0,005$), а

дальнейшая аппликация SCH 79797 (10 мкмоль/л) восстанавливала частоту ПД почти до контрольного уровня (не найдено достоверных отличий при статистическом сравнении частоты ПД в растворе мИСМЖ и после блокады PAR1).

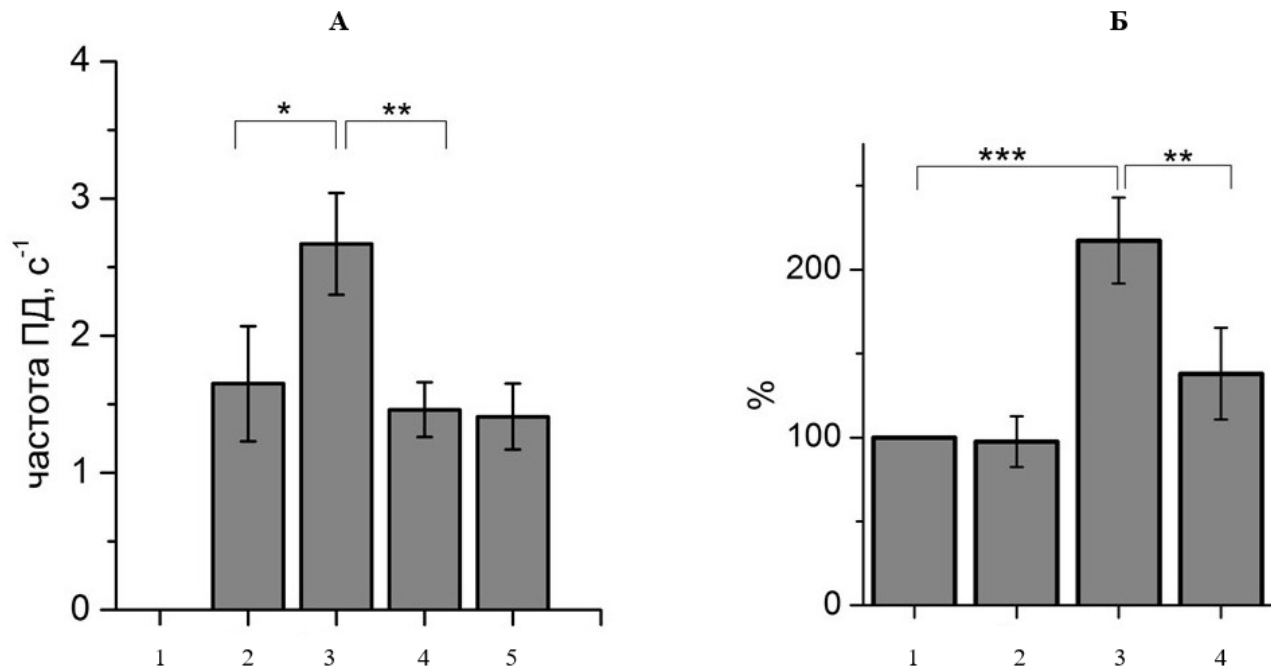


Рисунок 3.7 – Влияние модифицированного раствора ИСМЖ (мИСМЖ) и тромбина на частоту генерации потенциалов действия в нейронах гиппокампа при блокаде NMDA-рецепторов. А – результаты статистического сравнения значений средней частоты потенциалов действия (ПД) в нейронах без фоновой активности; Б – статистическое сравнение значений частоты ПД, нормализованных к таковым в контроле (100 %) в нейронах с фоновой импульсной активностью. 1 – контроль; 2 – действия раствора мИСМЖ; 3 – действие тромбина с мИСМЖ; 4 – действие блокатора PAR1 SCH 79797 в присутствии тромбина в растворе мИСМЖ и после блокады NMDA-рецепторов их антагонистом AP-5.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

Таким образом, в наших экспериментах на фоне блокады NMDA-рецепторов проэпилептическое действие тромбина практически полностью нивелировалось антагонистом PAR1. Очевидно, что тромбин-зависимая регуляция импульсной активности нейронов гиппокампа задействует механизмы, отличные от модуляции

глутаматных NMDA-рецепторов в этих клетках. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными на срезах мозга о независимости тромбин-индуцированного эпилептогенеза от активации NMDA-рецепторов [69]. Хотя существует большое количество сведений о PAR1-зависимой модуляции синаптической передачи и нейрональной пластичности в мозге посредством активации глутаматных рецепторов этого типа [63, 207, 322, 357, 582]. Очевидным является несоответствие между вызванным тромбином повышением синаптической активности и развитием эпилептиформной импульсной активности в нейронах гиппокампа.

Таким образом, изменение ионного состава внеклеточной нейрональной среды до значений, соответствующих плазме крови, стимулирует возникновение эпилептиформной тонической активности в культивированных нейронах гиппокампа, что, вероятно, ассоциировано с модуляцией потенциалуправляемых мембранных каналов и возрастанием персистентного Na^+ -тока. Глутаматные NMDA-рецепторы вносят существенный вклад в формирование эпилептиформной тонической активности в гиппокампальных нейронах с фоновой генерацией ПД, тогда как в нейронах без фоновой импульсной активности их роль оказывается несущественной. Тромбин в сочетании с ИСМЖ выражено усиливает эпилептиформную импульсную активность в нейронах гиппокампа как с фоновой генерацией ПД, так и без таковой; его проэпилептиформное действие реализуется преимущественно через PAR1. При этом тромбинозависимая регуляция импульсной активности нейронов гиппокампа вовлекает механизмы, отличные от модуляции NMDA-рецепторов в этих клетках.

3.3.2 Влияние тромбина на спонтанную активность пирамидных нейронов переживающих срезов гиппокампа

Для моделирования последствий более серьезных повреждений мозга и проницаемости ГЭБ к белкам плазмы крови, проводили аппликацию тромбина совместно с модифицированным раствором ИСМЖ.

Ранее было показано, что добавление 10 Ед/мл только тромбина не приводило к нейронной активации в поле СА3 гиппокампа крыс в возрасте 6-15 дней [273]. Тромбин вызывал ЭФА в присутствии 7,2 ммоль/л K^+ или 100 мкмоль/л глутамата во внеклеточном растворе [357]. В нашем исследовании аппликация тромбина совместно с модифицированным ИСМЖ индуцировала ЭФА в пирамидном слое области СА1 гиппокампа. Электрографическими коррелятами продолжительной эпилептиформной активности были клонические популяционные всплески. Частота ритмических колебаний составляла $3,39 \pm 0,35$ Гц, амплитуда соответственно $0,66 \pm 0,09$ мВ ($n = 18$; рисунок 3.8).

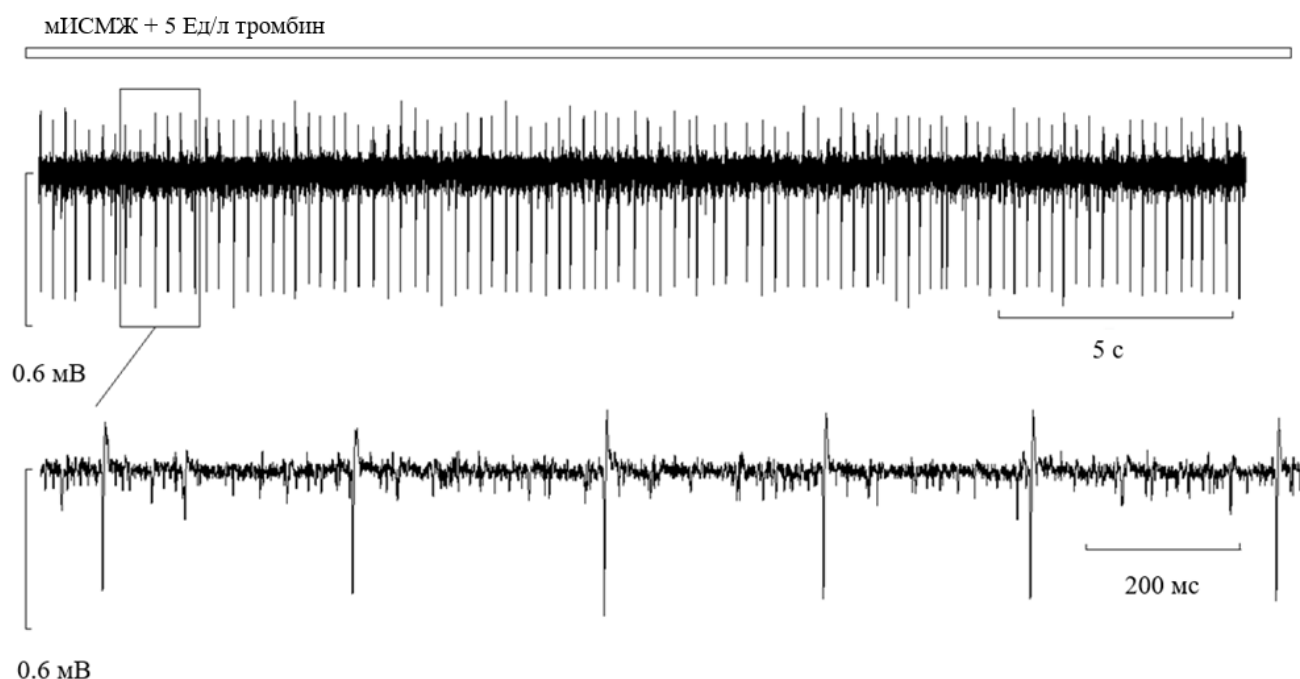


Рисунок 3.8 – Эпилептиформная активность в области СА1 гиппокампа во время перфузии модифицированным раствором ИСМЖ совместно с 5 Ед/мл тромбина

Амплитуда эпилептиформной активности быстро нарастала после добавления тромбина в модифицированный ИСМЖ (рисунок 3.9).

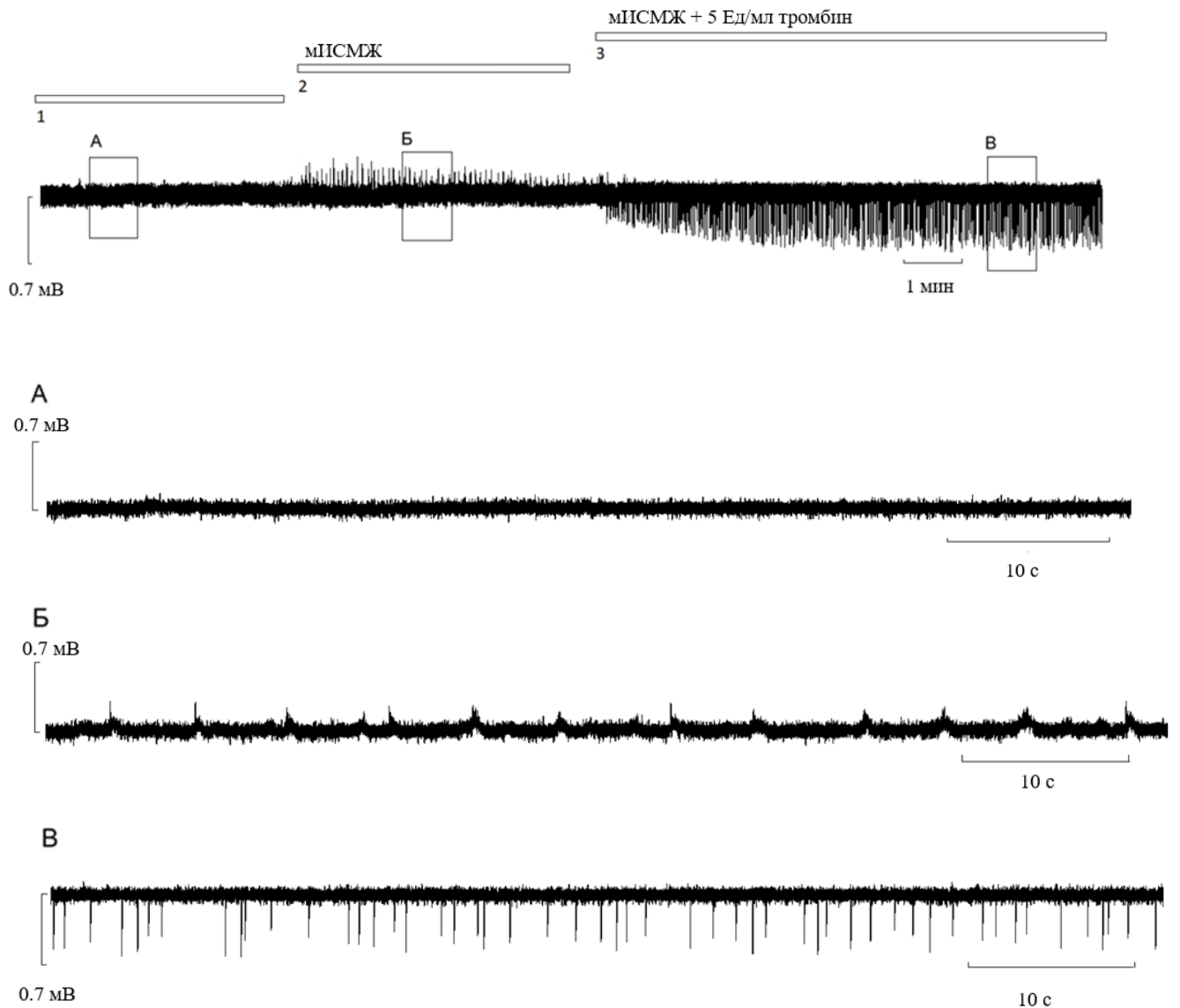


Рисунок 3.9 – Регистрация спонтанных внеклеточных потенциалов в СА1 области гиппокампа во время перфузии срезов гиппокампа (1) контрольной ИМСЖ, (2) модифицированным раствором ИСМЖ (мИСМЖ), (3) мИСМЖ с добавлением 5 Ед/мл тромбина. (А) Внеклеточные потенциалы в контрольных условиях. (Б) Повторяющиеся популяционные всплески эпилептиформной активности. (В) Полевые потенциалы при добавлении тромбина

Изменения в активности наблюдали сразу после аппликации тромбина ($n = 8$) или в пределах 2-5 мин после смены раствора ($n = 10$). Регистрацию спонтанных внеклеточных потенциалов проводили в течение 60 мин. На протяжении этого периода наблюдали интериктальную активность, которая представляла собой

одиноким высокoамплитудным популяционным всплеском, с периодичностью около 30 с. Амплитуда интериктальной активности составляла $0,9 \pm 0,02$ мВ, частота $0,05 \pm 0,008$ Гц (рисунок 3.10).

Иктальная активность представляла собой популяционные всплески меньшей амплитуды, но большей частоты по сравнению с интериктальными электрографическими событиями. Обычно за время регистрации наблюдали 2-3 эпизода иктальной активности продолжительностью 10-15 мин, разделенные 10-20 мин периодами гиперполяризации и покоя ($n = 13$). В промежутках между периодами покоя и иктальными событиями возникала интериктальная активность. В некоторых случаях иктальная эпилептиформная активность продолжалась 40 мин ($n = 5$). Амплитуда такой активности уменьшалась под конец регистрации.



Рисунок 3.10 – Интериктальная эпилептиформная активность в области CA1 гиппокампа: отдельные популяционные всплески на фоне нормальной активности нейронов

Также в нескольких срезах при регистрации наблюдали повторную высокoамплитудную активность продолжительностью не более 1-3 мин (рисунок 3.11). Ее амплитуда составляла $1,2 \pm 0,01$ мВ ($n = 8$). Такая активность была характерна только для данной экспериментальной группы, что может быть связано с влиянием тромбина на специфические PAR1-рецепторы, расположенные на пирамидных нейронах [69].

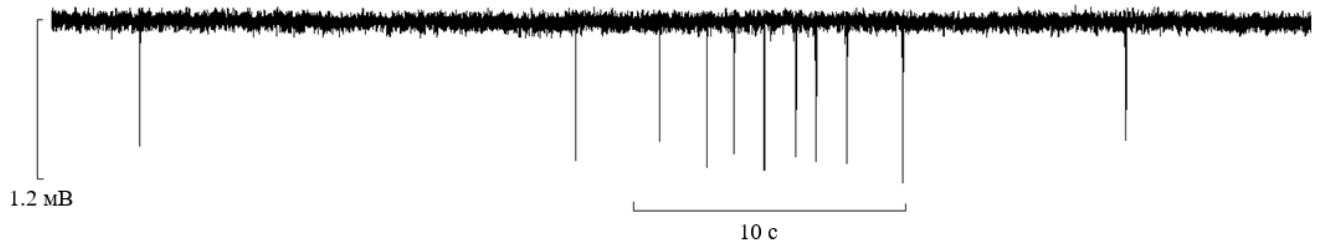


Рисунок 3.11 – Рекуррентная эпилептиформная активность в области CA1
гиппокампа

Так же, как и в предыдущей серии экспериментов, проводили пробную регистрацию ЭФА от пирамидного слоя области CA3 гиппокампа. Активность характеризовалась высокоамплитудными электрофизиологическими событиями, которые носили достаточно нерегулярный характер. ЭФА возникала одновременно или раньше, чем в области CA1, что также может предполагать возникновение эпилептического фокуса в поле CA3 гиппокампа.

Таким образом, совместная аппликация тромбина и модифицированной ИСМЖ воспроизводит на переживающих срезах гиппокампа полный электрографический паттерн эпилептического статуса, включающий фазы иктальной и интериктальной активности, а также эпизоды высокоамплитудных пароксизмальных разрядов, характерных исключительно для данной экспериментальной модели. Первичная генерация ЭФА в области CA3 с последующим её распространением на CA1 позволяет рассматривать поле CA3 в качестве вероятного пейсмекерного фокуса.

3.3.3 Эпилептиформная активность нейронных сетей гиппокампа во время острой фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

Исследования на животных моделях эпилепсии и клинические наблюдения у пациентов показывают, что ГЭБ играет непосредственную роль в эпилептогенезе и повреждении мозга [194, 221, 386, 428]. Экстравазация белков плазмы крови во внеклеточную среду мозга при повреждении ГЭБ способствует длительной

гиперсинхронизации нейронов в пораженных областях [511, 583]. Попадая в мозговую ткань вследствие травматического поражения мозга, тромбин способен индуцировать эпилептические приступы [323]. Работы, выполненные *in vitro*, демонстрируют повышение концентрации тромбина после применения пилокарпина [215]. Недавние исследования демонстрируют значительное повышение тромбина в мозге после эпилептического статуса [266]. Более того, внутримозговое введение тромбина способно напрямую индуцировать судороги [323]. С использованием классической модели височной эпилепсии, проводили сравнение проявлений ранней ЭФА у крыс после эпилептического статуса с активностью, вызванной в модельных условиях, имитирующих повреждение ГЭБ *in vitro*.

Острую фазу эпилептического статуса индуцировали при системном введении агониста мускариновых рецепторов, пилокарпина. Добавление пилокарпина *in vitro* не вызывало ЭФА, но индуцировало приступы при его применении в сочетании с веществами, которые увеличивают проницаемость ГЭБ, такими как брадикинин или гистамин [579].

Коррелятом ЭФА были популяционные всплески амплитудой $0,51 \pm 0,03$ мВ и частотой $3,31 \pm 0,35$ Гц (рисунок 3.12).

ЭФА фиксировалась сразу после начала регистрации внеклеточных потенциалов ($n = 8$) или через 23 ± 2 мин ($n = 6$). Регистрация продолжалась 60 мин, из которых ЭФА длилась 30-33 мин с дальнейшим периодом покоя, который прерывался повторными эпизодами ЭФА.

Также регистрировали интериктальную активность, наличие которой указывает на способность клеток генерировать повторные импульсы и синхронизировать активность в нейронной популяции.

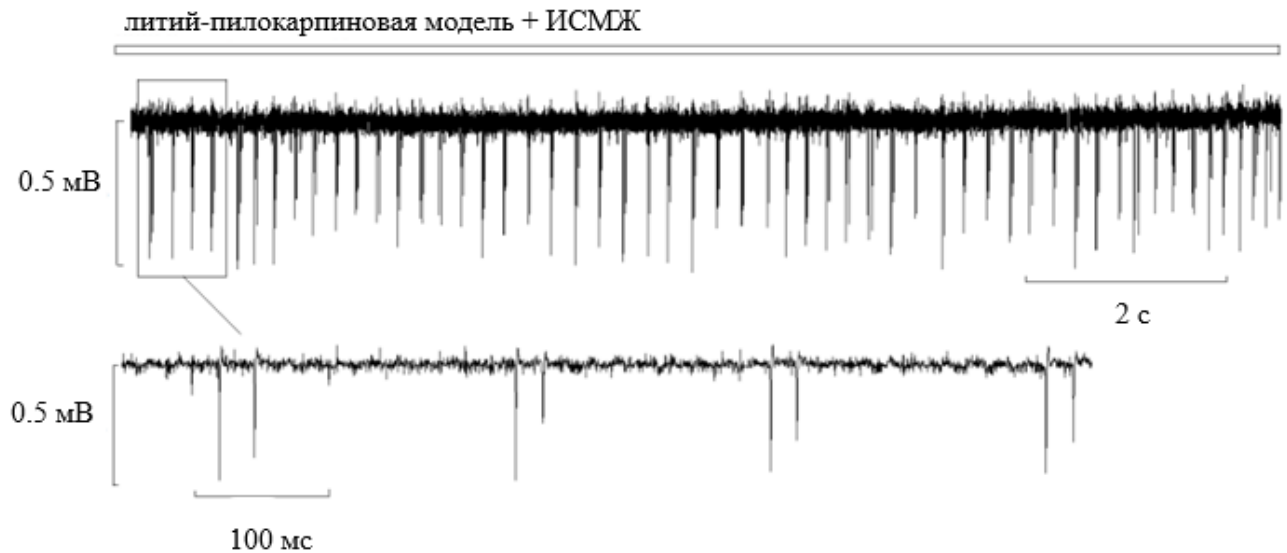


Рисунок 3.12 – Эпилептиформная активность области CA1 гиппокампа во время острой фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

Полученные данные показывают, что даже в условиях изолированного среза, лишённого афферентного притока и системной регуляции, гиппокамп животных с индуцированным *in vivo* эпилептическим статусом сохраняет способность к самостоятельной генерации и поддержанию ритмической эпилептиформной активности. Стабильность амплитудно-частотных характеристик популяционных всплесков и регулярность чередования иктальных и интериктальных фаз свидетельствуют о том, что в основе наблюдаемого паттерна лежат устойчивые изменения свойств локальной нейронной сети – по-видимому, связанные с перестройкой синаптической передачи и/или возбудимости пирамидных нейронов, – которые сохраняются после устранения первичного триггерного стимула. Это позволяет рассматривать острую фазу литий-пилокарпиновой модели как удобную экспериментальную платформу для дальнейшего анализа роли отдельных сигнальных путей (в том числе PAR1-опосредованных) в поддержании гипервозбудимости гиппокампа.

3.3.4 Электрографические корреляты эпилептиформной активности гиппокампа во время хронической фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии

После индукции ЭС в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и на протяжении двух недель, крысы находились в латентной фазе эпилептогенеза, по прошествии которой наступала хроническая стадия. Латентная фаза обычно может быть охарактеризована, как период «молчания», когда видимых проявлений эпилептической активности не наблюдается. Крысы характеризуются изменениями в поведенческих реакциях, у них снижается уровень социальности, поэтому такие животные содержатся в клетках по одному. Также наблюдается повышение аффективности и агрессивности в поведении. Хроническая стадия характеризуется проявлением как поведенческих, так и электрографических признаков эпилептогенеза. При отведении внеклеточной активности *in vitro* также фиксировали иктальную клоническую форму активности (рисунок 3.13).

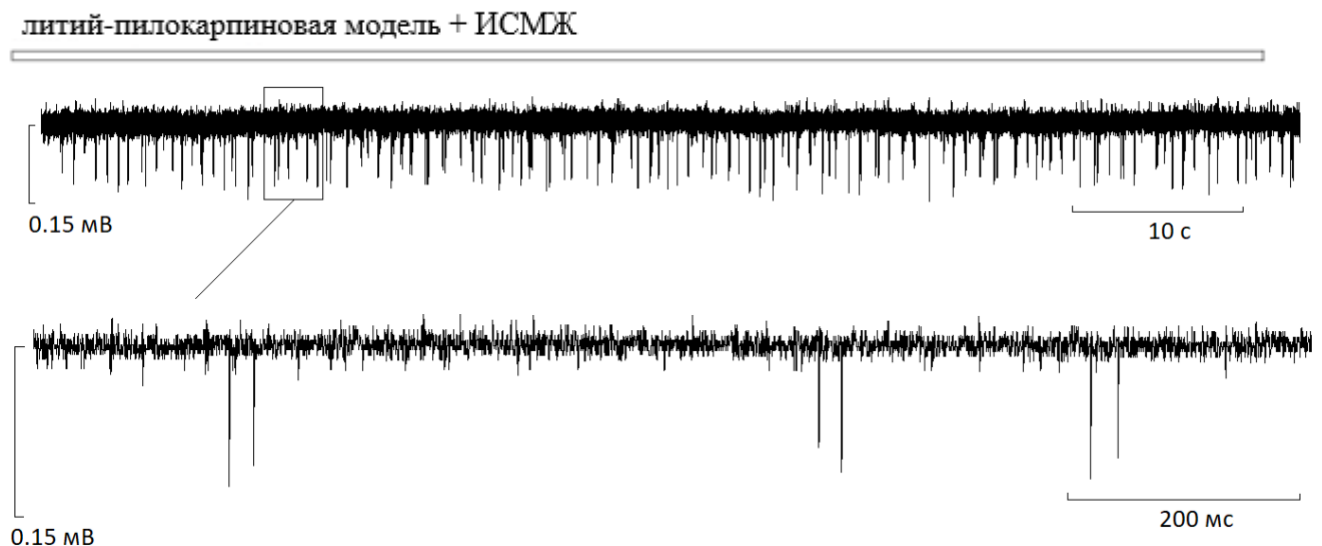


Рисунок 3.13 – Эпилептиформная активность пирамидного слоя области СА1 гиппокампа в хронической стадии литий-пилокарпиновой модели приступов

Регистрируемая активность имела амплитуду $0,49 \pm 0,04$ мВ и частоту $3,2 \pm 0,02$ Гц ($n = 14$). Регистрировали ЭФА на протяжении 60 мин. Латентность

появления ЭФА составила 7 ± 2 мин. Пароксизмальная активность длилась 10-20 мин, после чего наступал период покоя, чередующийся с повторными всплесками ЭФА.

Также наблюдали периодические всплески низкоамплитудной активности интенсивностью $0,048 \pm 0,001$ мВ и продолжительностью $823 \pm 54,3$ мс. Такая активность начиналась с кратковременных пачек потенциалов, длительность которых нарастала через несколько минут, и потом снова угасала (рисунок 3.14).

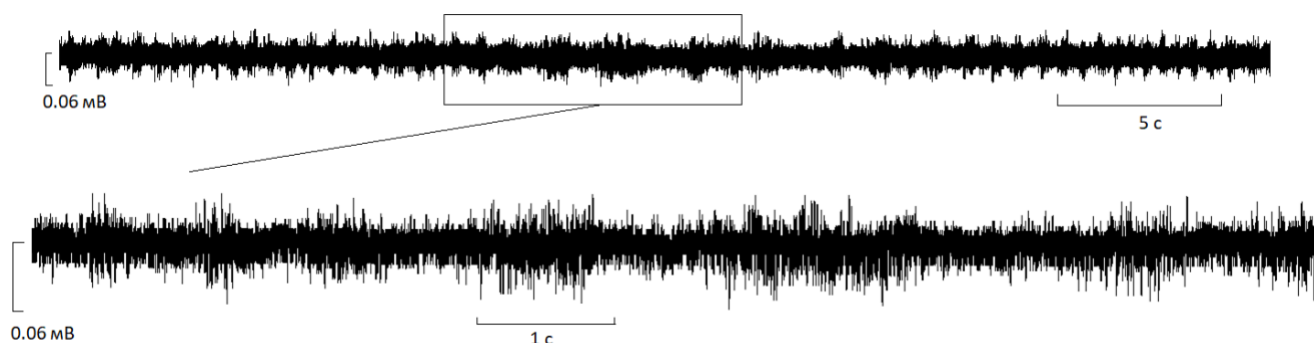


Рисунок 3.14 – Низкоамплитудная ЭФА в пирамидном слое поля СА1 гиппокампа в хронической стадии литий-пилокарпиновой модели

Полученные данные свидетельствуют о том, что паттерн эпилептиформной активности гиппокампальной сети, сформировавшийся в острой фазе литий-пилокарпиновой модели, сохраняет свои основные электрографические характеристики и на хронической стадии эпилептогенеза: сопоставимыми остаются амплитуда и частота иктальных популяционных всплесков, продолжительность пароксизмальных эпизодов, а также характер чередования иктальной и интериктальной активности. Отсутствие достоверных различий между двумя стадиями позволяет рассматривать острую фазу в качестве достаточной экспериментальной модели для дальнейшего сопоставления с *in vitro* моделью, воспроизводящей ранние последствия нарушения проницаемости ГЭБ. Исходя из этого, в последующих сериях экспериментов сравнительный анализ проводили с использованием срезов гиппокампа животных исключительно на острой стадии эпилептического статуса.

3.3.5 Сравнительный анализ эпилептиформной активности разных групп животных

Основной целью данной серии экспериментов была попытка воссоздать условия, имитирующие нарушение целостности ГЭБ *in vitro*. В частности, модифицировали раствор ИСМЖ, приблизив его по составу к плазме крови, с целью получения электрографических коррелят ЭФА, подобных по биофизическим параметрам к таковым в литий-пилокарпиновой модели приступов. Выбор данной модели эпилепсии связан с тем, что она характеризуется поражением гиппокампа и нарушением барьерной функции ГЭБ. Для достижения поставленной цели изменяли концентрации ионов в растворе ИСМЖ, приближая его по составу к сыворотке крови и добавляли плазменный белок тромбин.

В итоге применение модифицированной ИСМЖ приводило к возникновению ЭФА в пирамидных нейронах области CA1 гиппокампа, частота которой после добавления тромбина значительно возрастала. Частота ЭФА характеризует динамику генерации разрядов во времени, отражает общий уровень возбудимости сети и баланс возбуждающих/тормозных влияний. При перфузии срезов контрольных животных модифицированным ИСМЖ в комбинации с тромбином частота ЭФА значительно не отличалась от частоты электрографических приступов, отведенных при острой и хронической литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Для выявления статистической разницы учитывали показатели ЭФА острой фазы литий-пилокарпиновой модели, как показателя ранних последствий нарушения целостности ГЭБ. Сравнительный анализ полевых потенциалов в трех экспериментальных группах выявил значительное увеличение частоты ($H(2) = 26,74$, $p < 0,0001$; post-hoc: мИСМЖ и тромбин – $p < 0,0001$; мИСМЖ и ЭС – $p < 0,0001$; рисунок 3.15 Б1) и амплитуды ($H(2) = 20,30$, $p = 0,0001$; post-hoc: мИСМЖ и тромбин – $p < 0,0001$; мИСМЖ и ЭС – $p = 0,0011$; рисунок 3.15 Б2) ЭФА после добавления тромбина либо индукции ЭС.

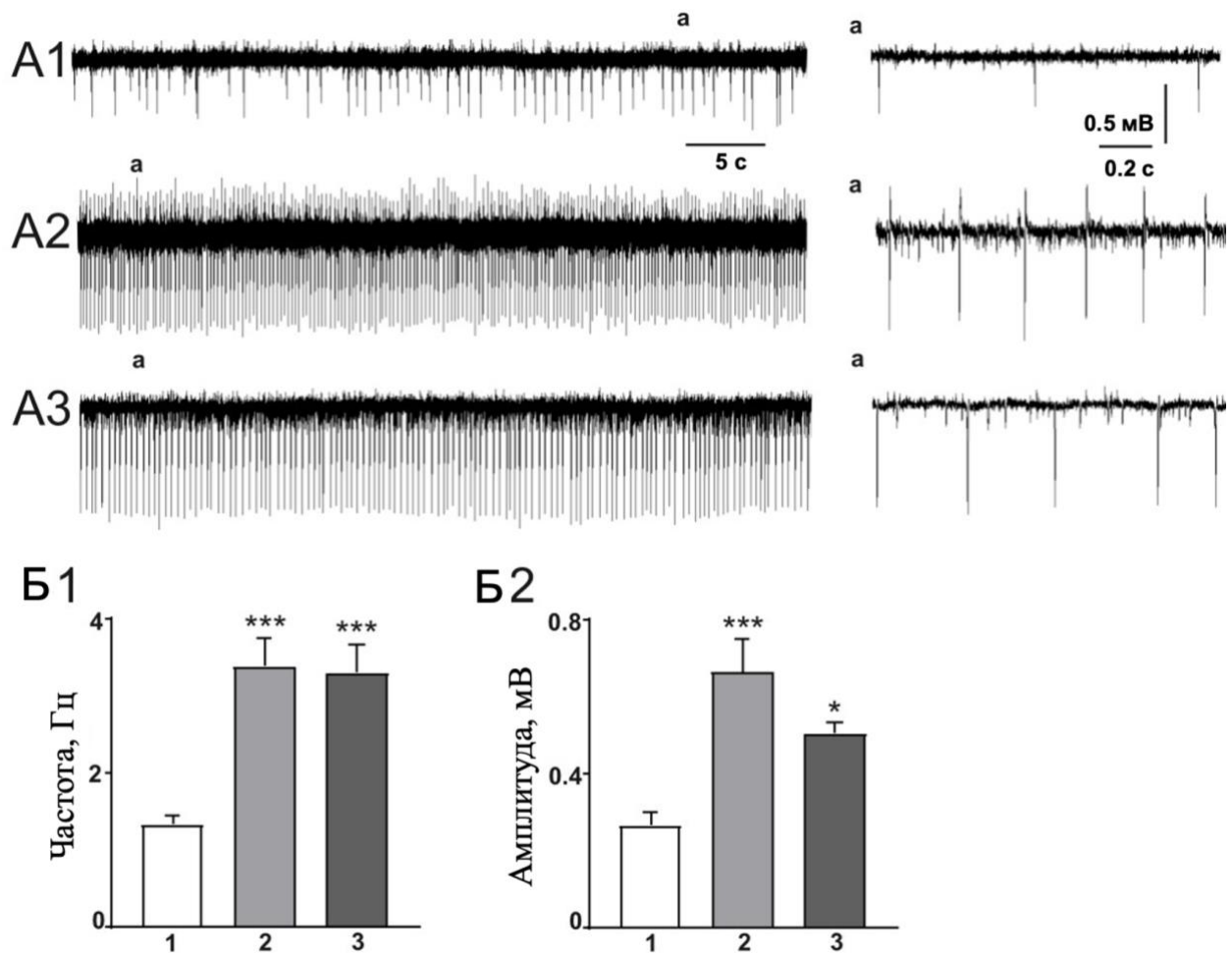


Рисунок 3.15 – Сравнительная характеристика эпилептиформной активности, вызванной тромбином в модифицированном растворе спинномозговой жидкости (мИСМЖ) и литий-пилокарпином. А1 – внеклеточные полевые потенциалы, отведенные от пирамидного слоя области СА1 гиппокампа в мИСМЖ, демонстрируют развитие эпилептиформной активности (ЭФА). А2 – добавление 5 Ед/мл тромбина приводит к выраженной индукции ЭФА. А3 – ЭФА в срезах после эпилептического статуса, сходна с активностью, наблюдаемой при действии тромбина в мИСМЖ. Спонтанные разряды (а) показаны в увеличенном масштабе на правой панели. Сводные графики отражают частоту (Б1) и амплитуду (Б2) активности во время эпилептиформных разрядов, вызванных аппликацией мИСМЖ отдельно (1), мИСМЖ с тромбином (2) и в срезах после эпилептического статуса (3). Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего.

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

Разница по показателям ЭФА в срезах, полученных от крыс с эпилепсией, вызванной литий-пилокарпином, по сравнению со срезами, обработанными тромбином с модифицированным раствором ИСМЖ обнаружена не была ($p = 0,99$; рисунок 3.15 Б2).

Амплитуда ЭФА отражает силу ответа нейронной популяции, соответствует количеству вовлеченных нейронов и их синхронности, а также зависит от эффективности возбуждающей синаптической передачи между ними. Амплитуда рассматривается как количественный показатель степени синхронности активированных нейронов, масштаба ответа сети, в то время как частота является динамическим показателем нейрональной активности, отражает темп патологической разрядки. Существенное возрастание данных показателей как в модельных условиях дисфункции ГЭБ, так и при экспериментально индуцированном ЭС свидетельствует о вовлечении обоих показателей распространения эпилептической активности: как гипервозбудимости, так и гиперсинхронизации нейронов в исследуемой области.

Основным результатом проведенного исследования следует считать то, что срезы, полученные от животных с экспериментально индуцированной височной эпилепсией, уже в ранний период после развития ЭС, демонстрируют аналогичные модельным условиям дисфункции ГЭБ выраженные изменения параметров нейрональной активности.

Полученные результаты позволяют нам сделать вывод, что разработанные модельные условия успешно имитируют состояние нейронных сетей гиппокампа при дисфункции ГЭБ.

Моделирование дисфункции гематоэнцефалического барьера дает возможность проанализировать, как изменение мозгового микроокружения и проникновение компонентов плазмы крови инициируют эпилептиформную активность. Высокая стоимость и методологическая сложность экспериментов *in vivo* привели к тому, что за последние десятилетия было создано сравнительно немного адекватных моделей ГЭБ на животных. Несмотря на это, при недостатке совершенных *in vitro*-систем именно *in vivo*-подходы остаются ключевым

инструментом для оценки фармакологической эффективности лекарств при патологиях ЦНС, поскольку они максимально точно воспроизводят физиологические условия человеческого ГЭБ и позволяют экстраполировать результаты на клинические ситуации [73].

Наиболее распространенные методы построения таких моделей включают внутривенное введение препаратов, церебральную перфузию, позитронно-эмиссионную томографию и микродиализ [318]. Была разработана стандартизированная модель на основе личинок данио-рерио, обеспечивающая быстрый и воспроизводимый скрининг проницаемости ГЭБ [337]. В работе Liu и соавторов полиэтиленгликозилированные кремниевые наночастицы различных размеров были использованы для исследования их транспорта через барьер: показано, что увеличение диаметра снижает проницаемость, что подчеркивает перспективность платформы для целевой доставки препаратов [341].

In vitro-модели ГЭБ остаются одним из наиболее информативных и технологически доступных инструментов для фундаментальных и прикладных нейрофармакологических исследований. Они позволяют воспроизводить ключевые морфологические и функциональные характеристики ГЭБ, а также проводить количественную оценку трансбарьерного транспорта соединений.

Преимущества предложенной нами *in vitro*-модели дисфункции ГЭБ заключаются в упрощении экспериментальных процедур. Поскольку изучение нарушения ГЭБ *in vivo* вызывает значительные сложности, подход *in vitro* остается основным возможным способом исследования. Модели *in vitro* имеют ряд существенных преимуществ: для них характерно жестко контролируемая среда с воспроизводимыми условиями; позволяют детально анализировать механизмы; способны ускорить фармакологические процедуры, а также уменьшают этические ограничения в использовании подопытных животных. Существующие модели *in vitro* направлены на имитацию ГЭБ при нормальных условиях: для исследования механизмов доставки лекарств, функционирования данной структуры в условиях различных патологий, которые моделируются отдельно [15, 36, 50, 400, 462, 535, 607]. Такие модели базируются на тканевой инженерии, учитывают кровяное и

внутричерепное давление, привлекают 3D-печать чипов плюрипотентных стволовых клеток и др. Но ни одна из описанных моделей не отображает состояние нарушения целостности барьера. Разработанные нами условия позволяют воспроизвести именно патологическое состояние, которое наблюдается при дисфункции ГЭБ. Экспериментальная модель дает возможность минимизировать количество факторов, воздействующих на нервную активность мозга для получения более точных электрофизиологических результатов.

3.4 Изменение синаптической пластичности гиппокампа в модельных условиях дисфункции ГЭБ

3.4.1 Оценка воздействия модельных условий нарушения функции ГЭБ на возбуждающую синаптическую передачу гиппокампа

Дисфункция ГЭБ, наряду с эпилептогенезом, ассоциирована с формированием состояния гипервозбудимости нейронов. Точные механизмы влияния нарушения ГЭБ на синаптическую передачу остаются предметом научного исследования. На данном этапе работы проведен анализ влияния экспериментальных условий дисфункции ГЭБ на возбуждающую синаптическую передачу в сети CA3-CA1 гиппокампа *in vitro*. Гиппокамп, с его четко организованной синаптической архитектурой, является классической моделью для изучения синаптической пластичности, как физиологической (например, долговременная потенцияция, ДВП), так и патологической [155]. Классическое представление о физиологической синаптической пластичности в гиппокампе, основано на принципе Хэбба («нейроны, которые возбуждаются вместе, связываются вместе») [238] и его экспериментальном подтверждении, продемонстрированном как стойкое усиление синаптической передачи после высокочастотной стимуляции [79], ключевым механизмом которой является активация NMDA-рецепторов [138]. Патологическое усиление возбуждающей

синаптической передачи в синапсах СА3-СА1 гиппокампа рассматривается как ключевой механизм формирования гипервозбудимости нейронных сетей и инициации ЭФА [362, 463]. Хотя связь между дисфункцией ГЭБ и эпилептогенезом становится все более очевидной [194, 585], прямые экспериментальные доказательства того, как условия, моделирующие нарушение ГЭБ, влияют на базовые параметры возбуждающей синаптической передачи в гиппокампе, остаются недостаточно изученными.

Целью настоящего этапа исследования явился анализ влияния экспериментальных условий дисфункции ГЭБ на возбуждающую синаптическую передачу в сети СА3-СА1 гиппокампа *in vitro*. Для реализации этой цели была проведена проверка гипотезы о том, что воздействие тромбина вызывает патологическое усиление синаптической передачи, проявляющееся в индукции ЭФА и стойком увеличении амплитуды пВПСП.

Перфузия срезов гиппокампа экспериментальным раствором (мИСМЖ с добавлением 5 Ед/мл тромбина) приводила к индукции ЭФА, регистрируемой от радиального слоя области СА1 (рисунок 3.16).

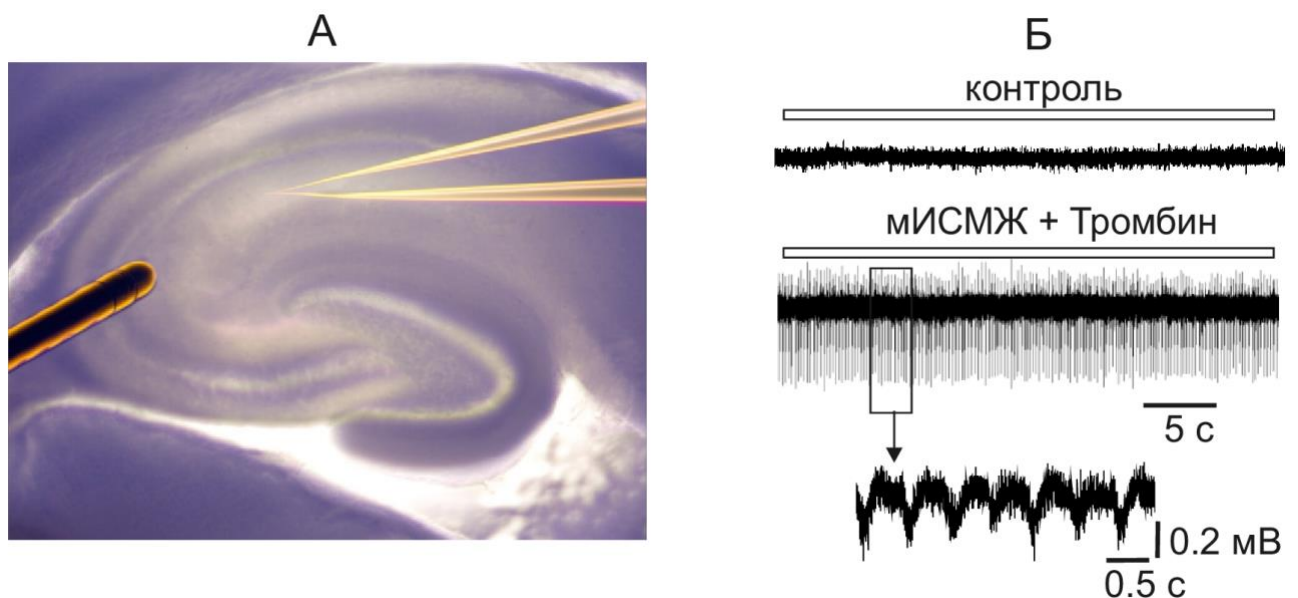


Рисунок 3.16 – Дисфункция гематоэнцефалического барьера вызывает патологическое усиление возбуждающей синаптической передачи гиппокампа: (А) – Расположение электродов для регистрации полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП), вызванных стимуляцией коллатералей

Шаффера концентрическим электродом (слева) и отводимых стеклянным электродом (справа), заполненным внеклеточным раствором, помещенным в область CA1 радиального слоя; (Б) – Внеклеточные полевые потенциалы, зарегистрированные в радиальном слое области CA1 при перфузии модифицированной искусственной спинномозговой жидкостью (МИСМЖ) с 5 Ед/мл тромбина, демонстрируют индукцию эпилептиформной активности

Изменения активности наблюдались в течение 2-4 мин после смены раствора, что согласуется с результатами исследования, описанного в разделе 3.2, в котором в аналогичных условиях при отведении спонтанной активности от пирамидного слоя области CA1 регистрировали стабильную ЭФА, сохранявшуюся на протяжении всего периода применения экспериментального раствора.

Влияние модельных условий нарушения функции ГЭБ на пВПСП исследовали при стимуляции с частотой 0,05 Гц. Замена базового раствора на модифицированную ИСМЖ с тромбином приводила к быстрому (2-4 мин) возрастанию амплитуды пВПСП во всех исследуемых срезах ($156,0 \pm 8,0 \%$; $n = 16$; рисунок 3.17). Стабильные ответы выходили на плато через 10-15 мин и сохранялись на этом уровне на протяжении всей регистрации, что отражает устойчивое усиление возбуждающей передачи в условиях моделирования дисфункции ГЭБ ($F_{1, 15} = 49,2$, $p < 0,001$).

Следует отметить, что анализ спонтанной активности в радиальном слое области CA1 гиппокампа, проведенный после регистрации пВПСП, выявил наличие ЭФА во всех исследуемых срезах ($n = 16$). Эти результаты подтверждают сохранность сетевой возбудимости и демонстрируют, что введение тромбина с модификацией ИСМЖ порождает устойчивые изменения в характере активностей, сопоставимые с ранее описанными паттернами гипервозбудимости.

Основным результатом настоящего этапа исследования является быстрое и устойчивое усиление возбуждающей синаптической передачи в синапсах CA3-CA1 в модельных условиях дисфункции ГЭБ, которое проявляется в двух взаимосвязанных феноменах: 1) индукции ЭФА, регистрируемой в радиальном

слое области CA1, и 2) значительном долговременном увеличении амплитуды пВПСП.

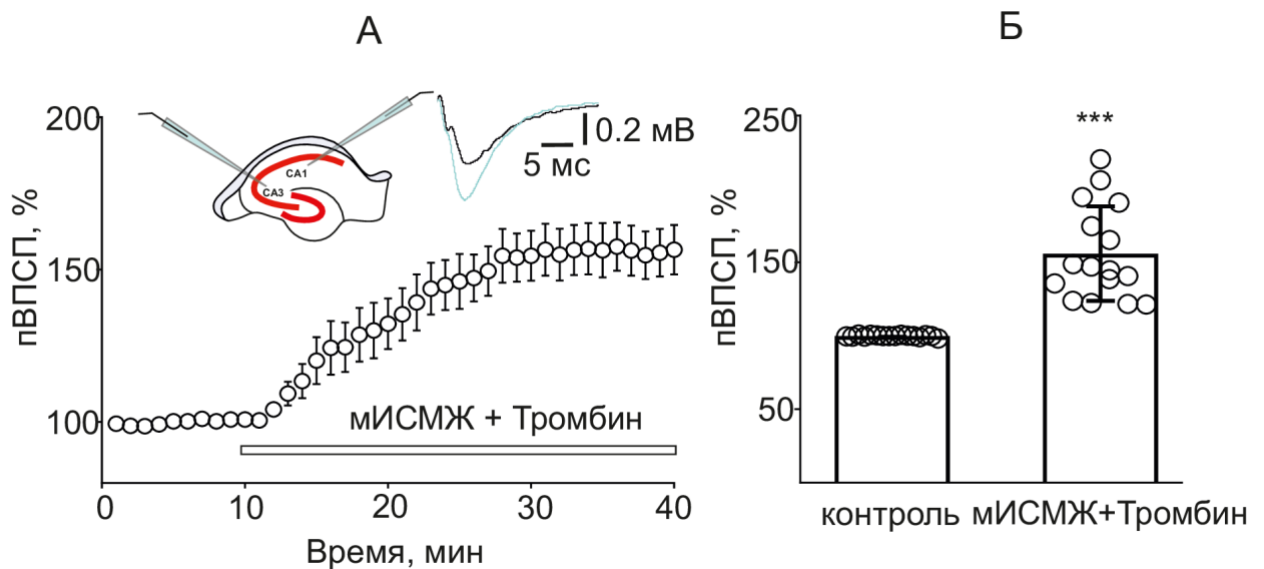


Рисунок 3.17 – Долговременное увеличение амплитуды пВПСП в модельных условиях дисфункции ГАБ. (А) – Нормализованные по среднему значению базовой активности амплитуды пВПСП в ответ на добавление МИСМЖ с тромбином; на верхней панели представлена схема расположения электродов на срезе (слева) и репрезентативные записи пВПСП (справа) в контроле (черный) и в экспериментальных условиях (голубой); (Б) – Гистограмма демонстрирует значительное увеличение амплитуды пВПСП в условиях, имитирующих дисфункцию ГАБ. *** $p < 0,001$

Ранее было показано, что применение модифицированной ИСМЖ само по себе индуцирует ЭФА через 10-15 мин, тогда как добавление тромбина (5 Ед/мл) к этому раствору вызывает немедленное и значительное более выраженное усиление пароксизмальной активности, характеризующееся более чем двукратным увеличением ее амплитуды и частоты (раздел 3.1). Усиление пВПСП в условиях моделирования дисфункции ГАБ обусловлено двумя основными механизмами: тромбин-опосредованным и изменениями ионного состава среды. Повышение концентрации K^+ до 5 ммоль/л вызывает деполяризацию мембран нейронов за счет

снижения электрохимического градиента, что усиливает спонтанную возбудимость и снижает порог генерации потенциалов действия [526]. Снижение концентрации Mg^{2+} до 0,8 ммоль/л ослабляет блок NMDA-рецепторов при потенциалах покоя, усиливая глутаматергическую передачу и способствуя гипервозбудимости и ЭФА [265]. Одновременное уменьшение концентрации Ca^{2+} до 1 ммоль/л увеличивает натриевую проницаемость мембраны, дополнительно деполяризуя нейроны и нарушая Ca^{2+} -зависимые механизмы торможения, что ведет к неконтролируемому распространению возбуждения [240]. Комбинированное действие этих сдвигов создает проэпилептический фон, который проявляется в виде спонтанной ЭФА нейронных сетей гиппокампа [502].

Наблюдаемая в настоящем исследовании быстрая индукция ЭФА (в течение 2-4 мин после начала перфузии) под действием тромбина согласуется с известными проэпилептическими эффектами этого медиатора [194, 521, 532]. Активируя рецепторы PAR1 на нейронах и астроцитах, тромбин модулирует активность ионных каналов (включая потенциал-зависимые натриевые и кальциевые каналы, а также калиевые каналы), ингибирует поглощение глутамата астроцитами и усиливает его высвобождение из пресинаптических терминалей [273, 357, 576]. Совокупность этих эффектов нарушает нормальную активность нейронов и провоцирует возникновение патологической гиперсинхронизации [70].

Наиболее значимым результатом, по нашему мнению, является устойчивое увеличение амплитуды пВПСП в ответ на воздействие тромбина. Замена базового раствора на модифицированный, содержащий тромбин, приводила к быстрому и выраженному увеличению амплитуды пВПСП, которое стабилизировалось через 10-15 мин и сохранялось на протяжении всего эксперимента. Это увеличение существенно превышало флуктуации базовой синаптической передачи. Данный феномен по своей природе подобен долговременной потенциации – механизму усиления синаптической передачи, лежащему в основе адаптивной перестройки мозга. Однако, в отличие от физиологической ДВП, индуцируемой высокочастотной стимуляцией, наблюдаемое усиление нейропластичности, по-видимому, является ее патологическим аналогом, способствующим

инициированию и поддержанию эпилептогенеза [81, 396, 543]. Эпилептогенез и синаптическая пластичность конкурируют за одни и те же нейронные сети и молекулярные мишени, представляя собой патологическую и физиологическую стороны одних и тех же фундаментальных механизмов, которые в норме обеспечивают обучение, а при сбое запускают эпилепсию. Усиление пластичности в определенных условиях может повышать восприимчивость к эпилепсии, а эпилептическая активность, в свою очередь, индуцировать патологическую пластичность, создавая порочный круг: приступ → ДВП → гипервозбудимость → новый приступ [285, 543].

Полученные результаты напрямую связывают дисфункцию ГЭБ с конкретным клеточным механизмом — патологическим усилением силы возбуждающих синапсов в критической для эпилептогенеза области гиппокампа. Это подтверждает гипотезу о том, что нарушение целостности ГЭБ является не просто сопутствующим явлением, но активным участником в каскаде событий, ведущих к гипервозбудимости нейронных сетей и развитию судорожных состояний [194, 560, 585]. Долговременный характер усиления синаптической передачи подчеркивает его потенциальную роль в формировании устойчивых патологических изменений в нейронных цепях.

3.4.2 Кратковременная синаптическая пластичность нейронных сетей гиппокампа при экспериментальной дисфункции ГЭБ

Кратковременная пластичность — это динамические изменения эффективности синаптической передачи на временных масштабах от миллисекунд до секунд (фасилитация, депрессия, посттетаническая потенция), которые обусловлены вариациями вероятности высвобождения нейромедиатора и объема пресинаптических запасов [568, 650]. В гиппокампе данный вид пластичности играет ключевую роль в фильтрации и интеграции входящих сигналов, выполняя функцию «динамического фильтра»: она усиливает передачу релевантных по времени и частоте всплесков, подавляет фоновые и слишком длительные сигналы

и тем самым помогает гиппокампу эффективно кодировать, хранить и воспроизводить временные и пространственные паттерны информации [14, 649].

Нарушение синаптической пластичности служит характерным признаком ряда неврологических расстройств, успешно моделируемых на животных. Кратковременные формы пластичности в значительной степени зависят от поддержания оптимальных условий микроокружения нейронов, ключевым регулятором которых выступает ГЭБ.

Целью настоящего этапа исследования являлось установление характеристик кратковременной синаптической пластичности в экспериментальных условиях дисфункции ГЭБ, отображающей быстрые формы модуляции синаптической эффективности, которые играют ключевую роль в обработке информации и кратковременной памяти.

Изменения парной фасилитации при модельной дисфункции ГЭБ

Вначале был проведен анализ поведения PPF, как инструмента для определения вовлеченности пресинаптического локуса в изменение синаптической пластичности в модельных условиях нарушения целостности ГЭБ. Парная пластичность может проявляться в виде фасилитации либо депрессии, в зависимости от изначального уровня вероятности высвобождения нейромедиатора из пресинаптической терминали [84, 650]. В нашем случае была отмечена фасилитация во всех анализируемых срезах вне зависимости от длительности интервала между стимулами, с максимальным эффектом при промежутке между раздражениями, равном 50 мс в контроле и 25 мс при дисфункции ГЭБ (рисунок 3.18а).

Было обнаружено значительное увеличение PPF в экспериментальных условиях нарушения барьера при межстимульном интервале 25 мс (контроль: $1,38 \pm 0,07$ ($n = 10$); модель: $1,71 \pm 0,07$ ($n = 25$); $t = 3,0$; $p < 0,01$) и 50 мс (контроль: $1,41 \pm 0,07$ ($n = 10$); модель: $1,61 \pm 0,06$ ($n = 25$); $t = 1,8$; $p < 0,05$). Соотношение амплитуд пВПСП не различалось при интервалах между стимулами в 100 мс, 200 мс и 300 мс ($p = 0,08$; $p = 0,11$ и $p = 0,12$ соответственно; рисунок 3.18 б).

Таким образом, обнаруженное усиление парной фасилитации при коротких межстимульных интервалах указывает на вовлечение пресинаптического локуса в модификацию синаптической передачи в поле CA1 гиппокампа в условиях моделируемой дисфункции ГЭБ.

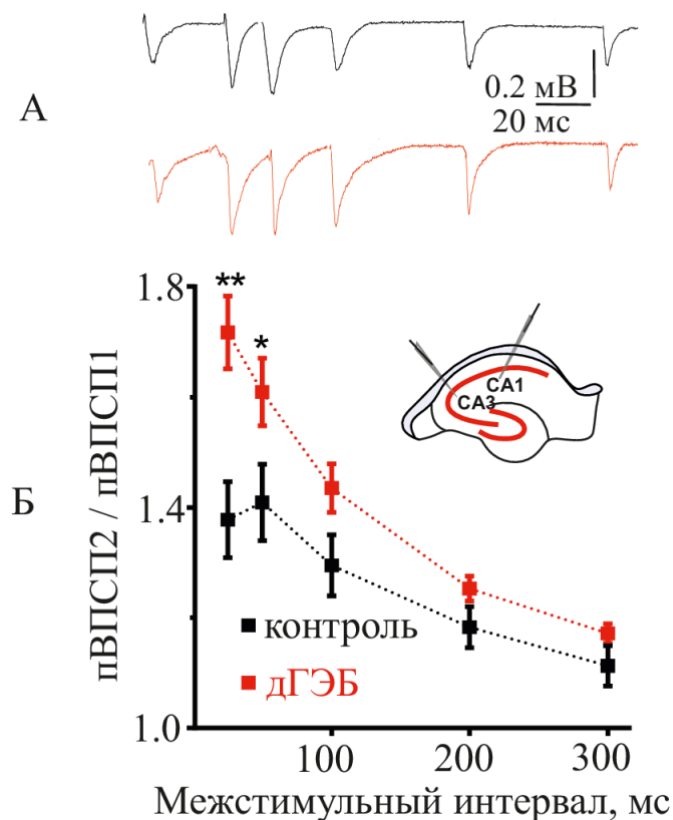


Рисунок 3.18 – Усиление парной фасилитации на коротких интервалах в экспериментальных условиях дисфункции ГЭБ (дГЭБ)). (А) – наложение репрезентативных записей пВПСП в ответ на парную стимуляцию CA3-CA1 нейронных сетей с межстимульным интервалом 25, 50, 100, 200, 300 мс; (Б) – изменения в соотношении амплитуды пВПСП, вызванных парной стимуляцией в зависимости от межстимульного интервала в контроле (черный) и в экспериментальных условиях дисфункции ГЭБ (красный). Значения гистограммы представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Полученные данные позволяют предположить, что выявленные пресинаптические изменения могут отражаться и на более длительных формах кратковременной и долговременной синаптической пластичности, для оценки чего в следующей серии экспериментов был проведён анализ посттетанической потенциации и долговременной потенциации в тех же экспериментальных условиях.

Посттетаническая потенциация CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа при экспериментальной патологии ГЭБ

Синапсы гиппокампа также способны генерировать посттетаническую потенциацию [650]. В следующей серии экспериментов выясняли, вовлечен ли данный тип кратковременной пластичности в патогенез дисфункции ГЭБ. Нейроны гиппокампа обычно получают последовательные входные сигналы от соседних нейронов в диапазоне частот 20-60 Гц во время задержки выполнения задачи рабочей памяти [10]. Для индукции ПТП применяли кратковременную тетаническую стимуляцию с частотой 50 Гц, состоящую из одной серии 15 импульсов (рисунок 3.19А), которая имитирует данное физиологическое состояние [284].

Регистрацию базовых условий производили путем предъявления тестовых стимулов с интервалом в 20 с (частота 0,05 Гц). Посттетанический ответ CA3-CA1 нейронных сетей регистрировали в течение 10 мин ($n = 11$ контроль; $n = 21$ модель).

В среднем продолжительность потенциации, индуцированной тетанической стимуляцией, составляла 4-6 мин. Максимальное значение амплитуды ПТП в контрольных и экспериментальных условиях достигало соответственно $127,5 \pm 3,4 \%$ и $147,1 \pm 4,4 \%$ от базового уровня, что свидетельствует о значительном увеличении данного показателя при имитации дисфункции ГЭБ ($t = 2,7$; $p < 0,05$, рисунок 3.19Б).

В ходе исследования не было обнаружено изменений величины длительной потенциации, измеренной через 10 мин после короткой (15 импульсов, 50 Гц) тетанической стимуляции, в условиях компрометации гематоэнцефалического барьера ($F(1, 22) = 0,01$; $p = 0,91$).

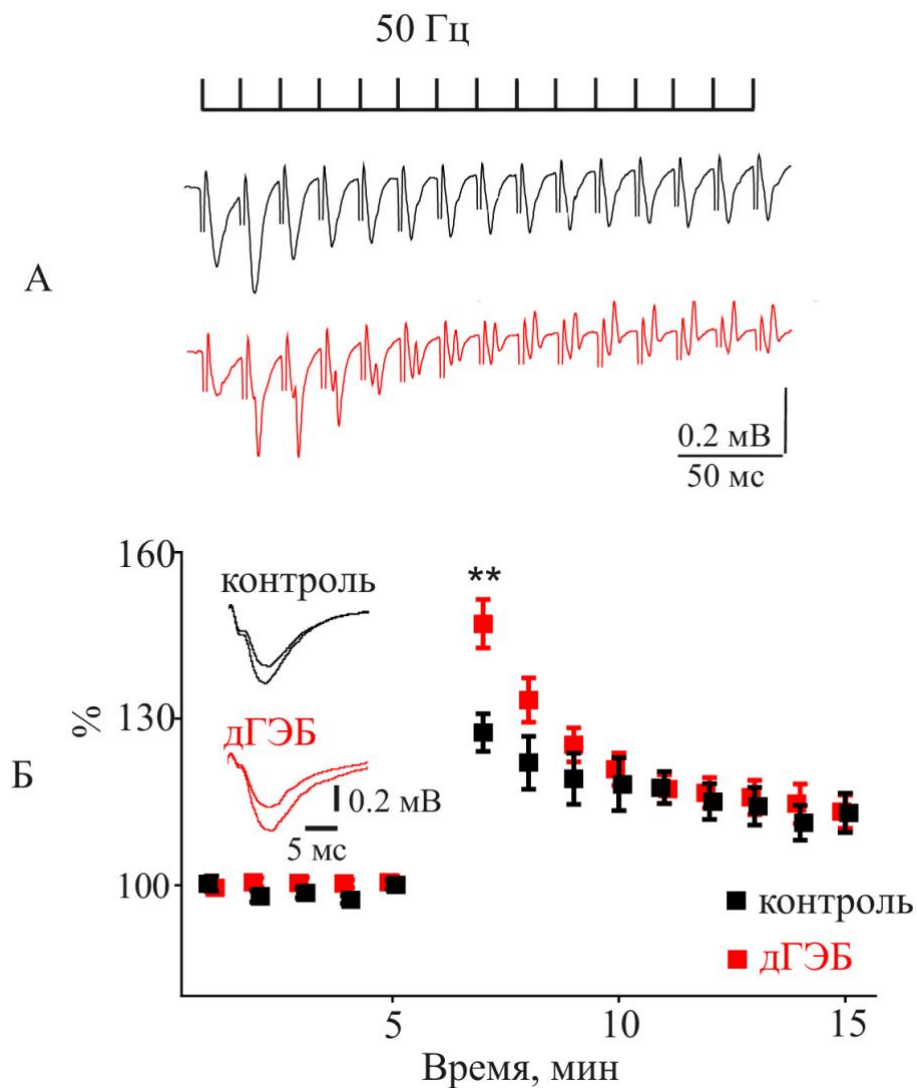


Рисунок 3.19 – Селективное увеличение максимальных значений посттетанической потенциации в условиях, имитирующих нарушение ГЭБ. (А) – репрезентативные регистрации пВПСП во время тетанической стимуляции из 15 стимулов с частотой 50 Гц, где черным обозначены значения контрольной группы, красным – дГЭБ; (Б) – усредненные значения, нормализованные по базовому уровню, амплитуды пВПСП, вызванные тетанической стимуляцией коллатералей Шаффера (50 Гц); вставка в графике отображает репрезентативные записи пВПСП до и после тетанической стимуляции в контроле (черный) и в модельных условиях (красный). * $p < 0,05$

Таким образом, кратковременная тетаническая стимуляция, имитирующая физиологический режим активации гиппокампальной сети при выполнении задач рабочей памяти, приводит к избирательному усилению посттетанической потенциации в поле СА1 в условиях моделируемой дисфункции ГЭБ без сопутствующих изменений амплитуды долговременной потенциации. Полученные данные, наряду с ранее выявленным увеличением коэффициента PPF, подтверждают вовлечённость пресинаптических механизмов в модификацию кратковременной синаптической пластичности при нарушении целостности гематоэнцефалического барьера.

Пластичность, зависящая от активности, при экспериментальном нарушении проницаемости ГЭБ

На следующем этапе экспериментов изучали влияние модельных условий дисфункции ГЭБ на поведение пВПСП в ответ на каждый из 15 импульсов внутри 50 Гц стимула, которое обычно относят к пластичности, зависящей от активности [572]. Повторяющееся раздражение вызывало начальную фасилитацию во всех исследуемых срезах обеих групп с дальнейшим постепенным снижением амплитуды к исходному уровню после 5-6го импульса и уходом в депрессию после 7-8го разряда, когда каждый последующий ответ был ниже изначального. Максимальные значения относительной амплитуды пВПСП наблюдали после 2го импульса как в контрольных ($1,38 \pm 0,05$; $n = 11$), так и экспериментальных условиях ($1,78 \pm 0,05$; $n = 21$). Фасилитация пВПСП после 2го, 3го и 4го импульсов была значительно выше при имитации нарушения ГЭБ ($t = 4,7$; $p < 0,001$; $t = 4,6$; $p < 0,001$; и $t = 3,6$; $p < 0,05$ соответственно; рисунок 3.20).

Однако модельные условия не оказывали группового временного эффекта на пластичность, зависящую от активности ($F(1, 30) = 2,3$; $p = 0,14$), относительные значения пВПСП в конце стимуляционного трека оставались неизменными и составляли $0,71 \pm 0,06$ в контроле и $0,73 \pm 0,09$ в модельных условиях. Избирательное увеличение амплитуды пВПСП в начале стимуляционного трека указывает на усиление процессов кратковременной пластичности, зависящих от паттерна активации.

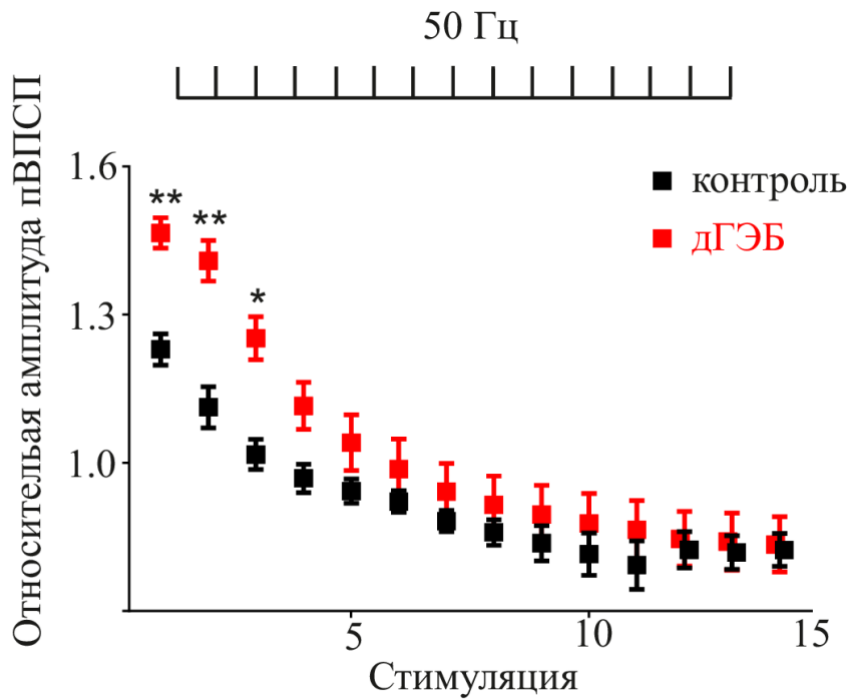


Рисунок 3.20 – Относительные значения амплитуды пВПСР в ответ на каждый из 15 импульсов, нормализованные по амплитуде пВПСР, вызванной первым стимулом. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

В ходе проведенных исследований продемонстрировали особенности проявления кратковременной пластичности гиппокампа в экспериментальных условиях, имитирующих ранние последствия дисфункции ГАБ. Для острой фазы нарушения барьера характерны немедленные изменения в ионном балансе [472, 484], влекущие нарушение калиевого буферирования и соответственного повышения внеклеточного K^+ [145, 278], нарушение кальциевого гомеостаза в дендритных шипиках, снижение порога деполяризации нейронов [273], изменение синаптической эффективности и ДВП [548], нарушение кратковременной пластичности [340], связанной со снижением энергообеспечения синаптических процессов.

Использованная модель представляет собой адекватный способ моделирования дисфункции ГАБ: при его нарушении концентрация тромбина в

мозге возрастает более чем в 200 раз – с примерно 100 пмоль до 25 нмоль [521, 544, 546]. В работе применяли 5 Ед/мл (≈ 25 нмоль), что близко к содержанию данной протеазы в ликворе при внутрижелудочковом кровоизлиянии, и при этом вызывает PAR1-опосредованное воздействие без структурных повреждений нервной ткани. Эффект развивается достаточно быстро: в предыдущих экспериментах эпилептиформная активность возникала непосредственно после попадания тромбина с модифицированным ИСМЖ в камеру регистрации (раздел 3.3). Учитывая такую скорость реакции, в настоящем исследовании была детально оценена кинетика изменения амплитуды пВПСП: эффект модельных условий проявлялся спустя 2-4 мин и достигал устойчивого уровня через 10-15 мин. Предварительная 20-мин инкубация срезов в экспериментальном растворе обуславливала сложную и специфическую перестройку синаптической пластичности в поле СА1 гиппокампа. Основные результаты работы включают: (1) статистически значимое увеличение парной фасилитации; (2) селективное изменение пластичности, зависящей от активности; (3) выраженное усиление максимальных значений ПТП. Такая комбинация изменений разрешает предположить модуляцию динамических свойств синапса, которые модифицируют его реакцию на разные паттерны активности.

Усиление фасилитации на коротких межстимульных интервалах, которое обычно связывают с остаточным пресинаптическим Ca^{2+} , вероятно указывает на снижение исходной вероятности высвобождения везикул из пресинаптической терминали и/или на изменение динамики пресинаптического Ca^{2+} [650]. Кроме того, повышение концентрации K^+ во внеклеточном растворе вследствие нарушения ГЭБ, отраженное в применяемой модели, по-видимому, частично инактивирует пресинаптические потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. Как результат, при предъявлении первого из двух стимулов, в терминаль входит меньше Ca^{2+} , что снижает начальную вероятность высвобождения медиатора [10]. Феноменологически это проявляется как увеличение PPF при коротких межстимульных интервалах, что и наблюдалось в результате исследований. Отсутствие изменений на интервалах 100-300 мс можно объяснить активацией

компенсаторных механизмов, так как в этом временном окне начинают работать Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы большой проводимости, усиливается активность $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [650].

Интересным результатом исследования является одновременное увеличение PPF и ПТП. Усиление парной фасилитации является надежным индикатором снижения начальной вероятности высвобождения нейромедиатора (Pr) [650]. Канонически, более низкая Pr должна приводить к более медленному истощению пула готовых к высвобождению везикул и, следовательно, к уменьшению степени депрессии во время тетанической стимуляции [284], что и наблюдалось при изучении пластичности, зависящей от активности. Регистрируемое повышение ПТП вероятно может быть следствием данного механизма. Ускоренное пополнение пула готовых к высвобождению везикул во время тетануса приводит к тому, что сразу по его окончании в активной зоне оказывается сверхизбыточное количество готовых везикул, что потенциально способно обеспечить более мощную посттетаническую потенцию.

Можно полагать, что речь идет о классическом механизме «гомеостатической пластичности» в патологических условиях. Нейронная сеть оказывается в состоянии «компенсированной гипервозбудимости»: при предъявлении одиночных, нерелевантных сигналов пресинаптический компонент снижает свою активность для предотвращения спонтанных разрядов, в то время как высокочастотная активация вызывает избыточную эффективность как на пре-, так и на постсинаптическом сайте, формируя сверхпрочные связи. Такой механизм может объяснять, почему состояния, связанные с нарушением ГЭБ, часто являются проэпилептогенными – сеть становится предрасположенной к формированию патологически усиленных связей [585].

Полученные результаты согласуются с данными, где дисфункцию ГЭБ имитировали аппликацией альбумина [278], но отличаются от исследований, в которых использовали модели выраженного нейровоспаления (например, с помощью ЛПС) или действия тромбина. В этих моделях часто наблюдается, наоборот, уменьшение PPF, что связано с прямым действием цитокинов (например,

IL-1 β) или активацией PAR1, которые увеличивают Pr [359, 645]. Это подчеркивает, что характер изменений кратковременной пластичности сильно зависит от конкретного патофизиологического механизма, лежащего в основе дисфункции ГЭБ. Причиной разнонаправленного эффекта тромбина на показатели пластичности является концентрационная зависимость его действия [69]. Так, при высоких концентрациях тромбин ингибирует формирование долговременной пластичности посредством прямой активации PAR1, напротив, при низких концентрациях – индуцирует метапластические изменения, способствуя усилению долговременной пластичности посредством вовлечения оси PAR1 – активированный протеин С (aPC) – эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR) [359].

В заключение, данный этап проведенного исследования демонстрирует особый характер поведения CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа в ходе применения разработанного протокола экспериментальной дисфункции ГЭБ, отличающийся от классического состояния повышенного возбуждения нейронов под воздействием стимулирующих факторов. Вероятно, имеет место переход нейронных сетей в специфическое состояние «компенсированной гипервозбудимости», когда затухание активности на пресинаптическом сайте способно служить гомеостатическим механизмом, защищающим сеть от немедленной активации, однако наблюдаемая постсинаптическая гиперчувствительность к высокочастотной стимуляции может быть предрасполагающим аспектом для развития долгосрочных патологических состояний, таких как эпилептогенез.

3.4.3 Изменения долговременной пластичности нейронных сетей гиппокампа крыс при имитации дисфункции ГЭБ

Предыдущие результаты демонстрируют развитие эпилептиформной активности в нейронах гиппокампа, сравнимую по амплитуде и частоте с таковой в литий-пилокарпиновой модели, которая является классической моделью височной

эпилепсии, связанной с дисфункцией ГЭБ. Была поставлена задача выяснить возможный эффект модельных условий нарушения барьера на пластичность нейронных сетей гиппокампа с применением протокола индукции долговременной потенциации. Генерация эпилептиформной активности и индукция синаптической пластичности имеют общие молекулярные и клеточные механизмы. Наблюдаемая эпилептиформная активность при имитации нарушений ГЭБ свидетельствует о гипервозбудимом состоянии нейронных сетей, что может существенным образом влиять на разные формы нейропластичности.

Целью настоящего этапа исследования являлось выявление особенностей функционирования нейронных сетей гиппокампа в условиях, имитирующих ранние последствия нарушения ГЭБ

Для исследования пластичности синаптической передачи в условиях имитации ранней дисфункции ГЭБ, использовали протокол высокочастотной стимуляции, состоящий из 100 импульсов, прикладываемых с частотой 100 Гц. На рисунке 3.21А представлены сгруппированные данные пВПСП в контрольной и имитирующей дисфункцию ГЭБ группах до и после тетанической стимуляции.

Сначала оценивали базовую синаптическую передачу в сетях СА3-СА1 гиппокампа. Стимуляция коллатералей Шаффера вызывала пВПСП в радиальном слое области СА1 во всех исследуемых срезах как в контрольных, так и в модельных условиях. Наблюдалось значительное увеличение амплитуды пВПСП во время моделирования дисфункции ГЭБ *in vitro* ($0,51 \pm 0,08$ мВ) по сравнению с регистрациями в контрольном растворе ИСМЖ ($0,2 \pm 0,03$ мВ), что указывает на повышение синаптической эффективности в исследуемых нейронных сетях ($p < 0,01$, $n = 9$ контроль, $n = 10$ модель дисфункции ГЭБ; рисунок 3.21Б).

Анализ усредненных значений максимальной амплитуды ПТП выявил достоверное увеличение амплитуды в экспериментальной группе ($211,1 \pm 19,9$ %, $n = 10$) по сравнению с контрольной ($165,6 \pm 11,6$ %, $n = 9$; $p < 0,01$; рисунок 3.21В). Стабильная ДВП индуцировалась в обеих экспериментальных группах (контроль: $138,4 \pm 3,1$ %, $n = 9$; модель дисфункции ГЭБ: $159,8 \pm 6,6$ %, $n = 10$).

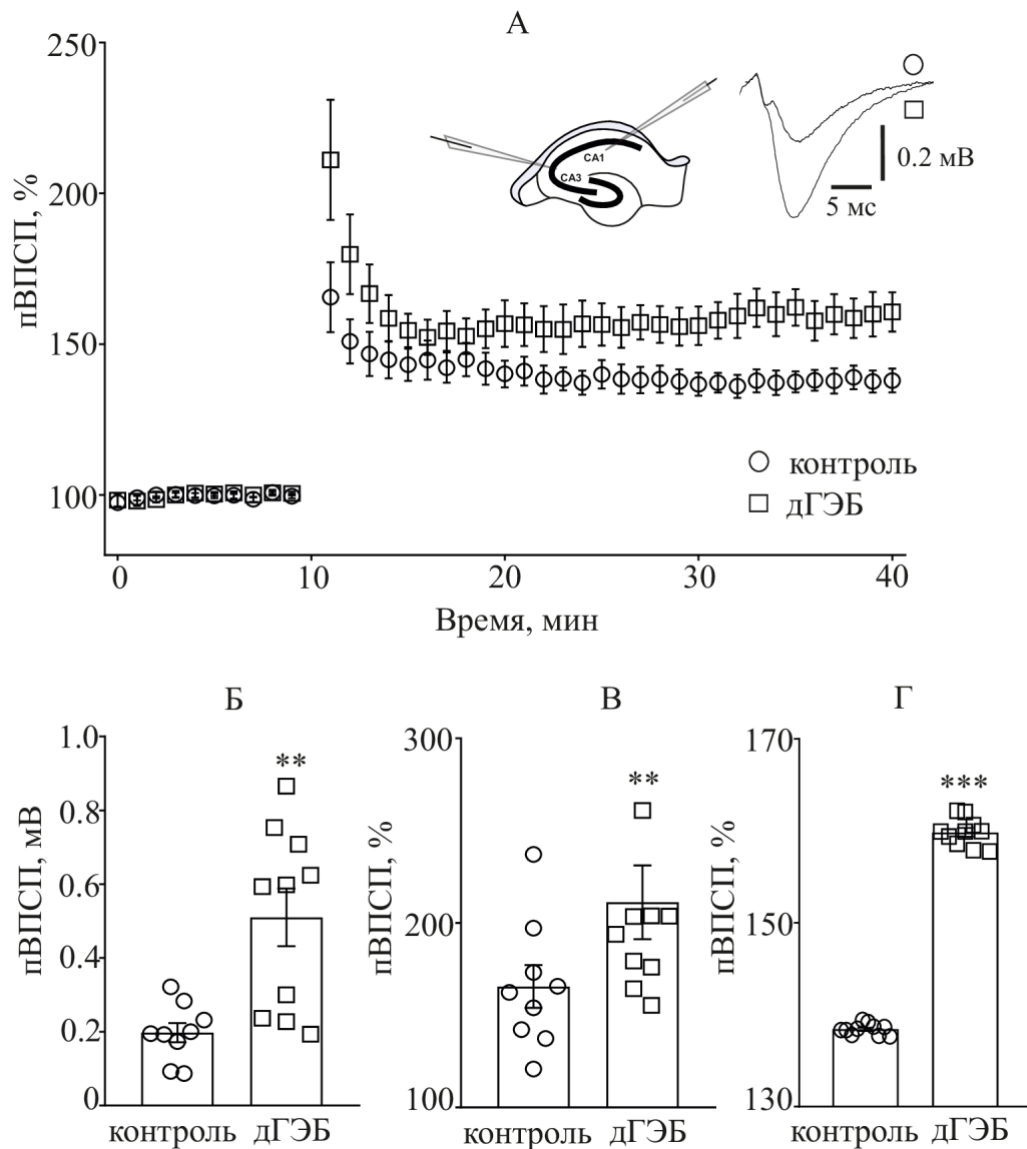


Рисунок 3.21 – Изменение функционального состояния СА3-СА1-нейронных сетей гиппокампа крыс в модельных условиях дисфункции гематоэнцефалического барьера (дГЭБ): (А) – Нормализованные по среднему значению базовой активности амплитуды пВПСП до и после тетанической стимуляции; на верхней панели представлены репрезентативные записи пВПСП в контроле (кружок) и в экспериментальных условиях (квадрат); (Б) – Гистограмма демонстрирует значительное увеличение амплитуды пВПСП в модели дисфункции ГЭБ; (В) - Достоверное возрастание амплитуды посттетанической потенциации срезов гиппокампа в экспериментальных условиях нарушения ГЭБ; (Г) Статистически значимое увеличение долгосрочной пластичности СА3-СА1-синапсов при повреждении ГЭБ. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Однако ДВП в срезах модельной группы была значительно выше, чем в контрольной ($p < 0,001$, рисунок 3.21Г).

В настоящем исследовании обнаружено, что кратковременное воздействие экспериментального раствора, содержащего тромбин в концентрации 5 Ед/мл, усиливает ДВП CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа наряду с увеличением показателей ПТП. Эти результаты подтверждают участие факторов свертывания крови в регуляции нейрональной пластичности и согласуются с данными о пропластическом эффекте тромбина [207, 358].

Эффект развивается быстро: в предыдущем исследовании эпилептиформная активность развивалась сразу после попадания тромбина в регистрационную камеру; здесь достоверный прирост амплитуды пВПСП отмечали уже через 2-4 мин, а стабильные ответы фиксировали через 10-15 мин.

Тромбин является лишь одним из множества циркулирующих белков, способных проникать в паренхиму мозга при нарушении ГЭБ. В моделях бактериального воспаления (внутрижелудочковое введение ЛПС) наблюдали диаметрально противоположный эффект – угнетение ДВП за счет высвобождения провоспалительных цитокинов [466].

При внутрижелудочковом введении искусственного раствора электролитов, приближенного по составу к сыворотке, с повышенным содержанием K^+ , пониженным Mg^{2+} и Ca^{2+} в присутствии альбумина, интенсивность ДВП, напротив, возрастала, что авторы связывали с аномальным повышением внеклеточного K^+ и активацией астроцитарных рецепторов $TGF\beta II$ [7, 242, 494].

Наши данные показывают, что в условиях, имитирующих раннее геморрагическое повреждение ГЭБ, пластические процессы смещаются в сторону гипервозбудимости и совпадают по направлению с альбуминовой, но не воспалительной моделью, что подчеркивает различие молекулярных сценариев, лежащих в основе этих патологических состояний.

Нарушение синаптической пластичности является характерной чертой различных нейродегенеративных расстройств, воспроизводимых в экспериментальных животных моделях. Высокочастотная активация нейронов,

сопровождая судорожные разряды, оказывает неблагоприятное влияние на ДВП [465, 317]. В пилокарпиновой модели эпилепсии это проявляется выраженным снижением ДВП в зубчатой извилине – входной области гиппокампа [61]. Однако при хронической эпилепсии в поле СА1, несмотря на значительную гибель пирамидных клеток, наоборот, наблюдалось, усиление ДВП [405]. Одним из возможных объяснений подобного противоречия может служить тот факт, что деафферентация или ослабление нейронных сетей от мшистых волокон до поля СА3 [61], способно приводить к повышению синаптического ответа в СА3-СА1 синапсе, как вариант сенситизации. Похожее усиление пластичности фиксировали при кислородно-глюкозной депривации [602] и очаговых поражениях мозга [255], что согласуется с концепцией гомеостатического усиления сохранившихся синапсов и компенсаторного увеличения синаптической эффективности после гибели нейронов. Также наблюдали прирост амплитуды ДВП, который, по-видимому, относится к патологической форме гиперпластичности, описанной в первые часы после легкой ЧМТ [47]. Сам по себе факт усиления ДВП не означает улучшения когнитивных функций. Напротив, резкое снижение порога ее индукции, вероятно, уменьшает избирательность синаптического фильтра и приводит к гиперсинхронизации сетей, что, в свою очередь, способствует судорожной активности и формированию эпилептогенной сети.

Следует отметить, что действие тромбина обратимо: применение селективного антагониста PAR1 SCH 79797 нивелирует эпилептиформную активность, индуцируемую в исследуемой модели дисфункции ГЭБ в культуре гиппокампа, как было показано в разделе 3.3, восстанавливает синаптическую пластичность и нарушения поведенческих реакций крыс после эпилептического статуса [513], блокирует амнестический эффект легкой ЧМТ [276]. Прямые ингибиторы тромбина – аргатробан и дабигатран – потенциально могут проявлять противоэпилептические свойства и способствовать восстановлению пластичности в условиях повышенной концентрации тромбина и гиперактивации PAR1 в мозге, что наблюдается при нарушении ГЭБ [311]. Избирательный антагонист PAR1 ворапаксар уже одобрен в кардиологии и потенциально может быть

репозиционирован для нейропротекции при остром инсульте или ЧМТ. Однако системное применение прямых ингибиторов тромбина сопровождается дозозависимым риском кровотечений, поэтому при их возможном использовании для нейропротекции необходимо определить безопасный терапевтический диапазон и рассмотреть методы адресной доставки, минимизирующие системные геморрагические осложнения.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что фиксируемое в первые часы после нарушения ГЭБ усиление синаптической пластичности представляет собой преимущественно кратковременное, адаптивное явление. Начальный рост синаптической эффективности, по-видимому, обусловлен быстрым притоком факторов свертывания и сопровождающим его каскадом сигналов (в том числе повышением внеклеточной концентрации Ca^{2+} и активацией протеинкиназ), что временно понижает порог индукции ДВП и усиливает амплитуду возбуждающих постсинаптических потенциалов. По мере того, как химический состав межклеточной среды постепенно приближается к физиологическому, а буферные и энергетические ресурсы нейрональной сети истощаются, активируется ряд компенсаторных процессов: усиливается обратный захват глутамата астроглией, повышается активность Ca^{2+} -насосов и экспрессия молекул, задействованных в гомеостатическом синаптическом масштабировании. В совокупности это приводит к постепенному снижению уровня пластичности до базового, а при сохранении патологических стимулов – к смещению баланса в сторону механизмов долговременной депрессии. Следовательно, обнаруженный феномен следует рассматривать как фазоспецифическую реакцию ткани на острую дестабилизацию барьера, причем его длительность и последующие траектории (стабилизация, возврат к норме либо переход к депрессивным изменениям) во многом будут определяться скоростью восстановления ионного и метаболического гомеостаза, а также степенью вовлечения клеточных звеньев глии и иммунной системы мозга.

3.5 Роль PAR1 в модуляции эпилептической активности нейронных сетей гиппокампа

Результаты, полученные на модели ГЭБ *in vitro* (разделы 3.3–3.4), продемонстрировали, что тромбин, проникающий через нарушенный барьер, посредством активации PAR1 вызывает эпилептиформную активность и модулирует синаптическую пластичность в гиппокампе. Однако модель *in vitro* имеет ограничения: она воспроизводит лишь один компонент патологического процесса – контакт нейронов с сывороточными факторами. Для верификации роли PAR1 в контексте целостного эпилептогенеза была использована *in vivo* модель височной эпилепсии. Выбор этой модели обусловлен тем, что эпилептический статус, индуцированный пилокарпином, сопровождается выраженным нарушением проницаемости ГЭБ, проникновением сывороточного тромбина в паренхиму мозга и активацией PAR1 [367, 583].

В данной серии экспериментов изучали эффект фармакологической блокады специфических тромбиновых рецепторов PAR1 на развитие эпилептогенеза, индуцированного в литий-пилокарпиновой модели.

С использованием классической модели височной эпилепсии, было показано, что ингибирование PAR1 оказывает нейропротекторное и противозепилептическое действие [266]. В ЦНС тромбин посредством активации PAR1 модулирует нейрональную возбудимость за счет изменений синаптической передачи и функционирования потенциал-зависимых ионных каналов [273, 358]. Кроме того, было продемонстрировано влияние тромбина и других агонистов PAR1 на индукцию ДВП в срезах гиппокампа [207].

У мышей с дефицитом PAR1 наблюдали изменения синаптической пластичности гиппокампа, а также процессов обучения и памяти, что указывает на существенную роль PAR1-зависимой сигнализации в синаптической пластичности и формировании памяти [25, 26]. Поскольку при височной эпилепсии многие пластические изменения происходят в гиппокампе, который отвечает за формирование памяти и обработку эмоций, целью настоящего этапа исследования

было определение роли PAR1 в регуляции синаптической пластичности гиппокампа, нарушенной эпилептическим статусом.

3.5.1 PAR1-зависимая регуляция синаптической пластичности гиппокампа крыс после эпилептического статуса

Пластичность нейронных связей является неотъемлемым свойством нервной системы. Благодаря пластичности может изменяться структура и активность нейронных сетей в ответ на воздействие различных факторов внешней и внутренней среды. Механизмы пластичности, то есть способность нейронов изменять свои функции в процессе адаптации, являются одним из актуальных направлений современной нейрофизиологии. В основе явления пластичности нервной системы лежат процессы модуляции передачи сигналов посредством синапсов. Синаптическая пластичность определяет изменения силы соединений между отдельными нейронами, их активность в составе локальных нейронных сетей и характер взаимодействия между различными функциональными системами мозга.

С использованием электрофизиологических методов регистрации внеклеточных полевых потенциалов исследовали влияние угнетения активности рецепторов PAR1 на вызванные полевые постсинаптические потенциалы в радиальном слое области CA1 гиппокампа. Для эксперимента отбирали срезы с четко идентифицируемым гиппокампом и переносили их в регистрационную камеру. Срезы фиксировали серебряной подковой с капроновыми нитями таким образом, чтобы области регистрации и стимуляции оставались интактными.

Кратковременная пластичность

Данные были получены с 19 срезов в группе контроль, 23 срезов в группе контроль + SCH, 24 срезов в группе ЭС и 23 срезов в группе ЭС + SCH. От каждого животного использовали не более 3-4 срезов.

Синаптическая пластичность, индуцированная в области CA1 гиппокампа в ответ на парную стимуляцию коллатералей Шаффера, была значительно нарушена

в группе животных с эпилептическим статусом (ЭС) по сравнению с контрольной группой ($N = 8,87$; $p = 0,03$; рисунок 3.22). Существенных различий в показателе PPF между контрольными группами, получавшими или не получавшими антагонист PAR1, а также группой ЭС + SCH не выявлено. Во время парной стимуляции во всех экспериментальных группах, кроме группы животных с эпилептическим статусом наблюдалась фасилитация второго ответа ($p = 0,019$ для групп контроль и ЭС).

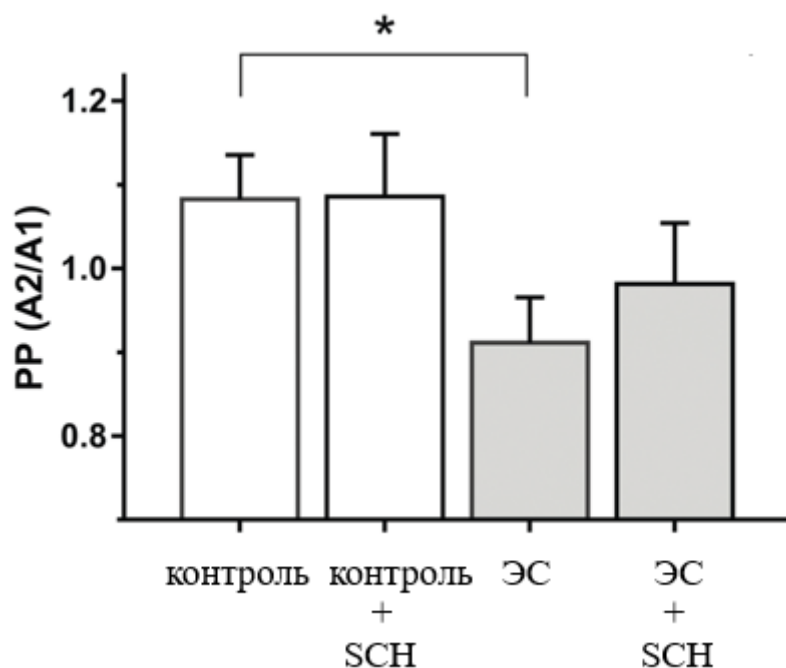


Рисунок 3.22 – Фармакологическая блокада PAR1 восстанавливает индуцированное эпилептическим статусом снижение парной пластичности.

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка ($\pm$ SE).

* $p < 0,05$ – по сравнению с группой контроль

Далее оценивали величину ПТП в радиальном слое области CA1 гиппокампа. Этот показатель отражает кратковременное увеличение выброса нейромедиатора в синаптическую щель, наиболее эффективно индуцируемое высокочастотной стимуляцией.

Исследование проведено на 17 срезах контрольной группы, 23 срезах группы контроль + SCH, 21 срезе группы ЭС, и 20 срезах группе ЭС + SCH.

Кратковременная высокочастотная стимуляция коллатералей Шаффера вызывала сходную ПТП в контрольных группах (контроль и контроль + SCH, $p > 0,05$; рисунок 3.23), за которой следовала долговременная потенция, также не различавшаяся между этими группами (контроль: $150,3 \pm 0,71$; контроль + SCH: $151,90 \pm 0,57$). У животных с ЭС в большинстве случаев отмечалось снижение уровня ПТП, однако различия между контрольной и ЭС-группами не достигали уровня статистической значимости ($p = 0,1$; рисунок 3.23).

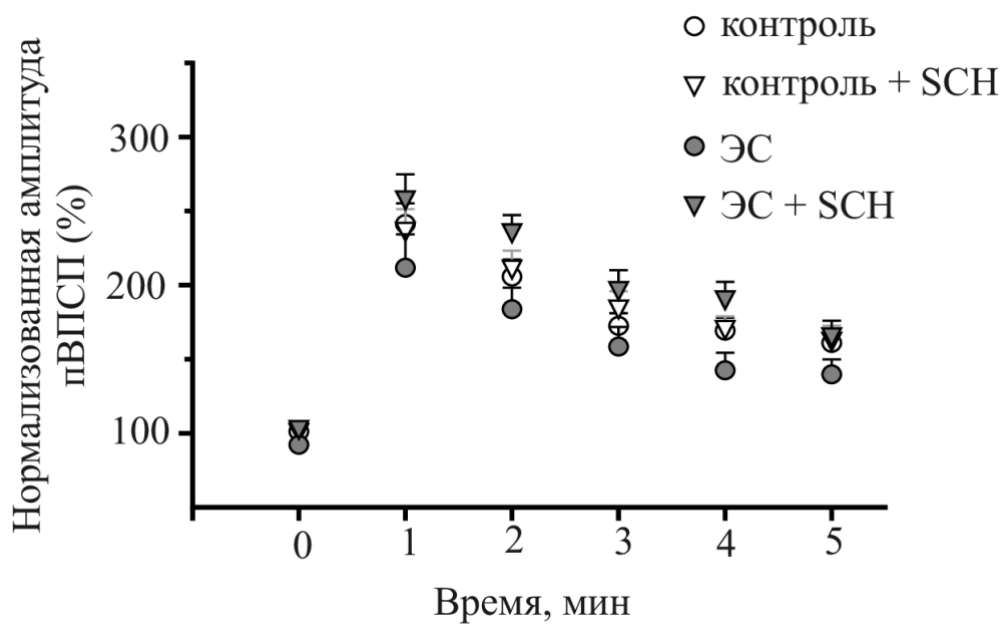


Рисунок 3.23 – Изменения амплитуды пВПСП в ответ на кратковременную тетаническую стимуляцию. Каждая точка представляет собой средние значения трех последовательных ответов, зарегистрированных каждые 20 с в указанные моменты времени

В группе ЭС + SCH наблюдали аналогичную тенденцию, при этом величина ПТП была выше (рисунок 3.24).

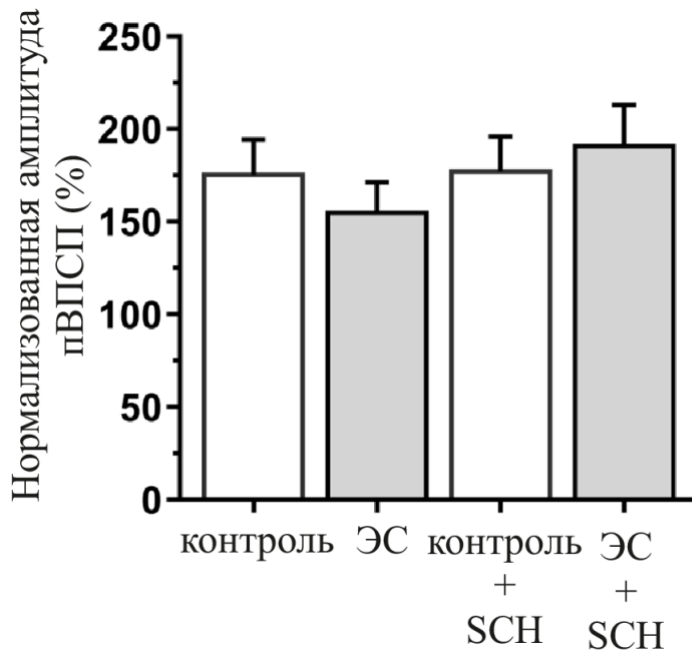


Рисунок 3.24 – Изменение величины посттетанической потенциации в ответ на эпилептический статус и фармакологическую блокаду PAR1

Долговременная пластичность

В следующей серии экспериментов исследовали изменения долговременной потенциации у контрольных и эпилептических животных в ответ на блокаду рецепторов PAR1. ДВП представляет собой длительное повышение эффективности синаптической передачи между нейронами, возникающее в результате их синхронной стимуляции. Предполагается, что усиление эффективности синаптической передачи обусловлено повышением чувствительности постсинаптического нейрона к сигналам, поступающим от пресинаптического. Этот процесс связан с активацией рецепторных комплексов и последующими внутриклеточными изменениями, увеличивающими амплитуду постсинаптического ответа. В отличие от механизмов кратковременной пластичности, ДВП включает не только пресинаптические, но и постсинаптические компоненты, в частности модуляцию активности глутаматных рецепторов, повышение внутриклеточной концентрации кальция и активацию сигнальных каскадов, приводящих к структурной перестройке синапса.

В исследовании использовали срезы центральной части гиппокампа ($n = 17$ контроль, $n = 23$ контроль + SCH, $n = 21$ ЭС, и $n = 20$ ЭС + SCH).

Целью настоящего этапа исследования было определение влияния ЭС на показатели ДВП, а также оценка эффекта фармакологической блокады PAR1 на данный процесс (рисунок 3.25).

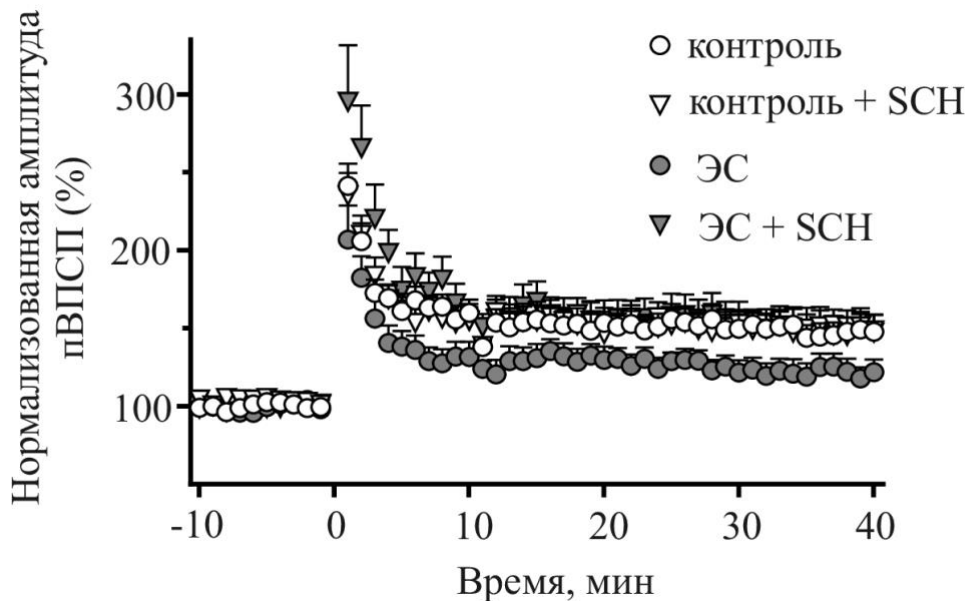


Рисунок 3.25 – Эффект фармакологической блокады PAR1 на изменения синаптической пластичности, вызванные эпилептическим статусом, в нейронной сети СА3-СА1 гиппокампа. Каждая точка представляет собой средние значения трех последовательных ответов, зарегистрированных каждые 20 с в указанные моменты времени

Уровень долговременной потенциации был значительно снижен в группе ЭС по сравнению с другими группами ($F(2,79, 55,94) = 413,1$; $p < 0,0001$; рисунок 3.26), что согласуется с данными литературы, полученными на взрослых животных, а также в постстатусных моделях хронической эпилепсии. Существенных различий по уровню посттетанической потенциации и ДВП между группами контроль, контроль + SCH и ЭС + SCH не выявлено.

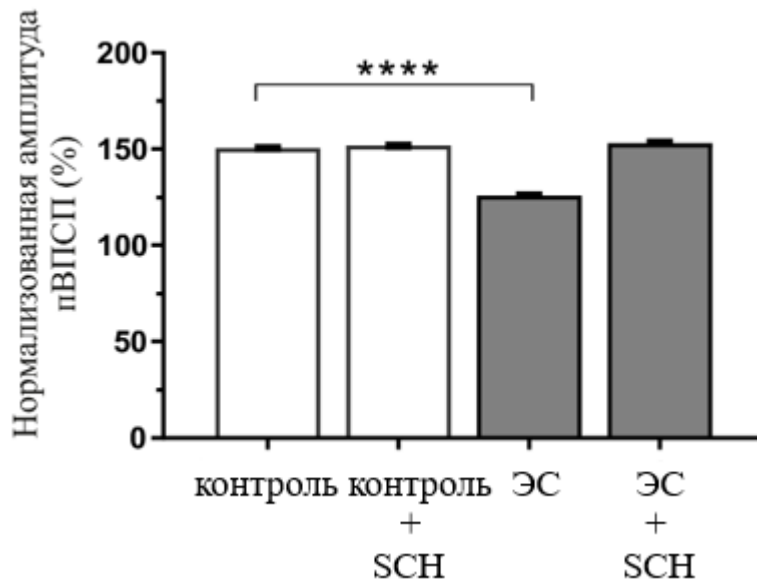


Рисунок 3.26 – Блокада PAR1 предотвращает ЭС-индуцированные нарушения долговременной пластичности. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка ($\pm$ SE). $^{**}p < 0,0001$ – по сравнению с группой контроль

В результате проведенного исследования было показано, что ингибирование PAR1 ослабляет вызванные ЭС изменения нейрональной пластичности в синаптическом пути CA3-CA1. Индуцированная в области CA1 синаптическая пластичность, как при парной, так и при высокочастотной стимуляции коллатералей Шаффера, была существенно нарушена после ЭС. Транзиторные и стойкие изменения кратковременной и долговременной синаптической пластичности в лимбической системе, характерные для различных моделей эпилепсии [177, 459, 508], соответствуют данным исследований на образцах мозга человека, в которых было показано нарушение NMDA-зависимой формы ДВП у пациентов с эпилепсией, имеющих первичный фокус судорожной активности в гиппокампе [61].

Гиппокамп, как структура, наиболее вовлеченная в патогенез эпилепсии и ответственная за большое количество поведенческих и когнитивных реакций, опосредует развитие тех неврологических нарушений, которыми чаще всего сопровождается эпилепсия. Современные электрофизиологические исследования предоставляют все больше данных о том, что эпилепсия провоцирует структурные

изменения в субъединичном составе рецепторов, участвующих в процессах синаптической пластичности [465]. В неонатальный период субъединицы NMDA-рецепторов соотносятся как $\text{GluN2B} > \text{GluN2A}$, тогда как во взрослом возрасте данное соотношение имеет вид $\text{GluN2A} > \text{GluN2B}$, при этом в гиппокампе взрослых животных значительно легче вызвать ДВП, чем в неонатальный период. На основании исследований субъединичного состава NMDA-рецепторов установлено, что за NMDA-зависимую ДВП преимущественно отвечает активация субъединиц GluN2A. Эксперименты с использованием литий-пилокарпиновой и каинатной моделей показали достоверное снижение показателей ДВП в области CA1 гиппокампа взрослых крыс, что может быть связано с изменением субъединичного состава NMDA-рецепторов. Кроме того, было показано, что селективное ингибирование GluN2B-субъединиц NMDA-рецепторов способствует сохранению ДВП на уровне контрольных значений. Таким образом, во-первых, был сделан вывод о влиянии эпилептических приступов и эпилептогенеза на структурные композиции NMDA-рецепторов (в том числе на основании исследований синаптической пластичности в 24-часовой период после индукции ЭС, показавших аналогичные результаты), а во-вторых, выдвинуто предположение, что именно этот эффект опосредует снижение уровня ДВП при эпилепсии [466]. Эти данные демонстрируют, что повышение возбудимости нейронных сетей в эпилептическом мозге приводит к изменениям синаптической эффективности и снижению способности к пластичности, что может играть важную роль в патофизиологии эпилепсии и сопутствующих ей поведенческих и психиатрических нарушений.

В нашем исследовании ингибирование PAR1 не оказывало влияния на PPF и ДВП в контрольной группе, но существенно изменяло синаптическую пластичность в группе после ЭС. Эти результаты позволяют предположить, что участие сигнальных путей, опосредованных PAR1, носит вспомогательный, но не обязательный характер в регуляции синаптической пластичности при нормальных условиях и становится критически значимым после ЭС.

Роль тромбина и его рецепторов в ЦНС становится все более очевидной. Показано, что тромбин, его предшественник – протромбин, а также его рецепторы экспрессируются нейронами и глиальными клетками в различных областях мозга и регулируют множество функций, включая контроль митоза глиальных клеток, рост и ветвление нейритов, а также выживаемость нейронов [42, 203, 539, 571, 608, 609]. Концентрация тромбина может повышаться в мозге вследствие нарушения целостности ГЭБ, вызывая воспалительный ответ, апоптоз и повышение нейрональной возбудимости через активацию PAR. В недавнем исследовании было обнаружено значительное увеличение уровня тромбина в области CA1 гиппокампа после индуцированного пилокарпином ЭС [266]. Было показано, что даже небольшое повышение концентрации тромбина может быть достаточным, чтобы существенно потенцировать NMDA-рецепторы [207]. Более того, введение тромбина не оказывало существенного влияния на NMDA-зависимые ответы нейронов у мышей линии C57Bl/6, у которых PAR1 генетически удален, что указывает на участие PAR1 в тромбин-индуцированной модуляции функции NMDA-рецепторов [26]. Потенцирование NMDA-рецепторов, в свою очередь, может усугублять глутаматергическую эксайтотоксичность и нейродегенерацию. Поскольку ДВП в синапсах коллатералей Шаффера – CA1 является NMDA-зависимой [418], мы предполагаем, что эффект ингибирования PAR1 на синаптическую пластичность гиппокампа может, по крайней мере частично, объясняться ослаблением действия, вызванного ЭС повышения тромбина на функцию NMDA-рецепторов.

Другим возможным механизмом влияния ингибирования PAR1 на синаптическую пластичность в нашем исследовании может быть подавление ЭС-индуцированных провоспалительных путей, способных нарушать синаптическую пластичность гиппокампа [229].

3.5.2 Влияние фармакологической блокады PAR1 на поведенческие реакции крыс

Поведенческие тесты является важным этапом физиологических исследований, который помогает не только определить фенотип расстройства, связанного с влиянием внешних факторов, но также способствует определению дальнейшей стратегии исследований [230].

Большинство исследований поведения направлено не просто на выявление изменений определенной поведенческой реакции, но и на определение структуры ЦНС, вовлеченной в ее реализацию. Так, тест «водный лабиринт Морриса» в первую очередь определяет нарушения функции гиппокампа, а результаты теста «открытое поле» могут быть связаны с расстройствами таких структур, как вентральный гиппокамп и миндалевидный комплекс.

Было предположено, что изменения синаптической пластичности гиппокампа при блокаде PAR1 у животных после ЭС могут отражаться на различных формах поведенческих реакций крыс. Известно, что гиппокамп является ключевой структурой, обеспечивающей процессы пространственной памяти, контекстного обучения и эмоциональной регуляции. Его функциональная целостность тесно связана с когнитивными и аффективными параметрами поведения, а нарушение синаптической пластичности, в том числе ДВП, рассматривается как один из нейрофизиологических маркеров когнитивного дефицита при эпилепсии.

Учитывая результаты, полученные на предыдущем этапе, следующим шагом исследования стало определение того, будут ли изменения пластичности гиппокампа при блокаде PAR1 и после эпилептического статуса отражаться на различных формах поведенческих реакций. В первую очередь внимание уделялось исследованию пространственного обучения в тесте водного лабиринта Морриса – классической парадигме, чувствительной к функциональному состоянию нейронных сетей гиппокампа. Кроме того, учитывая участие гиппокампа и прилежащих структур лимбической системы в регуляции эмоциональных и

мотивационных состояний, были проведены тесты, направленные на анализ уровня тревожности («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт»), эмоциональной возбудимости и социального взаимодействия.

Такое комплексное сочетание нейрофизиологического и поведенческого подходов позволяет более полно оценить функциональные последствия модуляции PAR1 в условиях эпилептического поражения мозга. Подобный подход важен с точки зрения не только фундаментального понимания межуровневых механизмов нейропластичности, но и потенциала PAR1 как молекулярной мишени для разработки новых стратегий нейропротективной терапии эпилепсии и сопутствующих когнитивно-эмоциональных нарушений.

Пространственное обучение

Время, необходимое животному для поиска платформы, уменьшалось с одинаковой скоростью для всех четырех экспериментальных групп. Однако время, необходимое животным после эпилептического статуса было значительно большим, чем в обеих группах контроля. В течение тренировочного дня животные после эпилептического статуса также демонстрировали меньшую скорость обучения, при этом поведение таких животных в первый тестовый день показывало полное отсутствие полученного в тренировочный день навыка в отличие от результатов, которые демонстрировали контрольные животные.

В результате проведенных исследований с использованием водного лабиринта Морриса, было установлено, что группы экспериментальных животных после эпилептического статуса вне зависимости от влияния блокатора PAR1, затрачивала значительно больше времени для нахождения скрытой платформы по сравнению с контрольными группами (фактор времени: $F(4, 124) = 36,94$, $p < 0,0001$; фактор группы: $F(3, 31) = 8,59$, $p < 0,0005$; рисунок 3.28). Исходя из полученных результатов следует, что фармакологическая блокада PAR1 не влияет на процессы нарушения пространственной памяти у животных после эпилептического статуса.

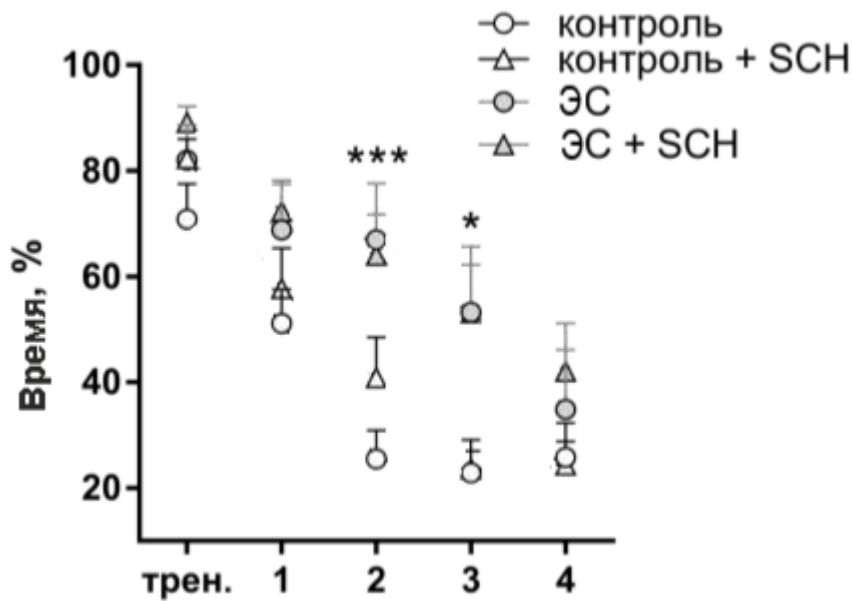


Рисунок 3.28 – Влияние селективного ингибитора PAR1 на пространственное обучение крыс с эпилептическим статусом в водном лабиринте Морриса. По оси абсцисс – дни тестирования. По оси ординат – время поиска скрытой платформы (%).

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ относительно контроля

Исследования, проведенные на моделях с повреждением гиппокампа, показывают, что пространственное обучение в значительной степени зависит от сохранности его функций [397]. Когнитивные нарушения – в частности, расстройства обучения и памяти – представляют собой серьезную проблему у пациентов с височной эпилепсией. Для более глубокого понимания природы таких коморбидных состояний при эпилепсии были разработаны различные экспериментальные модели исследуемого расстройства со склерозом гиппокампа. Степень выраженности выявленных нарушений памяти варьирует в зависимости от характеристик подопытных животных (возраста, пола, вида и т. д.) и используемой модели.

Тяжелые нарушения пространственной памяти, зависящей от функций гиппокампа, были отмечены у взрослых крыс при применении пилокарпиновой модели височной эпилепсии [261]. В нашем исследовании крысы после ЭС смогли

освоить поведенческое задание в тесте водного лабиринта Морриса, однако им потребовалось больше времени для достижения критериев обучения по сравнению с контрольной группой. Этот результат согласуется с данными о дефиците пространственной памяти у молодых крыс с пилокарпин-индуцированным ЭС [439].

В отличие от выраженного влияния на ДВП гиппокампа в группе ЭС, ингибирование PAR1 не оказывало значимого эффекта на поведение животных в тесте Морриса. Хотя NMDA-зависимая ДВП (в частности, в области CA1) долгое время рассматривалась как клеточная основа пространственного обучения и памяти, недавние исследования с использованием генетически модифицированных животных поставили эту гипотезу под сомнение. Так, удаление субъединицы GluN2A рецептора NMDA во всем мозге вызывало снижение ДВП в гиппокампе и выраженные нарушения пространственного обучения [492]. Однако при селективной делеции субъединицы GluN1 из гранулярных клеток зубчатой извилины и пирамидных нейронов дорсальной области CA1 ухудшение ДВП не сопровождалось нарушением поведения животных в водном лабиринте [54]. Эти данные указывают на то, что, хотя NMDA-рецепторы играют важную роль в процессах пространственного обучения, NMDA-зависимая ДВП гиппокампа не является обязательной для кодирования пространственных воспоминаний.

Тревожность и локомоторная активность

Тест «открытое поле» является классическим методом для оценки уровня тревожности, исследовательского поведения и локомоторной активности крыс. Длительность нахождения крыс в разных участках установки во время проведения теста «открытое поле» оценивали в процентах: как соотношение времени, проведенного животным в центре, к общей продолжительности эксперимента.

Относительное время пребывания крыс группы ЭС в центральной зоне арены было достоверно выше по сравнению с другими группами ($H = 6,29$, $p = 0,09$; post-hoc анализ ЭС и ЭС + SCH: $p = 0,02$; рисунок 3.29).

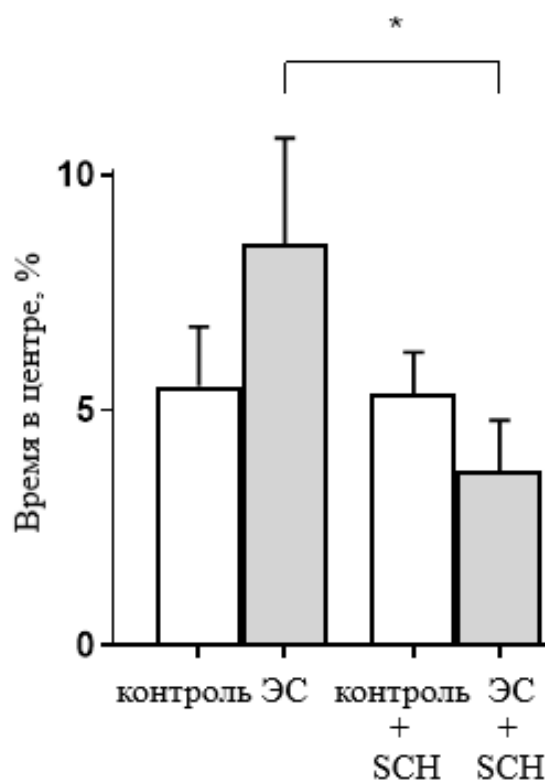


Рисунок 3.29 – Влияние блокады PAR1 на время, проведенное экспериментальными животными в центре «открытого поля». По оси абсцисс указаны группы животных. По оси ординат указано время, проведенное животными в центре арены (%). * $p < 0,05$

Достоверных различий по показателю локомоторной активности, выраженному как общая пройденная дистанция, выявлено не было. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии эффекта блокатора PAR1 на уровень тревожности крыс после эпилептического статуса. Анализ локомоторной активности также констатирует отсутствие значимых изменений в пройденной дистанции между экспериментальными группами, что может свидетельствовать о сохранении общей двигательной активности во время латентной стадии формирования эпилепсии, которая является проявлением исследовательского поведения. Полученные данные согласуются с рядом исследований, в которых использовали пилокарпиновую и каинатную модели приступов. Как показали исследования, ЭС у крыс вызывает снижение уровня тревожности [180, 262, 369]. Подобное анксиолитическое поведение наблюдали у крыс с вентральными

поражениями гиппокампа. Эта зона особенно чувствительна во время височной эпилепсии, чем другие отделы лимбической системы.

Согласно многочисленным данным, помимо участия в процессах обучения и памяти, гиппокамп играет важную роль в формировании эмоционально обусловленного поведения [56]. Было показано, что целенаправленные (таргетированные) повреждения гиппокампа вызывают анксиолитический эффект в различных поведенческих тестах, при этом характер таких изменений отличается от эффектов, наблюдаемых при повреждении миндалевидного тела. Эти данные подтверждают специфическую роль гиппокампа в обработке эмоциональных реакций [376].

Нарушения, проявляющиеся в виде тревожного поведения, выявленные у эпилептических животных в настоящем исследовании, согласуются с результатами, полученными на различных экспериментальных моделях височной эпилепсии со склерозом гиппокампа, и соотносятся с клиническими наблюдениями, указывающими на взаимосвязь между эпилепсией и эмоциональными расстройствами [93, 262, 551].

В нашем исследовании ингибирование PAR1 восстанавливало поведенческие показатели молодых животных в тесте «открытое поле» после индуцированного эпилептического статуса, доводя их до уровня контрольных значений.

Ранее, в работе на взрослых крысах, также было показано, что ингибирование PAR1 также нормализует тревожное поведение у животных с хронической эпилепсией. Полученные результаты позволяют предположить, что снижение активности сигнального пути PAR1 оказывает влияние на поведенческие нарушения, индуцированные эпилептическим статусом, и может проявляться в различные периоды онтогенеза [83].

Механизмы, лежащие в основе эффекта ингибирования PAR1 на уровень тревожности после ЭС, вероятно, многофакторны. Предполагается, что PAR1 участвует в регуляции эмоциональных реакций через модуляцию активности NMDA-рецепторов гиппокампа, поскольку ключевая роль этих рецепторов в

механизмах тревожного поведения подтверждена фармакологическими и генетическими исследованиями [415, 420].

Кроме того, как отмечали ранее, ингибирование PAR1 после ЭС оказывает нейропротективный эффект в области CA1 гиппокампа, что, вероятно, способствует снижению зависимых от гиппокампа поведенческих нарушений.

Эмоциональная возбудимость

Наблюдения за животными, проведенные через две недели после инициации эпилептического статуса (ЭС), показали повышение уровня тревожности, а также выраженную поведенческую реакцию на приближение экспериментатора и звуковые раздражители, что соответствует данным предыдущих исследований [254, 479].

Для оценки влияния блокады PAR1 на поведенческую возбудимость подопытных животных были проведены три теста: тест на реакцию при приближении предмета к животному, тест при поднятии животного и тест на реакцию при прикосновении к нему. Благодаря своей простоте и возможности оперативного получения результатов, поведенческие тесты на определение возбудимости широко применяются в различных лабораториях для оценки токсичности веществ [399], проведения фармакологических исследований и тестирования противосеизмических соединений, которые воздействуют на разные молекулярные механизмы в латентный период после индукции ЭС, вызванного как электрическим, так и химическим способом [91, 254, 479].

Исследование поведенческих реакций осуществляли через 14 дней после инициации ЭС. Всех животных тестировали в своих клетках во избежание реакции на незнакомую среду.

Была установлена статистически значимая разница между контрольными и эпилептическими животными во всех тестах ($p < 0,05$, рисунок 3.30-32), что соответствует литературным данным по влиянию ЭС на поведенческую возбудимость взрослых животных в литий-пилокарпиновой модели ЭС [25], однако полученные результаты представляют новые данные для ювенильного возраста.

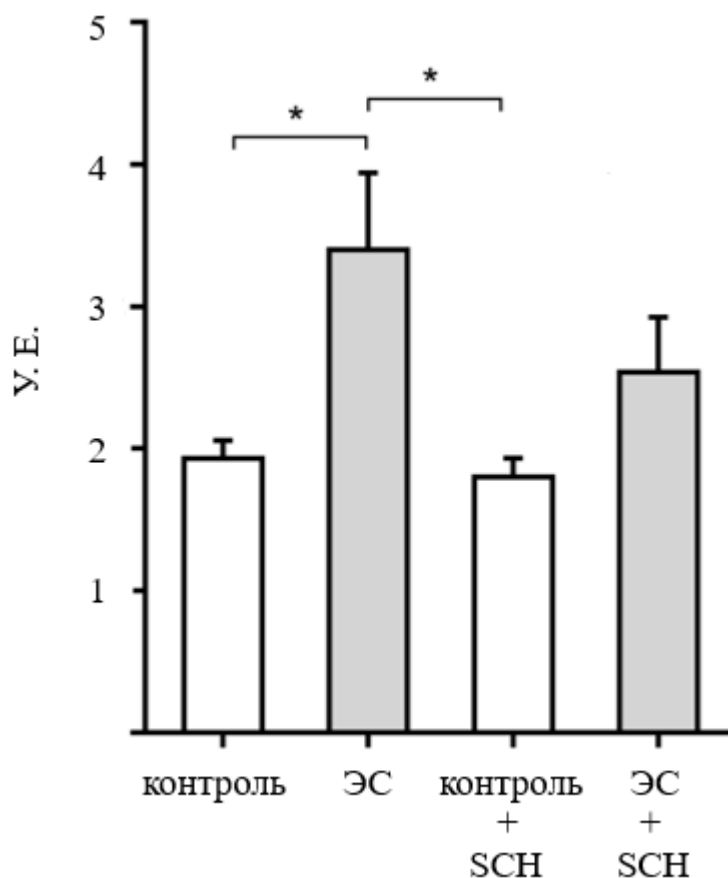


Рисунок 3.30 – Влияние блокады PAR1 на эмоциональную возбудимость животных в тесте на реакцию при приближении предмета. По оси абсцисс указаны группы животных. По оси ординат указаны баллы по шкале поведенческих реакций.

* $p < 0,05$

Кроме того, наши результаты согласуются с данными, полученными при проведении наблюдательных тестов на взрослых животных. Так, было показано, что после индукции ЭС животные чаще проявляют агрессивное поведение и повышенную возбудимость [539]. Между контрольными группами животных, одна из которых получала инъекцию SCH, не выявили существенных различий, что свидетельствует об отсутствии эффекта селективного антагониста PAR1 для контрольных животных. Между группами контроль / контроль + SCH и ЭС + SCH не наблюдали значимой разницы в тесте на реакцию при приближении предмета (рисунок 3.30), что указывает на восстановление поведенческих реакций животных с историей ЭС в условиях блокады PAR1.

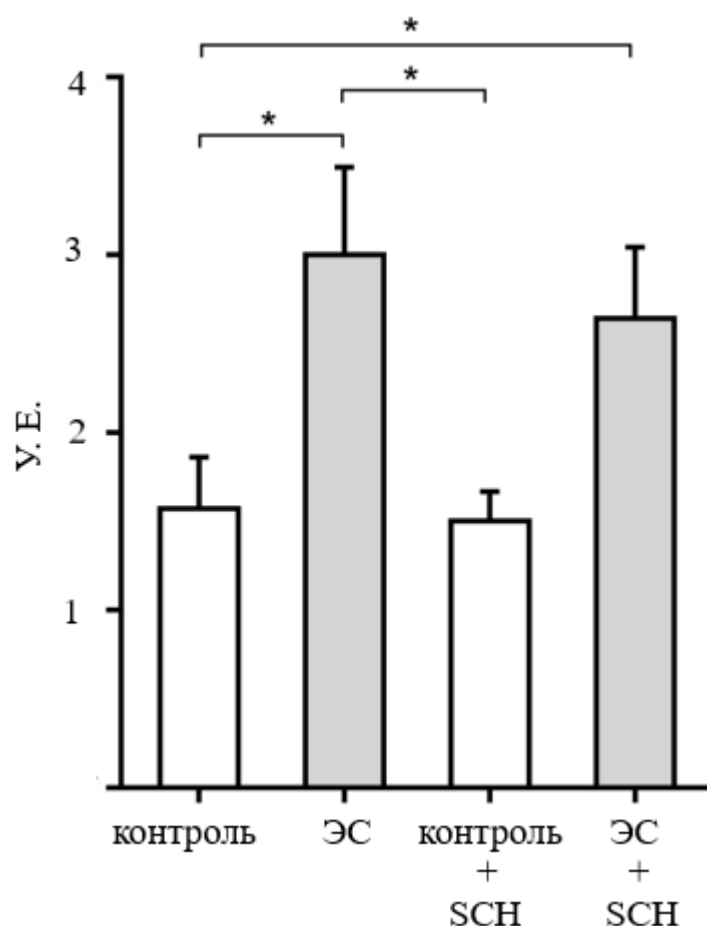


Рисунок 3.31 – Влияние блокады PAR1 на эмоциональную возбудимость животных в тесте на реакцию при прикосновении. По оси абсцисс указаны группы животных. По оси ординат указаны баллы по шкале поведенческих реакций. * $p < 0,05$

В тесте на реакцию при прикосновении не обнаружили положительного эффекта ингибирования PAR1 для животных после ЭС (рисунок 3.31).

В тесте при поднятии животного, который считается самым чувствительным в данной серии поведенческих тестов [25], снижался уровень возбудимости у животных из группы ЭС + SCH в сравнении с крысами группы ЭС ($p = 0,04$; рисунок 3.32).

В результате проведенных экспериментов продемонстрировали положительный эффект блокирования PAR1 на эмоциональное состояние крыс через 14 дней после ЭС, в тоже время предыдущие данные свидетельствуют о том, что для хронического состояния (8 недель после ЭС) такой эффект не сохраняется

[350]. То есть блокирование PAR1 существенно улучшает состояние животных именно на начальных этапах развития расстройства.

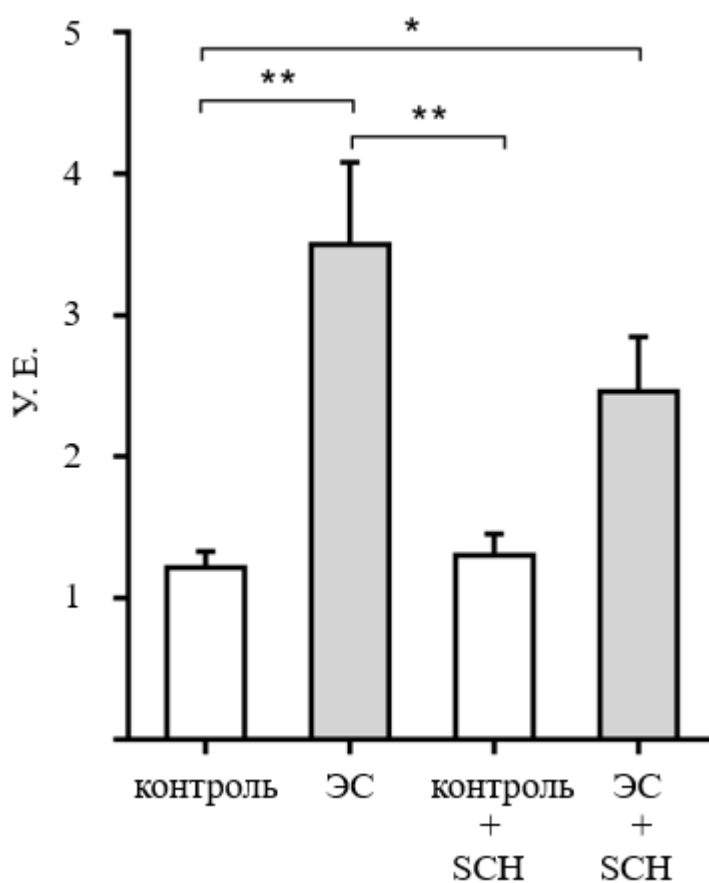


Рисунок 3.32 – Влияние блокады PAR1 на эмоциональную возбудимость животных в тесте на реакцию при поднятии. По оси абсцисс указаны группы животных. По оси ординат указаны баллы по шкале поведенческих реакций.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$

Для травматической эпилепсии выдвигаются идеи относительно терапевтического вмешательства в первый час после травмы [554], а результаты относительно блокады PAR1 гипотетически могут быть использованы для посттравматической терапии пациентов. PAR1-опосредованная передача участвует в большом количестве нервных процессов. В моделях никотиновой и морфиновой зависимостей активация PAR1 на дофаминэргических нейронах регулирует никотининдуцированные дофаминовые выбросы [457]. Активация PAR1 в

астроцитах приводит к везикулярному высвобождению глутамата, и, таким образом, влияет на функционирование NMDA-рецепторов [251]. Таким образом, PAR1 способны воздействовать на синаптическую пластичность и поведенческие реакции через опосредованные процессы в трехсторонних синапсах [499].

Поведенческие тесты демонстрируют вовлеченность PAR1-опосредованной сигнализации в работу гиппокампа и миндалевидного комплекса [26, 358]. В тесте на пассивное избегание показано уменьшение реакции у животных с нокаутом гена F2R, который кодирует экспрессию PAR1 [25]. Введение блокатора PAR1 в миндалинду приводило к увеличению времени замирания в тесте на формирование реакции страха у мышей [88].

Положительное влияния блокады PAR1 на эмоциональное поведение в общем и на эмоциональную возбудимость после ЭС, в частности, можно объяснить различными механизмами, которые требуют дальнейшего изучения.

Социальное поведение

Существуют данные о том, что около 30 % детей, страдающих эпилепсией, имеют склонность к развитию расстройств аутистического спектра (РАС) [72, 569]. Такие пациенты характеризуются в прежде всего нарушениями в сфере социальных взаимодействий и коммуникаций. Как дети, так и взрослые испытывают различные психоэмоциональные нарушения, сопровождающие эпилепсию, такие как тревожность, депрессия и другие. Вероятными причинами, обуславливающими развитие РАС, являются разбалансировка между возбуждающей и тормозной синаптической передачей в коре головного мозга, а также ослабление функциональной связи между лобной долей коры и другими областями мозга, что типично для эпилепсии. Обследования пациентов с РАС демонстрируют нарушения в ГАМК-ергической синаптической системе, что характерно как для РАС, так и для эпилепсии [124]. В лечении эпилепсии важно не только снижение частоты и интенсивности приступов, но и улучшение качества жизни пациентов. Поэтому большое значение имеют исследования, направленные на изучение влияния потенциальных противоэпилептических препаратов на эмоционально обусловленные и социальные формы поведения. Недавние исследования

показывают, что PAR1 играют важную роль в развитии приобретенной эпилепсии. С использованием литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии установлено, что ингибирование этих рецепторов во время эпилептогенеза оказывает противозепилептогенное и нейропротекторное действие, а также приводит к нормализации тревожного поведения подопытных животных [94, 266].

PAR1 является наиболее распространенным тромбиновым рецептором ЦНС, который экспрессируется на нейронах и глиальных клетках гиппокампа, коры головного мозга, стриатума, миндалины, базальных ганглиев [94, 228, 300]. Именно эти области мозга наиболее уязвимы при височной эпилепсии и отвечают за обработку психоэмоциональных реакций, а также за социальное и личностное поведение. Известно, что ЭС приводит к снижению социальной активности и изменениям характера социального поведения, однако причины этих изменений до конца не выяснены. Целью настоящего этапа исследования было установление роли PAR1 в модуляции социального поведения крыс после ЭС.

Исследование поведенческих реакций животных осуществляли через 14 дней после индукции ЭС. Установлено, что во время первой сессии крысы с ЭС проводили значительно меньше времени с «социальным раздражителем», чем контрольные животные ($t = 3,53$, $df = 29$; $p = 0,001$). Контрольные животные взаимодействовали с субъектом (крысой) $15,04 \pm 1,59$ % от общего времени эксперимента и $5,35 \pm 0,70$ % с объектом ($t = 5,29$, $df = 32$, $p = 0,0001$; животные с ЭС $5,85 \pm 1,11$ % времени с субъектом и $3,39 \pm 0,78$ % времени с объектом ($t = 2,37$, $df = 20$, $p = 0,03$; рисунок 3.33).

Изменения во времени, проведенном вместе с «социальным» и «несоциальным» раздражителями, не зависели от общего количества пересечений центральной камеры ($p = 0,34$, по сравнению с количеством пересечений у животных из контрольной и ЭС-групп, не получавших SCH). Это свидетельствует о том, что животные с ЭС не только чаще перемещались из одной боковой камеры в другую, проявляя гиперактивный фенотип поведения во время теста, но и проводили меньше времени в социальном взаимодействии.

Для исследования влияния антагониста PAR1 на поведение подопытных животных во время первой сессии был выполнен сравнительный анализ времени, проведенного крысами рядом с «социальным» и «несоциальным» раздражителями, а также соотношения этих показателей между группой с ЭС и остальными группами. Статистически достоверных различий по данным параметрам не обнаружено ($p > 0,05$ во всех случаях). Следует отметить, что общая тенденция проводить больше времени с животным, чем с неживым объектом, сохранялась у всех групп.

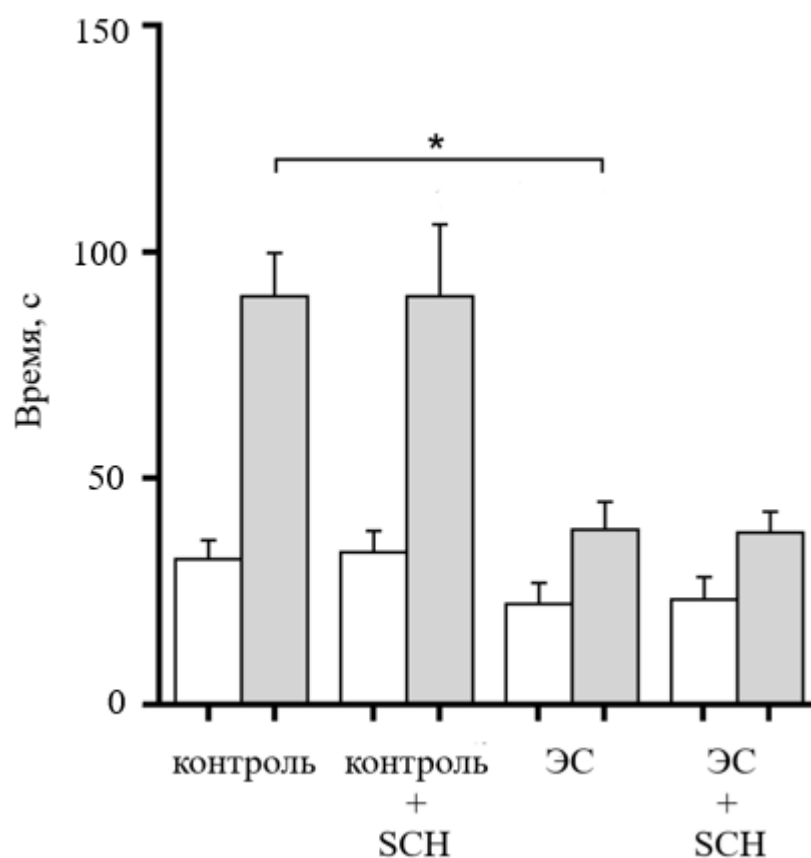


Рисунок 3.33 – Влияние блокады PAR1 на уровень общительности животных, где белые столбцы – время, проведенное с объектом, серые – время, проведенное с субъектом. * $p < 0,05$

Во время второй сессии теста, отражающей реакцию подопытных животных на социальную новизну, крысы с ЭС проводили меньше времени с незнакомым животным по сравнению с контрольной группой ($U = 30,5$, $p = 0,0004$; рисунок 3.34).

Более того, контрольные животные отдавали предпочтение общению с незнакомой крысой по сравнению со знакомой из предыдущей сессии ($13,87 \pm 2,03$ % от общего времени рядом с незнакомым животным против $8,17 \pm 1,22$ % времени рядом со знакомым). В то же время животные с ЭС не различали уровня своего интереса к незнакомому и знакомому животному ($4,23 \pm 1,48$ % от общего времени рядом с незнакомым против $3,12 \pm 0,74$ % времени рядом со знакомым).

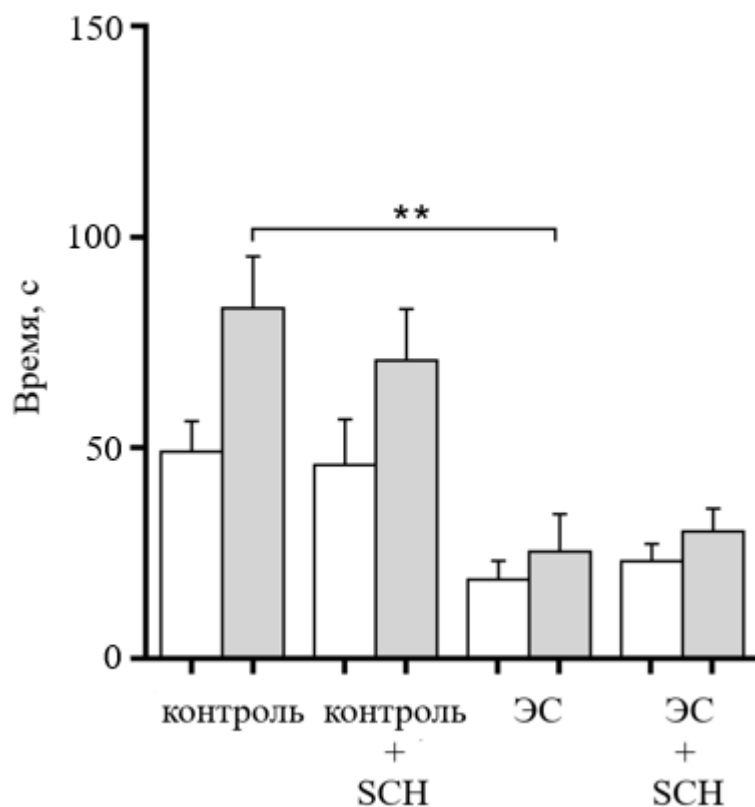


Рисунок 3.34 – Влияние блокады PAR1 на поведение подопытных животных в тесте на социальную новизну, где белые столбцы – время проведенное, со знакомым субъектом, серые – время, проведенное с незнакомым. $**p < 0,005$

Оценивали общее время, проведенное подопытными животными рядом с социальными раздражителями (знакомая и незнакомая крыса) в течение первой и второй сессий (общее социальное взаимодействие; рисунок 3.35).

Было установлено снижение данного показателя у животных с ЭС по сравнению с контрольными, что свидетельствует об уменьшении общего социального интереса после ЭС. Различий между уровнем интереса к социальной

новизне у животных ЭС-групп, получавших и не получавших SCH, не наблюдалось, также, как и между обеими контрольными группами.

Эффект блокады PAR1 на общее время, проведенное в социальном взаимодействии, также не выявлен ни в контроле, ни в группе животных после ЭС (рисунок 3.35).

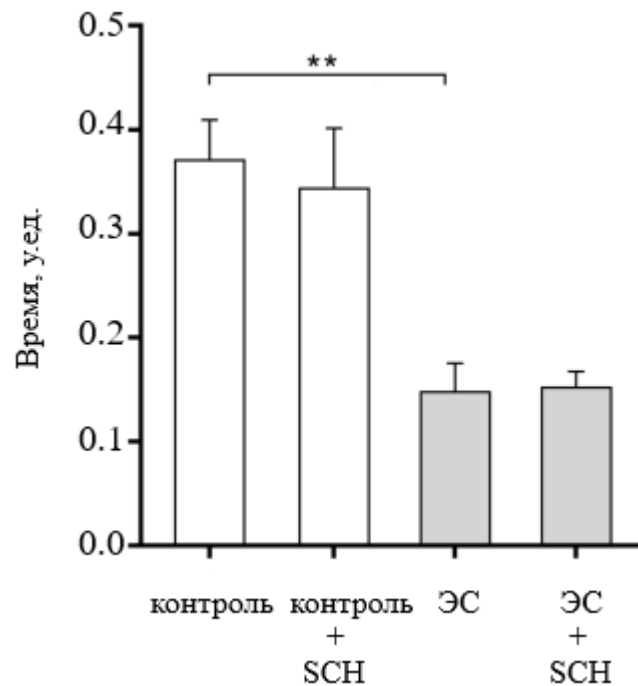


Рисунок 3.35 – Влияние блокады PAR1 на общее время, проведенное подопытными животными в социальном взаимодействии в двух сериях теста.

$**p < 0,005$

В настоящем исследовании установлено значительное снижение общительности и интереса к социальной новизне у крыс после ЭС по сравнению с контролем. Продемонстрировано отсутствие влияния блокады PAR1 на параметры социального поведения крыс как в контрольных условиях, так и при моделировании ЭС. Снижение общительности и интереса к социальной новизне у животных с ЭС согласуется с данными предыдущих исследований, проведенных с использованием различных моделей приступов, а также соответствует клиническим наблюдениям психических нарушений при эпилепсии [566].

Клеточные механизмы, лежащие в основе формирования социального поведения, остаются недостаточно изученными, однако показана вовлеченность лобных и височных отделов коры, гиппокампа и миндалины [309]. Клинические данные свидетельствуют, что у пациентов с эпилепсией часто развиваются психоэмоциональные расстройства социального поведения, такие как социальная тревожность, заторможенность и повышенная агрессивность [566]. Считается, что эти нарушения связаны с дисфункцией лимбической системы.

Снижение интереса к социальному взаимодействию при эпилепсии может быть также обусловлено депрессивными расстройствами [401]. Тревожные расстройства, в свою очередь, по-прежнему редко своевременно диагностируются и адекватно лечатся, что во многом объясняется отсутствием специфических инструментов скрининга и частым сочетанием с аффективными нарушениями. Данные о терапии этих состояний остаются ограниченными, и клиническая практика по-прежнему во многом опирается на индивидуальный опыт специалистов.

Социальное поведение как многофакторный и сложный процесс зависит от скоординированной деятельности различных отделов ЦНС. Эпилептические состояния, напротив, сопровождаются дисбалансом между возбуждающими и тормозными нейронными системами, что может определять наблюдаемые изменения социального поведения.

Важную роль в восприятии и формировании ответа на социальные раздражители играют лобные доли коры головного мозга. Показано, что дисбаланс связей этого отдела с другими структурами мозга может лежать в основе развития РАС [164]. Кроме того, одним из механизмов развития эпилепсии считается нарушение обмена триптофана [134], в результате которого в мозге снижается уровень серотонина и повышается концентрация кинуренина, что приводит к увеличению возбудимости нейронных сетей. Также установлено, что нарушение социального поведения может быть связано с истощением серотонинергической системы лобных отделов коры головного мозга [312].

В нашем исследовании впервые продемонстрировано, что блокада PAR1 не оказывает влияния на характеристики социального поведения подопытных животных как в контрольных условиях, так и при моделировании эпилепсии. Отсутствие влияния угнетения активности PAR1 на поведение крыс в контрольных условиях согласуется с данными предыдущей главы, посвященной исследованию роли PAR1-опосредованной сигнализации в регуляции аффективного поведения.

Электрофизиологические исследования на нейронах гиппокампа [26, 513] также демонстрируют отсутствие эффекта блокады PAR1 на функционирование нейронных сетей в норме. Следует отметить, что в условиях моделирования эпилепсии ингибирование PAR1 в течение первых 10 дней после ЭС приводило к нормализации тревожного поведения и эмоционально-обусловленной памяти у крыс на хронической стадии развития приобретенной эпилепсии [83]. Установлено, что у животных с нокаутом гена F2R, кодирующего экспрессию PAR1, наблюдалось снижение реакции в тесте пассивного избегания и увеличение времени замирания в тесте формирования условной реакции страха [26, 88]. Введение блокатора PAR1 непосредственно в миндалевидный комплекс также вызывало увеличение времени замирания в тесте на формирование реакции страха у мышей [88]. Эти данные указывают на вовлеченность PAR1 в работу гиппокампальных структур [26, 359].

В работе с использованием мышей с нокаутом гена PAR1 (PAR1^{-/-}), направленной на исследование вклада данного рецептора в процессы памяти и синаптические функции, было показано, что у этих животных наблюдались нарушения формирования памяти, зависимой от гиппокампа. Также установлено, что при нормальной базовой синаптической передаче в CA3-CA1-синапсах у мышей PAR1^{-/-} выявлялись значительные дефициты активации NMDA-рецепторов [25].

Мы полагаем, что дифференциальный характер влияния ингибирования PAR1 на различные формы поведения животных после ЭС может объясняться неравномерным вкладом PAR1-опосредованной сигнализации в функционирование отдельных отделов ЦНС.

3.6 Синаптическая передача нейронных сетей гиппокампа в условиях ферментативной модификации поверхностного заряда мембраны нейронов

Отрицательно заряженные полисиаловые кислоты (ПСК) играют важную роль в регуляции нейрональной возбудимости. ПСК представляют собой углеводный полимер, состоящий из повторяющихся мономеров сиаловой кислоты, соединенных $\alpha 2,8$ -гликозидными связями. Эти молекулы в значительном количестве экспонированы на внешней поверхности мембраны нейронов и участвуют во множестве клеточных функций [390].

В головном мозге основными носителями сиаловых кислот являются нейронные молекулы клеточной адгезии NCAM и потенциал-зависимые натриевые каналы [57, 491]. Оба белка отличаются высокой степенью гликозилирования и содержат значительное количество сиаловых остатков во внеклеточных доменах.

Ключевым регулятором уровня сиализации мембраны является эндогенный фермент нейраминидаза. Удаление ПСК при участии нейраминидазы вызывает деполяризующий сдвиг кинетики активации натриевых каналов, повышает порог возбуждения и снижает эпилептиформную активность, что в целом уменьшает судорожную готовность гиппокампа крыс [264]. Кроме того, десиализация NCAM оказывает влияние на миграцию клеток, аксональный рост и синаптогенез [85].

Несмотря на важность нейраминидазы для функционирования мозга, влияние дефицита эндогенной ферментативной активности на клеточные и сетевые механизмы изучено недостаточно. Тем не менее, накопленные данные указывают на возможную связь между снижением нейраминидазы и повышением нейрональной возбудимости. Так, было показано, что блокада эндогенной нейраминидазы усиливает вероятность судорог и усугубляет гиппокампальные эпилептиформные разряды *in vivo*. Фармакологические ингибиторы нейраминидазы повышают нейрональную синхронизацию и вызывают концентрационно-зависимый рост популяционной активности в СА3 гиппокампа. Клинические наблюдения демонстрируют, что судороги являются

распространенным симптомом заболеваний, связанных с нарушением метаболизма сиаловых кислот или дефицитом нейраминидазы [206, 364, 578].

Ранние исследования демонстрируют, что добавление блокатора нейраминидазы в раствор перфузии вызывает в срезах гиппокампа появление спонтанной эпилептиформной активности [271]. Также было показано, что ингибирование данного фермента снижает порог возникновения эпилептических приступов как *in vivo* [264], так и в условиях *in vitro*-моделей эпилепсии [272, 503].

3.6.1 Изменение значений синаптической эффективности пирамидных нейронов гиппокампа под действием блокатора нейраминидазы

Целью настоящего этапа исследования явилось определение механизмов повышения возбудимости при дефиците эндогенной нейраминидазы.

Мы оценивали изменения синаптической эффективности CA1 области пирамидного слоя в условиях ингибирования нейраминидазы путем построения кривых зависимости величины амплитуды ПС от интенсивности стимуляции внеклеточного тока (рисунок 3.36), которые генерировали до и через 30 мин после высокочастотной стимуляции, состоящей из 100 импульсов, наносимых с частотой 100 Гц.

Постепенное повышение интенсивности стимуляции от 100 до 500 мкА с шагом 50 мкА вызывало увеличение амплитуды ПС в срезах, инкубированных с NADNA ($n = 10$), через 30 мин после высокочастотной стимуляции по сравнению с контрольными срезами ($n = 9$) как до, так и после тетанической стимуляции. Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с повторными измерениями выявил значительный эффект применения NADNA на кривые «вход-выход» до тетанической стимуляции (фактор группы $F_{1,17} = 14,69$; $p = 0,0013$), а также через 30 мин после применения стимуляционного протокола (фактор группы $F_{1,17} = 5,41$; $p = 0,03$).

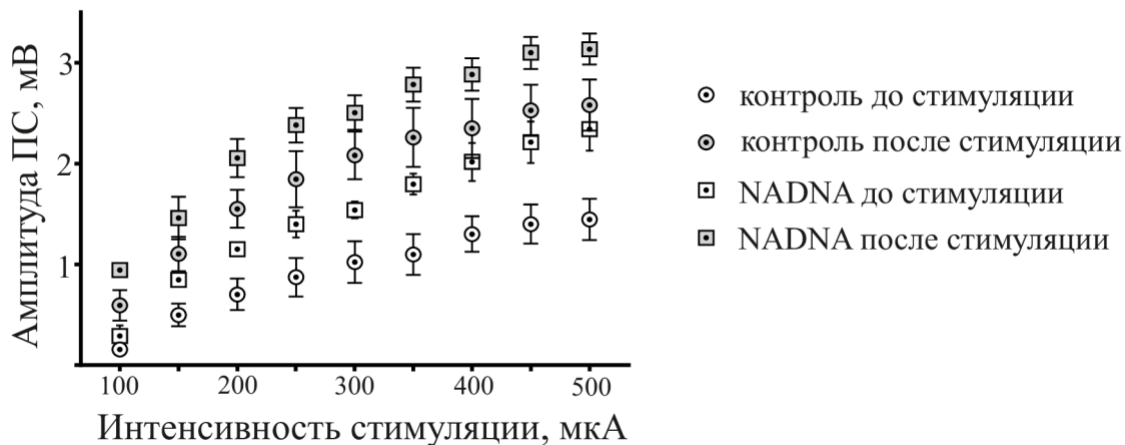


Рисунок 3.36 – Изменение амплитуды популяционных спайков в ответ на возрастающую стимуляцию (100 до 500 мкА) отражает усиление синаптической передачи в сети CA3-CA1 при ингибировании нейраминидазы.

Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего

Результаты предыдущей работы демонстрируют существенное увеличение плотности простых и перфорированных синапсов области CA1 гиппокампа вследствие блокады нейраминидазы [271].

Для исследования функциональных возможностей новообразованных контактов, оценивали средние и максимальные значения амплитуды ПС в контрольных ($n = 16$) и инкубированных с NADNA срезах ($n = 17$). Было выявлено существенное увеличение максимальных значений амплитуды популяционных спайков в обработанных NADNA срезах, по сравнению с контрольными (NADNA: $2,29 \pm 0,09$ мВ; контроль: $1,64 \pm 0,13$ мВ, $t_{31} = 4,1$; $p < 0,001$).

Анализ средних значений ПС, которые составляли 30 % максимальной амплитуды, показал существенное уменьшение коэффициента вариативности популяционных явлений в ответ на ингибирование нейраминидазы (контроль: $0,12 \pm 0,01$; NADNA: $0,08 \pm 0,01$; $t_{31} = 3,1$, $p < 0,01$; рисунок 3.37).

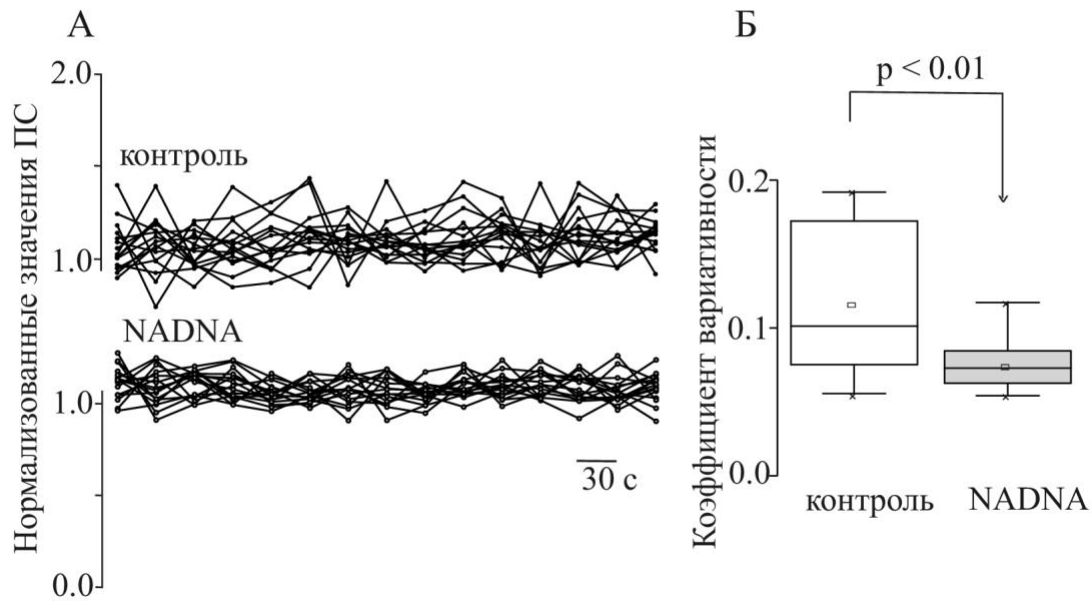


Рисунок 3.37 – Эффект блокады нейраминидазы на вариативность вызванных популяционных спайков в пирамидном слое CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа: А – вариативность средних значений ПС, отведенных каждые 30 с в контрольных и обработанных NADNA срезах. Каждое значение на графике отображает нормализованную усредненную амплитуду ПС одного среза; Б – результаты статистического сравнения коэффициента вариативности средних ПС в условиях угнетения нейраминидазы

Полевые ПС состоят из N-метил-D-аспаратного (NMDA) и non-NMDA-рецептор-опосредованного компонентов. Для установления вероятной разницы влияния NADNA на эти компоненты, применяли специфический антагонист NMDA-рецепторов D-амино-5-фосфоновалериановую кислоту (D-APV) и блокатор non-NMDA-рецепторов 6-циано-7-нитроквиноксалин-2,3-дион (CNQX). Добавление 50 мкмоль D-APV вызывало умеренное снижение в показателях базового синаптического ответа в обеих группах (контроль: $89,8 \pm 2,9 \%$, $n = 9$; NADNA: $86,4 \pm 4,3 \%$, $n = 10$). Остаточный компонент пВПСП был полностью ослаблен после добавления 10 мкмоль CNQX. Полученные результаты свидетельствуют о том, что блокада нейраминидазы одинаково влияет как на NMDA-, так и на non-NMDA-компоненты синаптических ответов.

Существенное увеличение процента перфорированных синапсов в области CA1 было продемонстрировано в культуре срезов гиппокампа после ингибирования нейраминидазной активности. Изменение плотности таких синапсов рассматривается как морфологический маркер активационно-зависимого синаптогенеза и ранее описано как при физиологических, так и при патологических состояниях [424, 486].

В нашем исследовании воздействие NADNA сопровождалось значительным увеличением постсинаптических ответов и снижением их вариативности. Подобные эффекты наблюдаются в условиях усиления нейронального возбуждения или после индукции долговременной пластичности [306]. Известно, что важным фактором потенциации синаптической передачи в гиппокампе является и эпилептогенез.

Для проверки гипотезы о том, что синапсы гиппокампа после инкубации с NADNA изначально находятся в состоянии потенциации, были построены кривые зависимости амплитуды пВПСП от интенсивности стимуляции. Полученные данные показали достоверные различия, что подтвердило наше предположение: синаптические ответы пирамидных нейронов области CA1 действительно потенцированы вследствие дефицита активности нейраминидазы.

Важно отметить, что морфологические изменения, вызванные ингибированием эндогенной нейраминидазы, совпадают с увеличением возбуждающих функциональных связей сети CA3-CA1 гиппокампа. Более того, прямое взаимодействие полисиаловых кислот с α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионатными (AMPA) рецепторами ранее было показано в экспериментах с добавлением бактериальных коломиновых кислот к внеклеточному раствору [580]. Учитывая ключевую роль AMPA-рецепторов в генерации пВПСП, нельзя исключать, что их потенцияция связана с повышением уровня синаптической передачи при угнетении активности нейраминидазы.

Проведенное исследование показало, что ингибирование нейраминидазы приводит к значительному повышению синаптической эффективности пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа. Преинкубация с NADNA

сопровождалась ростом амплитуды популяционных спайков, уменьшением коэффициента вариативности постсинаптических ответов, а также смещением кривых «вход–выход», что указывает на усиление синаптической передачи. Вклад NMDA- и non-NMDA-рецепторов в формирование ответов изменялся сопоставимо, что свидетельствует об отсутствии избирательного влияния блокады нейраминидазы на отдельные типы глутаматных рецепторов.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что дефицит нейраминидазной активности способствует потенциации синаптических ответов пирамидных нейронов гиппокампа, что, вероятно, связано с увеличением уровня синаптической синализации и формированием новых синаптических контактов.

3.6.2 Кратковременная синаптическая пластичность в условиях фармакологической блокады нейраминидазы

Ранее было показано, что экзогенное применение нейраминидазы на срезах гиппокампа влияет на широкий спектр функций нейронов: от высвобождения нейромедиаторов до процессов памяти, синаптической пластичности, роста аксонов и дифференциации клеток [85]. В то время, как использование ингибитора нейраминидазы оказывает противоположное действие – увеличивает количество ПСК и, как следствие, модулирует нейрональное возбуждение, что проявляется в росте частоты и амплитуды спонтанных синхронных колебаний, а также увеличении частоты суммарной нейронной активности в органотипической культуре гиппокампа крыс [500, 578]. Предыдущие исследования показали, что подавление активности нейраминидазы снижает долговременные формы синаптической пластичности как в синапсах CA3-CA1 апикальных дендритов [501], так и в синапсах мшистых волокон-пирамидных клеток области CA3 гиппокампа [388].

Целью настоящего этапа исследования явилось определение того, каким образом ингибирование нейраминидазы влияет на кратковременные формы

синаптической пластичности в нейронных сетях CA3-CA1 пирамидного слоя гиппокампа.

Вначале оценивали влияние фармакологической блокады нейраминидазы на кратковременную синаптическую пластичность пирамидного слоя области CA1 гиппокампа, используя протокол парной стимуляции. Известно, что в зависимости от вероятности высвобождения нейромедиатора на пресинаптическом сайте парная пластичность может проявляться как в форме фасилитации, так и депрессии [650].

Стимуляция коллатералей Шаффера с интервалом 25 мс вызывала фасилитацию пВПСП радиального слоя области CA1 гиппокампа после второго стимула. При этом в пирамидном слое часто наблюдали депрессию популяционного спайка (ПС), что отражает снижение распространения возбуждения к соме и уменьшение активации пирамидных клеток [281]. Инкубация срезов в растворе с NADNA (500 мкмоль, 2 ч) усиливала этот эффект: депрессию второго ПС отмечали у 53,3 % срезов ($n = 8$ из 15 срезов), тогда как в контроле аналогичное явление наблюдали лишь в 33,3 % случаев ($n = 4$ из 12 срезов). Предполагается, что снижение второго ПС в срезах, обработанных NADNA, связано с увеличением вероятности высвобождения медиатора после первого стимула. Подобный эффект согласуется с данными о росте эффективности синаптической передачи при ингибировании нейраминидазы.

При парной стимуляции с интервалом 50 мс депрессию ПС наблюдали реже – у 8,3 % контрольных срезов ($n = 1$ из 12 срезов) и у 26,7 % обработанных NADNA срезов ($n = 4$ из 15 срезов). Однако соотношение амплитуд ПС между экспериментальными группами достоверно не различалось ($p = 0,2$, критерий Манна-Уитни; рисунок 3.38).

Далее исследовали влияние блокатора нейраминидазы на ПТП – форму кратковременной синаптической пластичности, зависящую как от пресинаптических, так и постсинаптических механизмов. Краткосрочная тетаническая стимуляция (15 импульсов с частотой 50 Гц) вызывала характерное кратковременное увеличение амплитуды ПС в обеих экспериментальных группах с последующим постепенным снижением.

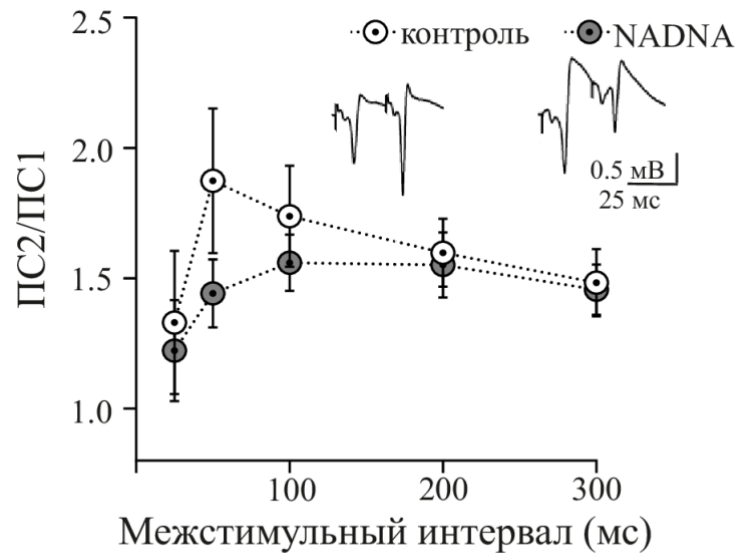


Рисунок 3.38 – Фармакологическая блокада нейраминидазы не влияет на парную фасилитацию CA3-CA1 нейронной сети гиппокампа. На верхней панели представлены репрезентативные записи популяционных спайков (ПС) контрольных (белый) и обработанных NADNA (серый) срезов

При этом максимальные значения ПТП были достоверно ниже в срезах, обработанных NADNA ($148,4 \pm 3,9$ % от исходного уровня, $n = 12$), по сравнению с контролем ($192,4 \pm 7,1$ %, $n = 10$; $F_{1, 20} = 36,6$, $p < 0,01$).

Более того, величина потенциации, сохранявшейся через 10 мин после стимуляции, также оказалась значительно сниженной в группе NADNA ($115,4 \pm 2,3$ %, $n = 10$) относительно контроля ($137,8 \pm 1,6$ %, $n = 12$, $F_{1,20} = 43,8$, $p < 0,01$; рисунок 3.39).

Основным результатом настоящего исследования является то, что, несмотря на выраженный эффект блокады нейраминидазы на ПТП, она не оказывает влияния на синаптическую пластичность, индуцированную парной стимуляцией. Наши данные согласуются с результатами предыдущих работ, где экзогенное применение нейраминидазы, направленное на снижение концентрации ПСК на поверхности клеточной мембраны, также не вызывало изменений кратковременной пластичности.

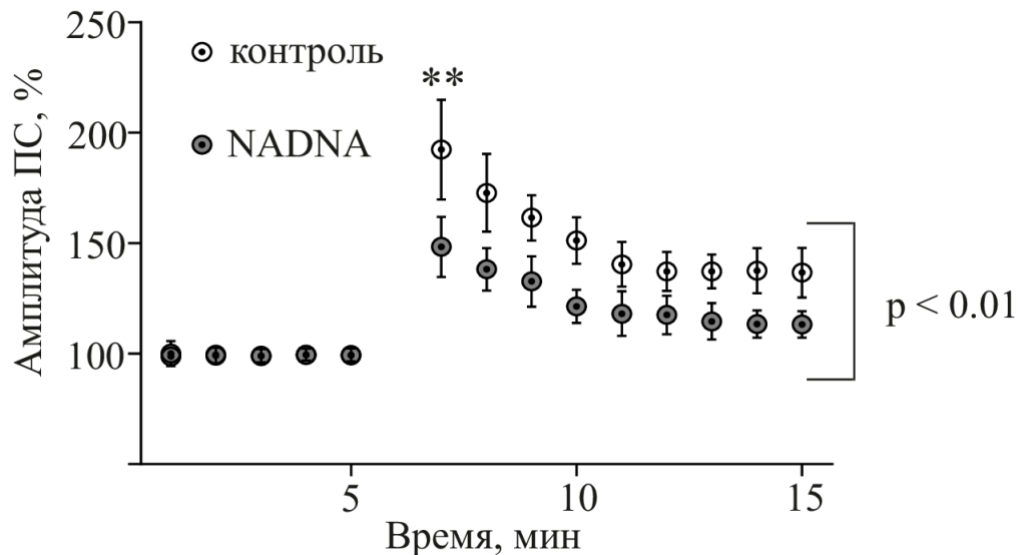


Рисунок 3.39 – Изменения посттетанической потенциации после ингибирования нейраминидазы: усредненные, нормализованные амплитуды популяционных спайков до и после 50 Гц тетанической стимуляции из 15 пульсов в контрольных (белый) и обработанных NADNA (серый) срезах

Подобным образом применение другого ингибитора нейраминидазы — осельтамивир-карбоксилата, активной формы противовирусного препарата Тамифлю, не приводило к изменениям парной пластичности популяционных спайков в области CA1 гиппокампа [282]. В то же время на синапсах от мшистых волокон к пирамидным нейронам области CA3 обработка NADNA вызывала ослабление PPF [388]. Эти результаты указывают на то, что механизмы индукции синаптической пластичности в синапсах мшистые волокна — CA3 отличается от таковых в синапсах CA3-CA1.

Поскольку PPF является индикатором вероятности высвобождения медиатора [650], нами выдвинуто предположение, что фармакологическая блокада активности нейраминидазы не оказывает влияния на пресинаптические механизмы выброса. Обнаруженное снижение ПТП в срезах после предварительной обработки NADNA свидетельствует о том, что в ее проявлении задействованы постсинаптические механизмы. Так как блокада нейраминидазы вызывает десИАлизацию клеточной мембраны, это может изменять ее поверхностные

свойства. Ранее было показано, что усиление синаптической мембраны или снижение активности нейраминидазы существенно изменяют нейронную активность. Возможный механизм нарушений длительных форм синаптической пластичности при десинаптации может заключаться во временном снижении синаптической силы, обусловленном истощением везикул, десенситизацией постсинаптических рецепторов или зависящей от активности интернализацией рецепторов [239].

Результаты настоящего исследования показали снижение ПТП в срезах, обработанных NADNA, что указывает на участие постсинаптических механизмов в реализации эффекта, тогда как вероятность пресинаптического высвобождения медиатора остается неизменной. Эти данные согласуются с представлениями о роли сialовых кислот и нейраминидазы в регуляции возбудимости нейронов и процессов синаптической пластичности.

Таким образом, нейраминидазу можно рассматривать как важный регулятор долговременной потенциации в синапсах гиппокампа за счет модификации постсинаптических свойств. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов, связанных с десинапсацией мембраны, способно пролить свет на фундаментальные основы процессов обучения и памяти, а также открыть перспективы для разработки новых подходов к коррекции когнитивных нарушений.

3.6.3 Изменения пластичности, зависящей от активности, при гиперсинапсации

На предыдущем этапе исследования было показано, что блокада нейраминидазы усиливает синаптическую эффективность в CA3-CA1 нейронных сетях гиппокампа.

Далее оценивали ключевой показатель синаптической интеграции и трансформации возбуждения в гиппокампе – эффективность преобразования пВПСП в ПС. Этот параметр характеризует, насколько успешно синаптический вход (измеряемый амплитудой пВПСП) конвертируется в выходной сигнал нейрона – генерацию потенциалов действия (измеряемую амплитудой ПС). Для

количественной оценки изменений синаптической передачи и постсинаптической возбудимости были проанализированы кривые «вход-выход», связывающие амплитуду пВПСП с амплитудой ПС при различных интенсивностях стимуляции. Сдвиги этих кривых вдоль оси пВПСП (оси абсцисс) служат чувствительным индикатором пластичности синаптической передачи.

С целью оценки динамики взаимодействия между синаптической эффективностью и постсинаптической возбудимостью в условиях индуцированной пластичности, были построены и проанализированы зависимости амплитуды ПС от амплитуды пВПСП до и через 40 мин после индукции ДВП для каждой интенсивности стимуляции.

В контрольных срезах гиппокампа ($n = 9$) тетаническая стимуляция вызывала достоверный сдвиг влево пВПСП-спайк кривых (рисунок 3.40 а), что свидетельствует о потенциации синаптической передачи после ДВП. Напротив, в срезах, предварительно обработанных блокатором нейраминидазы ($n = 11$), наблюдался выраженный сдвиг вправо пВПСП-спайк кривых после высокочастотной стимуляции, указывающий на депрессию синаптической передачи.

Для количественной оценки сдвигов кривых пВПСП-спайк вдоль оси синаптического входа (оси пВПСП) в эксперименте определяли значение V_{50} – амплитуду пВПСП, при которой генерируется половина максимальной амплитуды поп-спайка – путем аппроксимации кривых функцией Больцмана для каждого среза индивидуально.

До тетанической стимуляции значение V_{50} в срезах, обработанных NADNA ($1,1 \pm 0,2$ мВ, $n = 11$), было достоверно выше (непарный t-критерий Уэлча, $p = 0.02$), чем в контрольных срезах ($0,57 \pm 0,1$ мВ, $n = 9$). Через 40 мин после высокочастотной стимуляции это различие сохранялось и усиливалось: V_{50} в группе NADNA ($1,4 \pm 0,2$ мВ) оставалось значительно выше ($p = 0,004$) по сравнению с контролем ($0,67 \pm 0,1$ мВ, рисунок 3.40 б).

Повышение V_{50} в группе NADNA как до, так и после тетанической стимуляции, согласуется с наблюдаемым сдвигом вправо кривых ВПСП-спайк

передачи и подтверждает снижение синаптической эффективности или нарушение синаптической интеграции при блокаде нейраминидазы. Это может быть следствием наблюдаемого нами усиления начального наклона пВПСП в условиях дефицита нейраминидазы, что указывает на измененную динамику синаптического входа.

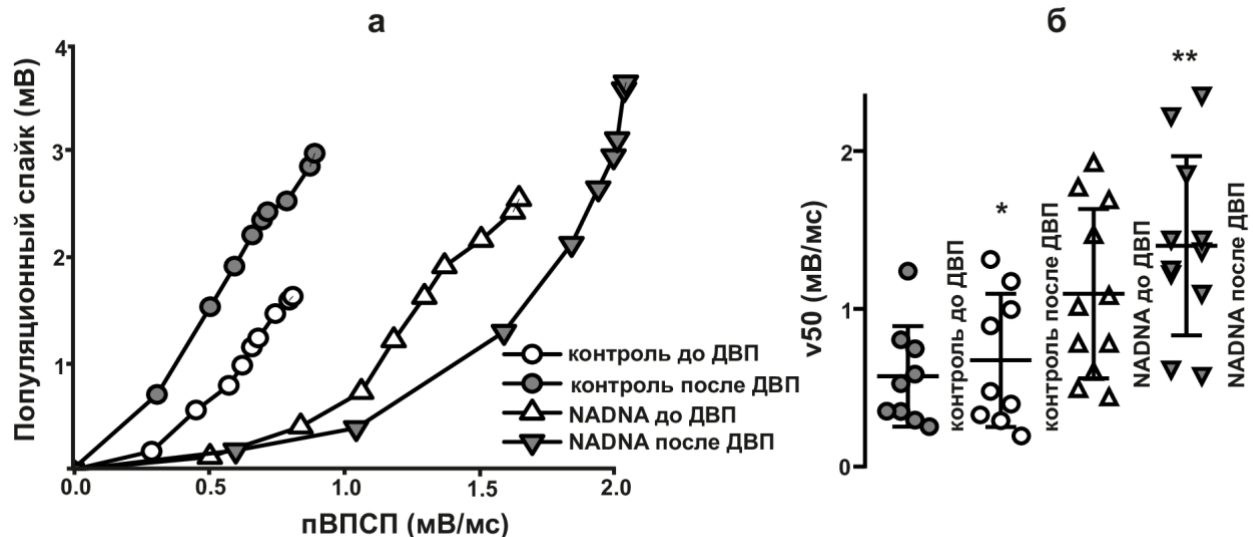


Рисунок 3.40 – Блокада активности нейраминидазы приводит к депрессии пВПСП-спайк передачи в нейронной сети СА3–СА1 гиппокампа: а – зависимость амплитуды популяционного спайка от пВПСП – сдвиг вправо кривых пВПСП-спайк после индукции ДВП в срезах, предварительно обработанных NADNA; б – средние значения амплитуды пВПСП в точке вероятности возникновения спайка 0,5 (величины v_{50} для кривых пВПСП-спайк, аппроксимированных по методу Больцмана).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM

Полученные данные демонстрируют значительное ослабление пВПСП-спайк передачи вследствие ингибирования нейраминидазы, что отражает снижение способности пВПСП индуцировать потенциалы действия. Действительно, в исследовании не наблюдали изменений в активности популяции тел пирамидных нейронов в срезах, обработанных NADNA, в ответ на увеличение пВПСП. Соотношение амплитуды пВПСП к ПС может модулироваться несколькими

механизмами: изменением порога генерации ПС (в основном определяемого потенциал-зависимыми ионными каналами [625]), сдвигом мембранного потенциала покоя [381] или локальной потенциацией синаптической передачи [107]. Ранее было показано, что синализация поверхности мембраны оказывает эффект на пропускные свойства натриевых каналов и порог генерации потенциала действия, не влияя на мембранный потенциал покоя [264]. Такое влияние ингибирования нейраминидазы за счет модуляции синализации, проявляется в увеличении частоты и амплитуды спонтанных синхронных разрядов [272], усилении нейронной синхронизации и стимуляции популяционных всплесков активности в сети гиппокампа [578].

Ослабление пВПСП-спайк передачи может усиливать фильтрующую способность пирамидных клеток, снижая их способность преобразовывать усиленный синаптический сигнал в ПС, что может нарушать их гомеостатическую функцию в сети CA3-CA1, о чем свидетельствует снижение магнитуды ДВП после блокады активности нейраминидазы.

3.6.4 Модуляция долговременной пластичности CA3-CA1-нейронной сети гиппокампа в ответ на блокаду нейраминидазы

Известно, что расщепление ПСК нейраминидазой приводит к снижению чувствительности натриевых каналов и порогу генерации потенциала действия [264]. На уровне нейронной сети процесс десинализации влияет на клеточную миграцию, синаптическую пластичность, способен подавлять эпилептиформную активность [272, 375, 501]. Было показано, что дефицит ПСК нарушает пространственную память и вызывает отклонения поведения [594]. В свою очередь, избыточная синализация вследствие блокирования нейраминидазы стимулирует зависимый от активности синаптогенез и влияет на нервное возбуждение [264, 271, 578].

Целью данной серии исследований было выявление особенностей долговременной пластичности CA3-CA1-нейронных сетей гиппокампа при фармакологическом ингибировании активности нейраминидазы.

Протокол тетанической стимуляции индуцировал ДВП одновременно в радиальном слое апикальных дендритов и пирамидном слое сом нейронов ($140,5 \pm 3,1 \%$ и $157,9 \pm 4,4 \%$ соответственно; $n = 9$; рисунок 3.41). Воздействие блокатором нейраминидазы существенно снижало магнитуду ДВП как в радиальном ($114,5 \pm 1,2 \%$, $p < 0,001$, $n = 11$), так и в пирамидном слое области CA1 гиппокампа ($132,8 \pm 4,35\%$, $p < 0,001$, $n = 11$).

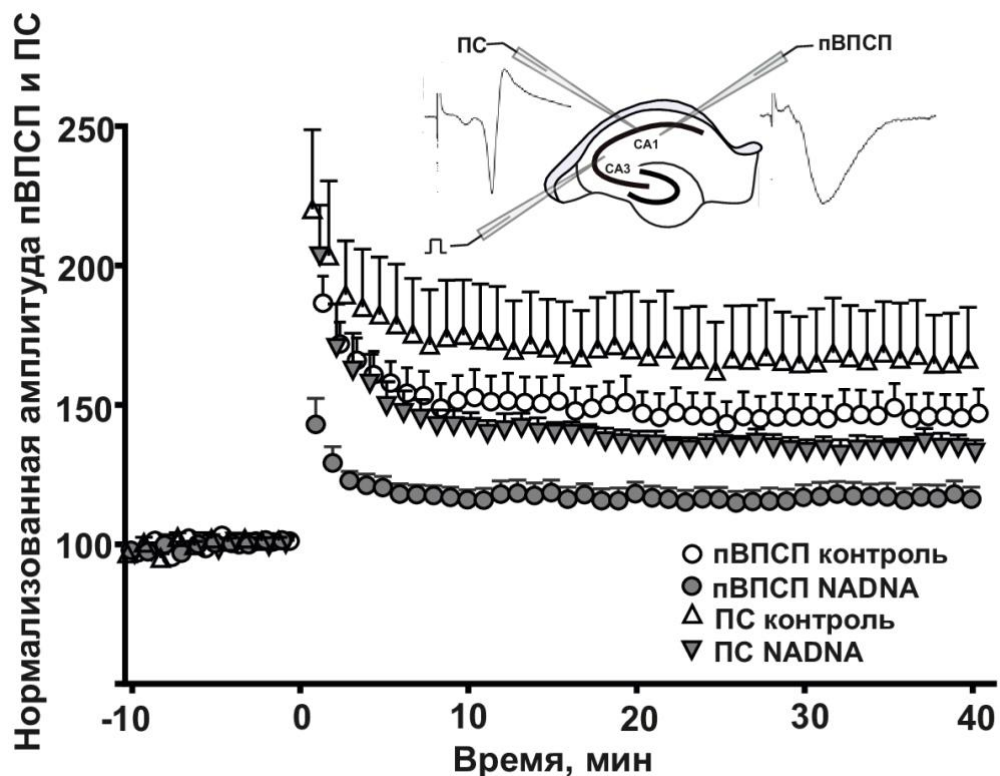


Рисунок 3.41 – Влияние блокады нейраминидазы на долговременную синаптическую пластичность сети CA3-CA1 гиппокампа.

Примечание: на графике представлены усредненные значения амплитуды пВПСР, нормализованные к базовой линии, до и после индукции ДВП высокочастотной тетанической стимуляцией (100Гц) коллатералей Шаффера. Вставка: схема расположения стимулирующего и регистрирующих электродов в срезах гиппокампа с примерами репрезентативных записей пВПСР и ПС

Известно, что ДВП повышает вероятность генерации потенциалов действия в ответ на стимуляцию не только за счет усиления пВПСП, но и за счет повышения эффективности функции «вход-выход» пирамидных нейронов [33]. Полученные в данном исследовании результаты демонстрируют, что усиление синаптической передачи, вызванное NADNA, может приводить к последующему ослаблению пВПСП-спайк передачи вследствие насыщения синаптических ответов.

Ранее было показано, что индукция ДВП сильно зависит от предшествующей синаптической активности и может подавляться в путях с недавней историей активации [195]. В экспериментах с синаптической депотенциацией срезов, предварительно обработанных NADNA, наблюдалось восстановление ДВП до контрольного уровня [501], что подтверждает данную гипотезу.

Поскольку ингибирование нейраминидазы одновременно затрагивало как синаптическую, так и пВПСП-спайк передачу, это указывает на важность строгого баланса активности данного фермента для регуляции синаптической пластичности и передачи сигналов в гиппокампе.

В совокупности наши результаты демонстрируют, что нейраминидаза является важнейшим регулятором не только базовой синаптической эффективности, но и синаптической интеграции и пластичности в гиппокампе. Блокада этого фермента приводит к нарушению способности синапсов к потенциации в ответ на высокочастотную стимуляцию, вызывая вместо этого депрессию передачи. Этот эффект сопровождается резким ослаблением магнитуды ДВП. Полученные данные подчеркивают критическую роль синаловых кислот и их метаболизма под действием нейраминидазы в поддержании нормальной возбудимости нейронов и реализации синаптической пластичности, лежащей в основе процессов обучения и памяти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей диссертационной работе проведено комплексное исследование на молекулярном, клеточном, системном и организменном уровнях механизмов эпилептогенеза, связанных с изменением функционального состояния нейронных сетей головного мозга крыс.

Полученные результаты вносят существенный вклад в понимание патофизиологических процессов, лежащих в основе формирования эпилептической активности при дисфункции ГЭБ и модуляции межклеточных взаимодействий (рисунок 4.1).

Впервые на генетической модели абсансной эпилепсии (крысы линии *WAG/Rij*) продемонстрирована способность гиперосмолярной терапии достоверно снижать частоту комплексов «пик-волна» (SWD). Выявлена обратимость эффекта: по окончании терапии показатели SWD возвращались к контрольным значениям. Это указывает на функциональный, а не структурный характер наблюдаемых изменений и открывает перспективы для разработки немедикаментозных подходов к коррекции абсансных приступов.

Полученные данные о существенном влиянии осмолярности раствора и электролитного состава на эпилептогенез послужили основой для предположения о том, что изменения ионного состава межклеточной среды могут играть важную роль в формировании гипервозбудимости нейронных сетей при нарушении целостности ГЭБ.

Гиппокамп, обладающий повышенной чувствительностью к повреждающим факторам, является одной из первых структур мозга, страдающих при дисфункции ГЭБ [155]. Подобная избирательная уязвимость может быть связана с «хрупкостью» ГЭБ в данной области, что делает ее более склонной к нарушению транспортных механизмов, которые работают для поддержания внутренней среды. Более того, нарушение ГЭБ может являться общей причиной развития патологии под влиянием различных повреждающих факторов. Исследования показали, что гиппокамп особенно чувствителен к таким ГЭБ-ассоциированным негативным

ФАКТОРЫ МОДУЛЯЦИИ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ КОРРЕКЦИИ АКТИВНОСТИ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ГИППОКАМПА

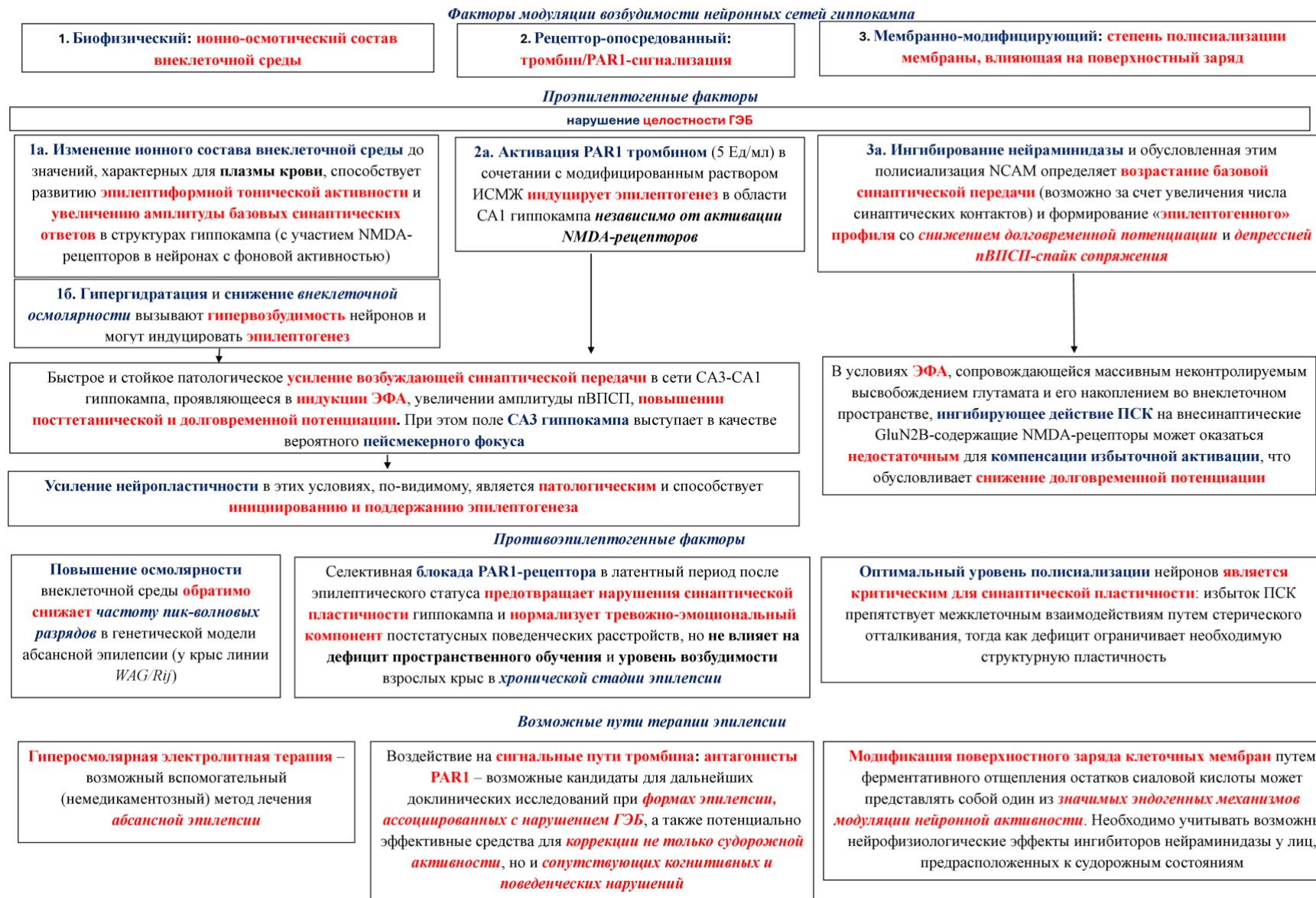


Рисунок 4.1 – Схема механизмов модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности головного мозга при изменении функционального состояния нейронов

воздействиям на головной мозг, как нейроактивные патогены (вирус простого герпеса и пр.) [637], нейротоксины (мышьяк и пр.) [292], эпилепсия, в особенности фокальная, в большинстве случаев характеризующаяся гиппокампальным склерозом [2, 100], психологическая травма (стресс в раннем возрасте и посттравматическое стрессовое расстройство) [95, 150], болезнь Альцгеймера [332, 342], приобретенное поражение мозга (ишемия/гипоксия, черепно-мозговая травма) [246, 506], эндокринные расстройства (диабет 2-го типа) [426].

Нарушение функций ГЭБ сопровождается повышением его проницаемости и дисбалансом потоков веществ между кровью и ЦНС. Это облегчает проникновение токсических соединений и иммунных клеток в паренхиму мозга и способствует развитию ряда неврологических заболеваний [451, 610]. Сложная архитектура ГЭБ, исключительная плотность эндотелиальных контактов и ограниченный набор эндогенных переносчиков резко сужают спектр молекул, способных естественным образом пересекать барьер, что затрудняет создание эффективных фармакологических средств для терапии патологий ЦНС [430]. ГЭБ обладает наибольшей обменной площадью среди барьеров организма – у взрослого человека она составляет примерно 12-18 м² [624].

В современной исследовательской практике воспроизведение патофизиологических процессов в экспериментальных условиях *in vitro* выступает незаменимым подходом к пониманию сложных механизмов, лежащих в основе развития дисфункций. Методики, использующие *in vitro*-модели, имеют ряд преимуществ, заключающихся в упрощении и ускорении экспериментальных процедур, облегчении доставки фармакологических агентов, обеспечении стабильности электрофизиологических регистраций в полностью контролируемых условиях. На сегодняшний день известно значительное количество *in vitro*-моделей, так называемой «эпилепсии в чашке», которые воспроизводят электрографические корреляты эпилептогенеза нейронных сетей исследуемых структур мозга, чаще всего височной доли, воспроизводимые непосредственно в день эксперимента [1, 6]. В настоящей работе предложена *in vitro*-модель дисфункции ГЭБ и

продемонстрировано проявление эпилептиформной активности в ответ на изменение состава ИСМЖ и добавление тромбина.

Усиление пВПСП в модельных условиях было обусловлено двумя основными механизмами: тромбин-опосредованным и изменениями ионного состава среды. Ранее было показано, что срезы гиппокампа крыс сохраняют сеть нейронов СА3-СА1 и при перфузии ионно-модифицированными растворами (например, 0 Mg^{2+}) быстро переходят в режим пароксизмальной активности, характерной для острого эпилептического статуса [563]. Следовательно, одна и та же синаптическая область способна демонстрировать как пластичность при обучении, так и патологическую гипервозбудимость.

Повышение концентрации K^+ до 5 ммоль/л вызывает деполяризацию мембран нейронов за счет снижения электрохимического градиента, что усиливает спонтанную возбудимость, снижает порог генерации потенциалов действия и уменьшает интервал между спонтанными судорогами [404, 526]. Повышенный уровень K^+ в ИСМЖ приводит к активации в нейронах персистентного натриевого тока, что способствует распространению волны длительной деполяризации и возникновению повторяющейся нейронной активности, особенно в СА1 области гиппокампа [35, 531].

Рост концентрации K^+ может возникать вследствие увеличения проницаемости ГЭБ и дисфункции буферной системы астроцитов, что может быть достаточным условием для индукции мощной эпилептической активности в гиппокампе [455]. Снижение концентрации Mg^{2+} до 0,8 ммоль/л ослабляет блок NMDA-рецепторов при потенциалах покоя, усиливая глутаматергическую передачу и способствуя гипервозбудимости и ЭФА [265]. Одновременное уменьшение концентрации Ca^{2+} до 1 ммоль/л увеличивает натриевую проницаемость мембраны, дополнительно деполяризуя нейроны и нарушая Ca^{2+} -зависимые механизмы торможения, что ведет к неконтролируемому распространению возбуждения [240]. Комбинированное действие этих сдвигов создает проэпилептогенный фон, который проявляется в виде спонтанной ЭФА нейронных сетей гиппокампа [502].

При понижении в перфузионном растворе концентрации положительно заряженных ионов, таких как Mg^{2+} и Ca^{2+} на наружной поверхности мембраны нейронов уменьшается экранирование отрицательных зарядов, что приводит к гиперполяризационному сдвигу активации потенциальных Na-каналов и возникновению ЭФА.

При разрушении ГЭБ происходит увеличение проницаемости не только к тромбину, но и к таким токсичным молекулам, как альбумин, гемоглобин, фибриноген, железосодержащий гемосидерин, плазмин, свободное железо [394]. Однако было показано, что только тромбин вызывает эпилептические приступы сразу после попадания в мозговую ткань [521, 560]. Недавние исследования констатируют существенное повышение концентрации тромбина в мозге сразу после инициации эпилептического статуса [266], и обратную ситуацию, когда внутримозговое введение тромбина провоцирует приступы [323]. Сериновая протеаза тромбин действует на рецепторы, активируемые протеазами, в первую очередь PAR1, которые экспрессируются на эндотелии сосудов, в нейронах и астроцитах гиппокампа [69]. Высокий уровень экспрессии PAR1 отмечается в пирамидном слое клеток гиппокампа, причем в зоне CA1 подавляющее большинство пирамидных нейронов демонстрируют PAR1-иммуноположительный фенотип [539]. При нормальных условиях эндогенный тромбин присутствует в мозге в низких концентрациях, он является нейропротектором и вовлечен в физиологические процессы и нейропластичность [351]. Уровень тромбина в мозге зависит от концентрации активного тромбина в крови, целостности ГЭБ и наличия тромбиновых ингибиторов серпинов [357].

Безусловно, разработанная и применяемая в данном исследовании модель имеет ряд ограничений для обсуждения дисфункции ГЭБ в условиях *in vivo*. Использование переживающих срезов гиппокампа *in vitro*, с одной стороны, обеспечивает высокий уровень контроля над экспериментальными условиями, а, с другой стороны, не учитывает системные факторы (иммунные, эндокринные, гемодинамические), которые могут модулировать эффекты дисфункции ГЭБ *in vivo*. Кроме того, в данном исследовании рассмотрена роль только одного ключевого

медиатора – тромбина, в то время как при реальном нарушении ГЭБ в ЦНС проникает комплекс различных факторов (альбумин, фибриноген, факторы комплемента, цитокины), которые могут оказывать синергическое или модулирующее действие [562, 647].

Следует также отметить, что данное исследование проводилось на здоровой ткани, и эффекты в условиях уже существующей патологии могут отличаться. Несмотря на указанные ограничения данной модели, регистрация ЭФА во всех срезах после записи пВПСП, подтверждает, что смоделированная дисфункция ГЭБ приводит к устойчивому состоянию гипервозбудимости.

Полученные данные убедительно демонстрируют, что условия, моделирующие дисфункцию ГЭБ, вызывают быстрое и стойкое патологическое усиление возбуждающей синаптической передачи в сети CA3-CA1 гиппокампа, проявляющееся в индукции ЭФА, увеличении амплитуды пВПСП, повышении посттетанической и долговременной потенциации. Этот механизм, опосредованный активацией PAR1, представляет собой важное звено, связывающее нарушение барьерной функции с развитием гипервозбудимости нейронных сетей гиппокампа и эпилептогенезом. Воздействие на сигнальные пути тромбина/PAR1 или патологически усиленную синаптическую передачу может представлять перспективную стратегию для предотвращения или лечения судорожных расстройств, ассоциированных с дисфункцией ГЭБ.

Как было упомянуто в разделе 1.3.2, PAR1 наиболее распространенные рецепторы тромбина в головном мозге, вовлечены в ряд молекулярных сигнальных каскадов, важных для развития хронической эпилепсии. Утечка тромбина и другого активатора PAR1, плазмина, во внеклеточное пространство мозга вследствие нарушения целостности ГЭБ во время ЭС может приводить не только к острому локальному повреждению, но и влиять на хронические процессы, такие как нарушение метаболизма, астроглиальная дисфункция, нейровоспаление, длительное нарушение целостности ГЭБ и изменение активности нейронов [622].

Ранее было показано, что активация PAR1 может усиливать и даже вызывать приступы вследствие увеличения деполяризации мембраны за счет активации

персистентных натриевых токов посредством активации протеинкиназы C [273]. Было показано, что тромбин посредством активации PAR1 может вызывать генерацию эпилептических приступов путем уменьшения синаптического торможения и увеличения возбуждения в нейронах гиппокампа [358]. Продемонстрировано, что активация PAR1 во время транзиторной фокальной ишемии приводит к гибели нейронов вследствие усиления передачи сигналов через NMDA-рецепторы [225]. Было показано, что активация PAR1 приводит к увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в нейронах, а также в глии [228], что может вызвать нейродегенерацию. Результаты многочисленных исследований показали, что активация PAR1 инициирует сигнальные каскады RhoA/Rho-киназного пути, протеинкиназы B и митоген-активированной протеинкиназы (MAPK), в том числе ERK1/2, JNK (C-Jun N-концевой киназы), p38 и p42/44 MAPK [351, 482]. Учитывая, что активация этих путей наблюдалась в мозге пациентов с фармакорезистентной эпилепсией [640] и на различных моделях экспериментального повреждения головного мозга [71, 171, 287, 288], активация PAR1 в латентный период после ЭС может инициировать эти сигнальные каскады, по меньшей мере в течение раннего эпилептогенеза. Наконец, как было указано выше, PAR1 являются важными регуляторами воспалительных путей. Известно, что повреждения мозга разной этиологии, которые могут спровоцировать эпилептогенез, часто сопровождаются воспалительными процессами [595]. Кроме того, клинические наблюдения и данные фундаментальных исследований указывают на то, что воспаление само по себе может вызвать эпилептогенные процессы [596]. Поэтому можно предположить, что активация PAR1 вскоре после ЭС может запускать каскад провоспалительной сигнализации, который может способствовать молекулярным, структурным и синаптическим изменениям, характерным для эпилептогенеза.

В настоящем исследовании показано, что ингибирование PAR1 предотвращает нарушения гиппокампальной синаптической пластичности у животных с ЭС, что может являться клеточной основой поведенческих расстройств, связанных с эпилепсией. Выявлено, что снижение активности

сигнального пути PAR1 восстанавливает нарушенное эмоциональное поведение и уровень тревожности, но не влияет на дефицит пространственного обучения у молодых крыс после эпилептического статуса.

Ранее было показано, что у мышей с нокаутом гена, кодирующего экспрессию PAR1, наблюдается достоверное снижение обусловленной страхом памяти и снижение способности к формированию контекстуальной реакции ужаса [165]. У мышей, нокаутных по PAR1, были продемонстрированы изменения в уровне тревожности в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт» и в тесте на реакцию пассивного избегания. Считается, что данные реакции опосредуются работой гиппокампа и миндалевидного комплекса; в то же время исследования демонстрируют вовлеченность PAR1 в работу этих структур. Действительно, нокаут PAR1 снижает уровень долговременной потенциации гиппокампа, а активация PAR1, в зависимости от эмоционального состояния животного, может влиять на нервную активность миндалины путем смещения ее G-белок-связанного профиля [244].

Положительный эффект блокировки PAR1 на уровень тревожности крыс после ЭС может быть связан как с нейропротекторным действием блокады PAR1 в гиппокампе, так и с влиянием на патологические процессы в период эпилептогенеза. С помощью фармакологических и генетических методов было установлено, что тревожные расстройства часто связаны с изменениями в работе и структурном составе NMDA-рецепторов. Полученный нами эффект требует дальнейшего исследования; возможно, активация PAR1 в составе их сигнального каскада оказывает определенное влияние на регуляцию эмоционально обусловленного поведения.

ЭС также характеризуется повышенной возбудимостью животных. Нами было показано снижение уровня эмоциональной возбудимости в результате фармакологической блокады PAR1 у крыс после ЭС. В то же время с использованием такой же модели ЭС было показано, что блокада PAR1 не влияет на уровень возбудимости взрослых крыс в хронической стадии эпилепсии; таким образом, вероятно, блокада PAR1 имеет время-зависимый эффект на данную

поведенческую характеристику [350]. Это может быть связано как с дальнейшим развитием заболевания до хронической стадии, так и с большей пластичностью компенсаторных механизмов мозга молодых животных.

Следует отметить, что PAR1 экспрессируется и в других структурах мозга, участвующих в эмоциональной регуляции, поэтому нельзя исключить внегиппокампальный вклад ингибирования PAR1 в уменьшение поведенческих нарушений после ЭС. Для уточнения роли PAR1 в механизмах эмоциональных расстройств при эпилепсии необходимы дополнительные исследования.

Наблюдаемые нами поведенческие нарушения после ЭС тесно связаны с дисфункцией гиппокампа – структуры, критически важной для процессов обучения и памяти.

В связи с этим в другой части работы были исследованы молекулярные основы синаптической пластичности гиппокампа, в частности, роль полисиаловых кислот. Помимо этого, выбор блокады нейраминидазы в качестве экспериментального воздействия был обусловлен ещё одним обстоятельством. Ранее нами было показано, что аппликация ингибитора нейраминидазы к срезам гиппокампа сама по себе достаточна для развития эпилептиформной активности [271]. Таким образом, оценка синаптической пластичности в этих условиях фактически проводилась на фоне ЭФА и методологически сопоставима с экспериментами, выполненными в модели дисфункции ГЭБ, где также регистрировалось развитие эпилептиформной активности. Такой дизайн позволяет сопоставить характер изменений пластичности при двух принципиально разных способах индукции ЭФА и оценить, насколько наблюдаемый паттерн определяется молекулярным субстратом повышенной возбудимости.

Изменения в связях между нейронами регулируют тонкие механизмы работы нервных сетей в процессе развития и приобретения опыта. Синаптическая пластичность включает функциональные и структурные модификации нейронов, которые лежат в основе обучения и памяти. В области CA1 гиппокампа модификации нервной активности могут приводить к изменениям синаптической эффективности. Эти изменения включают пресинаптические механизмы

(непосредственную модуляцию высвобождения медиаторов) и постсинаптические (изменения функций рецепторов). Гиппокамп является одной из немногих структур ЦНС, в которой сохраняются процессы нейрогенеза во взрослом организме. Многочисленные исследования свидетельствуют о вовлечении ПСК в клеточные механизмы пластичности гиппокампа. Так, было показано, что ферментативное отщепление ПСК и генетическое угнетение полисиалилтрансферазы ST8SiaIV, необходимой для полимеризации сиаловых кислот и их ассоциации с субстратом, приводило к нарушениям обучения и снижению долговременной потенциации и депрессии в области CA1 гиппокампа [534]. Добавление растворимой формы ПСК к переживающим срезам восстанавливало нормальную долговременную потенциацию и исправляло контекстуальную память страха, что свидетельствует о роли ПСК в нормальной индукции ДВП [514]. Согласно современным представлениям, ПСК регулируют синаптическую пластичность во взрослом организме через модуляцию специфической популяции глутаматных рецепторов. ПСК ингибируют NMDA-рецепторы, содержащие субъединицу GluN2B, при низких микромолярных концентрациях глутамата во внеклеточном пространстве. Воздействие ПСК на GluN2B в синапсах при стимуляции будет незначительным, поскольку глутамат высвобождается в высоких концентрациях [260]. В экспериментах с использованием водного лабиринта Морриса элиминация ПСК путем инъекции нейраминидазы через хронически имплантированную канюлю непосредственно в гиппокамп приводила к нарушению формирования пространственной памяти у крыс [62]. Кроме того, обработка нейраминидазой полностью препятствовала индукции долговременной потенциации и депрессии в органотипической культуре срезов, приготовленных из CA1-зоны гиппокампа крыс. Примечательно, что восстановление экспрессии ПСК после добавления нейраминидазы представляет собой кальцийзависимый процесс, который может модулироваться импульсной активностью нейронов [403].

Полисиализированные нервные структуры взрослого гиппокампа включают отдельные популяции нейронов, расположенные на границе гранулярного и полиморфного слоев зубчатой извилины. Их моховидные аксоны, простирающиеся

до зон CA2/CA3, а также дендриты также являются ПСК-положительными. В период консолидации памяти после обучения в задаче пассивного избегания количество ПСК-позитивных нейронов удваивается через 24 часа – в момент максимальной полисиализации [166]. Предполагается, что усиление полисиализации ассоциировано с процессами обучения [167]. Однако маловероятно, что столь резкое увеличение числа полисиализированных клеток является лишь следствием повышенной нейрональной активности. Более вероятное объяснение заключается в том, что полисиализация сама активирует эти нейроны [476]. Благодаря высокой плотности на клеточной поверхности ПСК способны оказывать значительные стерические эффекты на молекулярные и клеточные взаимодействия.

В настоящем исследовании искусственно увеличивали содержание ПСК в переживающих срезах гиппокампа крыс путем блокады эндогенной нейраминидазы и оценивали изменения синаптической пластичности. Установлено, что базовая синаптическая передача достоверно возрастала после специфической блокады нейраминидазы. Наиболее вероятным объяснением такого усиления синаптической эффективности является увеличение числа синаптических контактов.

Это предположение согласуется с многочисленными исследованиями, демонстрирующими формирование новых синапсов в ответ на интенсивную нейрональную активность [646]. Повторные электроконвульсивные приступы стимулируют синаптогенез в гиппокампе взрослых крыс. Было показано увеличение количества как перфорированных, так и простых синапсов при долговременной потенциации [497]. Также описано достоверное увеличение числа перфорированных синапсов после блокады ГАМК(A)-рецепторов пикротоксином [352]. Эти данные свидетельствуют о том, что интенсивная электрическая активность является важным фактором формирования новых синаптических контактов. В соответствие с этим блокада нейраминидазы индуцирует активационно-зависимый синаптогенез в гиппокампе [272], что подтверждает данную гипотезу. В контексте настоящего исследования это особенно значимо,

поскольку регистрируемая при ингибировании нейраминидазы ЭФА сама по себе создает условия интенсивной нейрональной активности, способной дополнительно стимулировать формирование новых синаптических контактов. Таким образом, наблюдаемое возрастание базовой синаптической передачи может отражать не только прямое влияние избытка ПСК, но и вторичный активационно-зависимый компонент.

В настоящем исследовании показано снижение долговременной потенциации в срезах гиппокампа с избыточной полисиализацией. Примечательно, что дефицит ПСК также приводит к нарушению ДВП, развитию амнезии в тесте пассивного избегания и дефектам пространственной памяти. Аппликация экзогенных ПСК на срезы гиппокампа мышей дикого типа вызывала подавление ДВП в течение 30 мин. Напротив, добавление ПСК в той же концентрации к срезам от NCAM-нокаутных мышей восстанавливало уровень ДВП до значений контрольной группы [166, 514, 534].

Механизмы влияния ПСК на синаптическую пластичность многообразны. Избыток ПСК нарушает индукцию ДВП и модулирует сигнальные пути нейротрофических факторов [404]. ПСК-NCAM-комплекс может функционировать как конкурентный модулятор синаптогенеза на постсинаптической мембране, где экспрессия этого комплекса регулируется процессами обучения [41]. Гидратированный полианионный домен ПСК стерически препятствует агрегации других молекул клеточной адгезии – кадгеринов и интегринов [514]. Одновременно ПСК потенцирует сигнализацию фактора роста фибробластов (FGF), нейротрофического фактора мозга (BDNF) и увеличивает мембранную популяцию AMPA-рецепторов [163, 404, 580, 644].

Важным механизмом является избирательная модуляция NMDA-рецепторов. Растворимые ПСК и ПСК-NCAM-комплексы ингибируют активность GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов при микромолярных концентрациях глутамата [227]. Поскольку синаптическая концентрация глутамата достигает ~ 1 мМ, а внесинаптическая составляет ~ 1 мкМ, ПСК преимущественно подавляют внесинаптические NMDA-рецепторы. Учитывая, что активация внесинаптических

NMDA-рецепторов негативно регулирует синаптическую передачу [413, 588], этот механизм может объяснять двунаправленные эффекты ПСК. Вместе с тем в условиях ЭФА, сопровождающейся массивным неконтролируемым высвобождением глутамата и его накоплением во внеклеточном пространстве, ингибирующее действие ПСК на внесинаптические GluN2B-содержащие NMDA-рецепторы может оказаться недостаточным для компенсации избыточной активации. Это создаёт предпосылки для сдвига баланса в сторону сигнализации, антагонистичной консолидации ДВП, и может рассматриваться как один из механизмов наблюдаемого снижения долговременной потенциации.

Следует особо отметить, что зарегистрированное в настоящей работе снижение ДВП при блокаде нейраминидазы качественно отличается от паттерна, полученного нами в модели дисфункции ГЭБ, где на фоне ЭФА наблюдалось усиление как кратковременной, так и долговременной форм пластичности. Феноменологически сходная ЭФА в двух моделях, таким образом, сопровождается противоположными изменениями ДВП, что указывает на определяющую роль молекулярного субстрата гипервозбудимости. При остром нарушении ГЭБ повышение возбудимости имеет преимущественно функциональный характер и не затрагивает структурных компонентов, необходимых для консолидации ДВП. Напротив, ингибирование нейраминидазы приводит к прямому вмешательству в систему полисигнализации NCAM – ключевого субстрата поздних фаз синаптической пластичности, – что и определяет формирование «эпилептогенного» профиля со снижением ДВП. Таким образом, синаптическая пластичность выступает чувствительным индикатором, разграничивающим компенсаторную и патологическую фазы ответа гиппокампальной сети на повреждающие факторы.

В настоящей работе рассмотрены механизмы, определяющие переход нейронных сетей гиппокампа из физиологического режима функционирования в состояние повышенной возбудимости и эпилептиформной активности. В отличие от исследований, сфокусированных на отдельных молекулярных мишенях, в представленной работе изучены три различных по природе фактора модуляции возбудимости: биофизический (ионно-осмотический состав внеклеточной среды),

рецептор-опосредованный (тромбин/PAR1-сигнализация) и мембранно-модифицирующий (поверхностный заряд, определяемый уровнем полисиализации). Первичные механизмы их действия различны – от прямого влияния на потенциал покоя и работу ионных каналов до модуляции сигнальных каскадов и стерических взаимодействий мембранных белков, – однако наблюдаемые эффекты реализуются на уровне нейронной сети гиппокампа и проявляются в виде изменений базовой синаптической передачи, кратковременной и долговременной пластичности и порога генерации эпилептиформной активности.

Каждый из исследованных факторов охарактеризован как самостоятельная точка приложения для направленного фармакологического воздействия, что подтверждено экспериментально: (i) ионно-осмотический механизм – повышение осмолярности внеклеточной среды обратимо снижает частоту пик-волновых разрядов в генетической модели абсансной эпилепсии, что указывает на роль осмолярности как модулятора пароксизмальной активности; (ii) PAR1-опосредованная сигнализация – селективная блокада рецептора антагонистом SCH 79797 в латентный период после эпилептического статуса предотвращает нарушения синаптической пластичности гиппокампа и нормализует тревожно-эмоциональный компонент постстатусных поведенческих расстройств, что позволяет рассматривать антагонисты PAR1 в качестве кандидатов для дальнейших доклинических исследований при формах эпилепсии, ассоциированных с нарушением ГЭБ; (iii) модуляция поверхностного заряда нейрональной мембраны через ферментативное удаление полисиаловых кислот – установлена зависимость синаптической эффективности и пластического потенциала сети от уровня полисиализации, что вносит вклад в понимание роли посттрансляционных модификаций мембранных белков в регуляции возбудимости нейронов гиппокампа.

Таким образом, в настоящем исследовании, проведенном на молекулярном, клеточном, системном и организменном уровнях установлены механизмы модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности в головном мозге крыс при изменении функционального состояния нейронов,

обусловленном нарушением ионного гомеостаза, активацией PAR1-опосредованной сигнализации и модификацией поверхностного заряда нейрональной мембраны, заключаются в изменении возбудимости и характера синхронизации нейронной сети, на уровне которой указанные разнородные молекулярные события реализуются в виде функциональных перестроек её активности.

Отдельным методологическим итогом работы является разработанная *in vitro*-модель дисфункции ГЭБ на переживающих срезах гиппокампа, воспроизводящая ключевые компоненты барьерной недостаточности и охарактеризованная сопоставлением электрографических паттернов с литий-пилокарпиновой моделью височной эпилепсии *in vivo*. Модель может быть применена в дальнейших исследованиях механизмов эпилептогенеза, сопряжённых с нарушением целостности ГЭБ.

Полученные результаты дополняют перечень молекулярных и клеточных мишеней, воздействие на которые может модулировать эпилептиформную активность. Изученные патогенетические факторы (ионно-осмотический дисбаланс, активация PAR1, изменение поверхностного заряда нейрональной мембраны) охарактеризованы как со стороны механизмов инициации эпилептиформной активности, так и с точки зрения её функциональных последствий – влияния различных её форм на процессы синаптической пластичности.

Полученные результаты, модели, подходы и выявленные механизмы модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности головного мозга при изменении функционального состояния нейронов могут рассматриваться как потенциальные точки приложения при дальнейшей разработке подходов к коррекции идиопатических и приобретённых форм эпилепсии.

ВЫВОДЫ

1. Механизмы модуляции эпилептиформной активности и синаптической пластичности в головном мозге крыс при изменении функционального состояния нейронов, обусловленном нарушением ионного гомеостаза, активацией PAR1-опосредованной сигнализации и модификацией поверхностного заряда нейрональной мембраны, заключаются в изменении возбудимости и характера синхронизации нейронной сети, на уровне которой указанные разнородные молекулярные события реализуются в виде функциональных перестроек её активности.

2. Изменение ионного состава внеклеточной среды до значений, характерных для плазмы крови, способствует развитию эпилептиформной тонической активности в культивированных нейронах гиппокампа и увеличению амплитуды базовых синаптических ответов в переживающих срезах гиппокампа крыс. NMDA-рецепторы участвуют в формировании эпилептиформной тонической активности в нейронах с фоновой генерацией ПД, тогда как их роль в индукции тонической активности нейронов без фоновой импульсной активности оказывается несущественной.

3. Применение гиперосмолярного раствора у крыс линии *WAG/Rij* с генетически детерминированной абсансной эпилепсией вызывает прогрессирующее снижение числа комплексов «пик-волна» (SWD) при неизменных амплитуде, длительности и пиковой частоте осцилляций; эффект носит обратимый характер: по окончании терапии показатели SWD возвращаются к исходным значениям.

4. Тромбин в концентрации 5 Ед/мл в сочетании с модифицированным раствором ИСМЖ индуцирует стойкую ЭФА в области CA1 гиппокампа, которая по электрофизиологическим параметрам не отличается от активности, регистрируемой в острой и хронической фазах литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Проэпилептогенный эффект тромбина опосредован преимущественно активацией PAR1: селективный антагонист SCH 79797 снижает

частоту потенциалов действия. Тромбин-индуцированная эпилептиформная импульсация реализуется через NMDA-независимые сигнальные каскады.

5. Условия, моделирующие дисфункцию ГЭБ, вызывают комплекс изменений синаптической функции в CA3-CA1 нейронной сети гиппокампа: усиление базовой возбуждающей синаптической передачи, увеличение кратковременной пластичности (парной фасилитации и посттетанической потенциации) и усиление долговременной потенциации.

6. Фармакологическая блокада PAR1 в период эпилептогенеза предотвращает нарушения синаптической пластичности CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа, развивающиеся после эпилептического статуса, индуцированного в молодом возрасте: восстанавливает парную фасилитацию и долговременную потенциацию до контрольных значений.

7. Блокада PAR1 в период эпилептогенеза оказывает избирательное протективное действие на поведенческие нарушения, развивающиеся после эпилептического статуса: нормализует уровень тревожности и снижает эмоциональную возбудимость. Вместе с тем блокада PAR1 не предотвращает развитие дефицита пространственной памяти и снижение общительности и интереса к социальной новизне.

8. Модификация поверхностного заряда мембраны нейронов вследствие фармакологической блокады эндогенной нейраминидазы повышает синаптическую эффективность CA3-CA1 нейронных сетей гиппокампа: увеличивает максимальную амплитуду популяционных спайков, уменьшает коэффициент вариации постсинаптических ответов и смещает кривые «вход-выход» в сторону потенциации. Одновременно блокада нейраминидазы снижает способность нейронной сети к индукции пластичности: не влияя на парную фасилитацию, уменьшает посттетаническую и подавляет долговременную потенциацию, а также вызывает депрессию пВПСП-спайк сопряжения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Продемонстрированное в настоящей работе подавление синхронных осцилляций в генетической модели абсансной эпилепсии при применении рисовых электролитных растворов позволяет рассматривать данный подход как экспериментально обоснованное направление для дальнейших доклинических и, в перспективе, клинических исследований в области фармакорезистентных форм абсансной эпилепсии. К потенциальным преимуществам метода можно предварительно отнести экономическую доступность, относительную безопасность и воспроизводимость терапевтического эффекта в условиях эксперимента. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что на данном этапе результаты получены исключительно на экспериментальной модели, метод не обеспечивает полного купирования приступов, а его эффективность продемонстрирована только для абсансной формы эпилепсии. Для оценки возможности трансляции полученных данных в клиническую практику необходимы дополнительные доклинические исследования, включая изучение дозозависимых эффектов, профиля долгосрочной безопасности и потенциальной применимости при других типах эпилептических приступов.

2. Разработанная модель раннего нарушения гематоэнцефалического барьера *in vitro* может рассматриваться как инструмент с потенциально широким спектром применения в экспериментальной нейробиологии. В образовательном процессе данная модель может быть полезна для обучения студентов и аспирантов, специализирующихся в области нейрофизиологии и нейрофармакологии, поскольку позволяет наглядно моделировать механизмы дисфункции гематоэнцефалического барьера при патологических состояниях. В научно-исследовательской практике модель создает предпосылки для углубленного изучения молекулярных и клеточных механизмов нарушения целостности барьера на ранних стадиях эпилептогенеза. Кроме того, модель потенциально может быть адаптирована для скрининга и доклинической оценки новых фармакологических агентов с предполагаемыми нейропротективными свойствами. Следует, однако,

учитывать, что валидность любой модели *in vitro* имеет ограничения, и экстраполяция результатов на условия *in vivo* и тем более на клиническую ситуацию требует дополнительной верификации.

3. Полученные экспериментальные данные о восстановительном эффекте блокады протеаза-активируемого рецептора 1 типа на процессы синаптической пластичности и поведенческие реакции, нарушенные эпилептическим статусом, расширяют фундаментальные представления о вовлечении PAR1 в патофизиологические механизмы коморбидных неврологических и психиатрических расстройств при эпилепсии. Результаты формируют экспериментальное обоснование для рассмотрения PAR1 в качестве потенциальной молекулярной мишени при разработке новых фармакологических стратегий, направленных на коррекцию не только судорожной активности, но и сопутствующих когнитивных и поведенческих нарушений. Выявленная в эксперименте избирательность действия блокады PAR1, проявляющаяся в отсутствии влияния на поведенческие реакции интактных животных при одновременном восстановлении нарушенных функций после эпилептического статуса, может свидетельствовать о потенциально благоприятном профиле безопасности воздействия на данную мишень, однако этот вопрос требует целенаправленного изучения в расширенных доклинических исследованиях с использованием различных моделей и схем введения. Следует подчеркнуть, что все выводы о терапевтическом потенциале блокады PAR1 носят на данном этапе предварительный характер и не могут быть непосредственно перенесены в клиническую практику без проведения соответствующих трансляционных исследований.

4. Результаты исследования влияния блокады нейраминидазы на поверхностный заряд мембраны нейронов и связанные с этим изменения эпилептиформной активности и синаптической пластичности в гиппокампе вносят вклад в фундаментальное понимание роли полисиаловых кислот в регуляции возбудимости нервной ткани. Полученные данные указывают на то, что модификация поверхностного заряда клеточных мембран путем ферментативного

отщепления остатков сиаловой кислоты может представлять собой один из значимых эндогенных механизмов модуляции нейронной активности. В контексте широкого клинического применения ингибиторов нейраминидазы (осельтамивир, занамивир, перамивир) в качестве противовирусных средств полученные экспериментальные данные позволяют предполагать наличие потенциальных нейрофизиологических эффектов данных препаратов, что может быть принято во внимание при дальнейшей оценке их профиля безопасности, прежде всего у лиц с эпилепсией или предрасположенностью к судорожным состояниям. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что прямая экстраполяция результатов, полученных в экспериментальных условиях *in vitro* на экспериментальных моделях, на клиническую ситуацию не является корректной, и для формулирования каких-либо конкретных клинических рекомендаций необходимы целенаправленные фармакоэпидемиологические и клинические исследования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АФК – активная форма кислорода
- ГАМК – γ -аминомасляная кислота
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДВП – долговременная потенция
- ИСМЖ – искусственная спинномозговая жидкость
- НВЕ – нейроваскулярная единица
- пВПСП – полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы
- ЛПС – липополисахарид
- ПД – потенциал действия
- ПС – популяционный спайк
- ПСК – полисиаловые кислоты
- ПТП – посттетаническая потенция
- ПЭП – противоэпилептические препараты
- РАС – расстройство аутистического спектра
- СМЖ – спинномозговая жидкость
- ЭС – эпилептический статус
- ЭЭГ – электроэнцефалограмма
- ЭФА – эпилептиформная активность
- ЦВО – циркумвентрикулярный орган
- ЦНС – центральная нервная система
- ЧМТ – черепно-мозговая травма
- АМРА – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат
- СаМ – кальмодулин
- СаМКII – кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа II
- ILAE – Международной лигой по борьбе с эпилепсией
- mEPSC – миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи
- mIPSC – миниатюрные тормозные постсинаптические токи
- NADNA - N-ацетил-2,3 дегидро-2-деокси нейраминавая кислота

NCAM – молекулы адгезии нервных клеток

NMDA – N-метил-D-аспартат

PAR1 – протеазаактивированный рецептор 1 типа

Pr – вероятность высвобождения нейромедиатора

PPF – парная фасилитация

SWD (spike-and-wave discharge) – комплекс «пик-волна»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ергина, Ю. Л. In vitro модели эпилептиформной активности / Ю. Л. Ергина, Е. Ю. Смирнова // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 8. – С. 954.
2. Зайцев, А. В. Синаптические дисфункции при эпилепсии / А. В. Зайцев, Д. В. Амахин, А. В. Демина [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2021. – Т. 107, № 4-5. – С. 492-517.
3. Карлов, В. А. Российская Противозэпилептическая Лига сегодня: вызов времени / В. А. Карлов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2020. – Т. 12, № 1. – С. 5.
4. Карлов, В. А. Здравоохранение России сегодня. Эпилептологическая служба / В. А. Карлов, С. Г. Бурд, М. Б. Миронов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т. 121, № 9. – С. 85-89.
5. Клинические рекомендации: Эпилепсия и эпилептический статус у взрослых и детей. – Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2022.
6. Морозова, М. А. Внутриполушарная когерентность ЭЭГ в зависимости от клинических проявлений височной эпилепсии у детей / М. А. Морозова, Н. К. Благосклонова // Физиология человека. – 2007. – Т. 33, № 4. – С. 18.
7. Наточин, Ю. В. Na^+/K^+ отношение в сыворотке крови как критерий функционального состояния человека / Ю. В. Наточин // Физиология человека. – 2024. – Т. 50, № 4. – С. 137.
8. Романов, А. С. Медико-социальные аспекты эпилепсии (обзор литературы) / А. С. Романов, Е. Ф. Шарахова // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. – 2023. – № 3. – С. 80-103.
9. Селицкий, Г. В. Роль нейровоспаления в формировании судорожной активности и вегетативных расстройств при эпилепсии / Г. В. Селицкий, Н. Д. Сорокина, П. Р. Камчатнов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2025. – Т. 125, № 8. – С. 50-58.
10. Хазиев, Э. Ф. Кальциевый транзист и секреция медиатора в разных участках нервного окончания лягушки при изменении условий входа ионов кальция / Э. Ф.

- Хазиев, Д. В. Балашова, А. Н. Ценцевский [и др.] // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 10. – С. 1262-1270.
11. Хасанова, Л. Т. Нейровизуализационные предикторы геморрагической трансформации ишемического инсульта / Л. Т. Хасанова, Е. А. Кольцова, М. Х. Зашезова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2024. – Т. 124, № 12-2. – С. 34-38.
 12. Чан, М. Д. Разнонаправленные эффекты тромбина на процессы гемокоагуляции и возможность их контроля в неврологии / М. Д. Чан, А. Н. Ясаманова, Г. Г. Авакян [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2024. – Т. 124, № 3-2. – С. 42-48.
 13. Abbott, L. C. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus / L. C. Abbott, F. Nigussie // *Anatomia, Histologia, Embryologia*. – 2020. – Vol. 49, No. 1. – P. 3-16.
 14. Abbott, L. F. Synaptic computation / L. F. Abbott, W. G. Regehr // *Nature*. – 2004. – Vol. 431, No. 7010. – P. 796-803.
 15. Abbott, N. J. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: Towards an in vitro blood-brain barrier / N. J. Abbott, C. C. Hughes, P. A. Revest [et al.] // *Journal of Cell Science*. – 1992. – Vol. 103. – P. 23-37.
 16. Abbott, N. J. Structure and function of the blood-brain barrier / N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2010. – Vol. 37, No. 1. – P. 13-25.
 17. Abbott, N. J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier / N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2006. – Vol. 7, No. 1. – P. 41-53.
 18. Abdelmissih, S. Dabigatran combined with benztropine ameliorates cobalt chloride-induced parkinsonism in rats, restores protease-activated receptor 1 (PAR1), and mitigates oxidative stress / S. Abdelmissih, L. A. Ahmed Rashed, M. Sharif Ismail Negm [et al.] // *Cureus*. – 2025. – Vol. 17, No. 3. – P. e80486.
 19. Abe, C. Chlorpromazine increases the expression of polysialic acid (PolySia) in human neuroblastoma cells and mouse prefrontal cortex / C. Abe, S. Nishimura, A. Mori [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, No. 6. – P. 1123.

20. Adam-Vizi, V. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts / V. Adam-Vizi, A. A. Starkov // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2010. – Vol. 20, Suppl. 2. – P. S413-S426.
21. Adeyeye, A. O. Regulation of neurogenesis and neuronal migration by Rrm2 and Timp3 following seizures / A. O. Adeyeye, P. Varma, N. Enerlan [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2025. – Vol. 215. – P. 107094.
22. Agarwal, S. The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain / S. Agarwal, R. Sane, J. R. Ohlfest [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2011. – Vol. 336, No. 1. – P. 223-233.
23. Aizenman, E. Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site / E. Aizenman // *Neuron*. – 1990. – Vol. 5, No. 6. – P. 841-846.
24. Aljohani, M. A. Cellular translocation and secretion of sialidases / M. A. Aljohani, H. Sasaki, X. L. Sun // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2024. – Vol. 300, No. 9. – P. 107671.
25. Almonte, A. G. Learning and memory deficits in mice lacking protease activated receptor-1 / A. G. Almonte, C. E. Hamill, J. P. Chhatwal [et al.] // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2007. – Vol. 88. – P. 295-304.
26. Almonte, A. G. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity / A. G. Almonte, L. H. Qadri, F. A. Sultan [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2013. – Vol. 124. – P. 109-122.
27. Alsahlawi, Z. Galactosialidosis: a report of three cases diagnosed with a founder genetic mutation in the bahraini population / Z. Alsahlawi, Z. J. Alhadi, E. A. Abdulla [et al.] // *Cureus*. – 2025. – Vol. 17, No. 1. – P. e77750.
28. Althaus, A. L. Altered synaptic drive onto birthdated dentate granule cells in experimental temporal lobe epilepsy / A. L. Althaus, S. J. Moore, H. Zhang [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2019. – Vol. 39, No. 38. – P. 7604-7614.
29. Alvarez, J. I. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence / J. I. Alvarez, A. Dodelet-Devillers, H. Kebir [et al.] // *Science*. – 2011. – Vol. 334, No. 6063. – P. 1727-1731.

30. Alzarea, S. I. A network pharmacology and in silico approach to target NEU1-mediated microglial activation in neuroinflammation: Validation in an LPS-induced mouse model / S. I. Alzarea, O. A. Alsaidan, S. Qasim [et al.] // *Computers in Biology and Medicine*. – 2025. – Vol. 199. – P. 111318.
31. Amini, E. A Molecular approach to epilepsy management: from current therapeutic methods to preconditioning efforts / E. Amini, M. Rezaei, N. Mohamed Ibrahim [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2015. – Vol. 52, No. 1. – P. 492-513.
32. Anand, K. S. Hippocampus in health and disease: An overview / K. S. Anand, V. Dhikav // *Annals of Indian Academy of Neurology*. – 2012. – Vol. 15, No. 4. – P. 239-246.
33. Andersen, P. Possible mechanisms for long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices from guinea pig / P. Andersen, S. Sundberg, O. Sveen [et al.] // *The Journal of Physiology*. – 1980. – Vol. 302. – P. 463-482.
34. Andersen, P. Low synaptic convergence of CA3 collaterals on CA1 pyramidal cells suggests few release sites / P. Andersen, M. Trommald, V. Jensen // *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. – 1994. – Vol. 29. – P. 340-351.
35. Andersen, P. *The Hippocampus Book* / P. Andersen, R. Morris, D. Amaral [et al.]. – Oxford: Oxford University Press, 2007. – P. 28-80.
36. Andjelkovic, A. V. Modeling blood–brain barrier pathology in cerebrovascular disease in vitro: Current and future paradigms / A. V. Andjelkovic, S. M. Stamatovic, C. M. Phillips [et al.] // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2020. – Vol. 17. – P. 44.
37. Andres-Alonso, M. Golgi satellites are essential for polysialylation of NCAM and expression of LTP at distal synapses / M. Andres-Alonso, M. Borgmeyer, H. Mirzapourdelavar [et al.] // *Cell Reports*. – 2023. – Vol. 42, No. 7. – P. 112692.
38. Andrew, R. D. Seizure susceptibility and the osmotic state / R. D. Andrew, M. Fagan, B. A. Ballyk [et al.] // *Brain Research*. – 1989. – Vol. 498. – P. 175-180.
39. Andrew, R. D. Seizure and acute osmotic change: clinical and neurophysiological aspects / R. D. Andrew // *Journal of the Neurological Sciences*. – 1991. – Vol. 101. – P. 7-18.
40. Annunziato, L. Pharmacology of brain $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives / L. Annunziato, G. Pignataro, G. F. Di Renzo // *Pharmacological Reviews*. – 2004. – Vol. 56, No. 4. – P. 633-654.

41. Aonurm-Helm, A. Pharmacological approach for targeting dysfunctional brain plasticity: Focus on neural cell adhesion molecule (NCAM) / A. Aonurm-Helm, K. Jaako, M. Jürgenson [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2016. – Vol. 113 – P. 731-738.
42. Arai, T. Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain / T. Arai, J. Miklossy, A. Klegeris [et al.] // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 2006. – Vol. 65. – P. 19-25.
43. Armulik, A. Pericytes regulate the blood-brain barrier / A. Armulik, G. Genové, M. Mäe [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 468, No. 7323. – P. 557-561.
44. Armulik, A. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises / A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz // *Developmental Cell*. – 2011. – Vol. 21, No. 2. – P. 193-215.
45. Aronica, E. Upregulation of adenosine kinase in astrocytes in experimental and human temporal lobe epilepsy / E. Aronica, E. Zurolo, A. Iyer [et al.] // *Epilepsia*. – 2011. – Vol. 52. – P. 1645-1655.
46. Aula, P. Salla disease: a new lysosomal storage disorder / P. Aula, S. Autio, K. O. Raivio [et al.] // *Archives of Neurology*. – 1979. – Vol. 36. – P. 88-94.
47. Aungst, S. L. Repeated mild traumatic brain injury causes chronic neuroinflammation, changes in hippocampal synaptic plasticity, and associated cognitive deficits / S. L. Aungst, S. V. Kabadi, S. M. Thompson [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2014. – Vol. 34, No. 7. – P. 1223.
48. Austin, K. M. Matrix metalloproteases and PAR1 activation / K. M. Austin, L. Covic, A. Kuliopulos // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, No. 3. – P. 431-439.
49. Bae, E.-K. Neuropathologic and clinical features of human medial temporal lobe epilepsy / E.-K. Bae, K.-H. Jung, K. Chu [et al.] // *Journal of Clinical Neurology*. – 2010. – Vol. 6. – P. 73-80.
50. Bagchi, S. In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: An overview / S. Bagchi, T. Chhibber, B. Lahooti [et al.] // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2019. – Vol. 13. – P. 3591-3605.

51. Balak, K. Neural cell adhesion molecule expression in *Xenopus* embryos / K. Balak, M. Jacobson, J. Sunshine [et al.] // *Developmental Biology*. – 1987. – Vol. 119. – P. 540-550.
52. Ballabh, P. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications / P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard // *Neurobiology of Disease*. – 2004. – Vol. 16, No. 1. – P. 1-13.
53. Ballyk, B. A. Osmotic effects on the CA1 neuronal population in hippocampal slices with special reference to glucose / B. A. Ballyk, S. J. Quackenbush, R. D. Andrew // *Journal of Neurophysiology*. – 1991. – Vol. 65, No. 5. – P. 1055-1066.
54. Bannerman, D.M. Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion / D. M. Bannerman, T. Bus, A. Taylor [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2012. – Vol. 15. – P. 1153-1159.
55. Barbieri, R. Voltage-Gated Sodium Channel Dysfunctions in Neurological Disorders / R. Barbieri, M. Nizzari, I. Zanardi [et al.] // *Life*. – 2023. – Vol. 13, No. 5. – P. 1191.
56. Barkus, C. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion / C. Barkus, S. B. McHugh, R. Sprengel [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2010. – Vol. 626. – P. 49-56.
57. Baycin-Hizal, D. Physiologic and pathophysiologic consequences of altered sialylation and glycosylation on ion channel function / D. Baycin-Hizal, A. Gottschalk, E. Jacobson [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 453. – P. 243-253.
58. Bean, B. P. Mechanisms of pacemaking in mammalian neurons / B. P. Bean // *The Journal of Physiology*. – 2024. – doi: 10.1113/JP284759.
59. Beart, P. M. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement / P. M. Beart, R. D. O'Shea // *British Journal of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 150, No. 1. – P. 5-17.
60. Beaudoin, C.A. Isoform-specific N-linked glycosylation of NaV channel α -subunits alters β -subunit binding sites / C. A. Beaudoin, M. Kohli, S. C. Salvage [et al.] // *The Journal of General Physiology*. – 2025. – Vol. 157, No. 1. – P. e202413609.
61. Beck, H. Synaptic plasticity in the human dentate gyrus / H. Beck, I. V. Goussakov, A. Lie [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20, No. 18. – P. 7080.

62. Becker, C. G. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation / C. G. Becker, A. Artola, R. Gerardy-Schahn [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 1996. – Vol. 45, No. 2. – P. 143-152.
63. Becker, D. NMDA-receptor inhibition restores Protease-Activated Receptor 1 (PAR1) mediated alterations in homeostatic synaptic plasticity of denervated mouse dentate granule cells / D. Becker, B. Ikenberg, S. Schiener [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2014. – Vol. 86. – P. 212-218.
64. Bekkers, J. M. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture / J. M. Bekkers, C. F. Stevens // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1991. – Vol. 88, No. 17. – P. 7834-7838.
65. Bell, R. D. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging / R. D. Bell, E. A. Winkler, A. P. Sagare [et al.] // *Neuron*. – 2010. – Vol. 68, No. 3. – P. 409-427.
66. Ben-Ari, Y. The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy / Y. Ben-Ari, G. L. Holmes // *Current Opinion in Neurology*. – 2005. – Vol. 18. – P. 141-145.
67. Ben-Ari, Y. Primary and secondary mechanisms of epileptogenesis in the temporal lobe: there is a before and an after / Y. Ben-Ari, F. E. Dudek // *Epilepsy Currents*. – 2010. – Vol. 10. – P. 118-125.
68. Bennet, E. S. Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na⁺ channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-6 loop of domain I / E. S. Bennet // *The Journal of Physiology*. – 2002. – Vol. 538. – P. 675-690.
69. Ben Shimon, M. Thrombin regulation of synaptic transmission and plasticity: implications for health and disease / M. Ben Shimon, M. Lenz, B. Ikenberg [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9.
70. Ben Shimon, M. Thrombin as Key Mediator of Seizure Development Following Traumatic Brain Injury / M. Ben Shimon, E. Shavit-Stein, K. Altman [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1532.

71. Berkeley, J. L. The role of muscarinic acetylcholine receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine-induced seizures / J. L. Berkeley, M. J. Decker, A. I. Levey // *Journal of Neurochemistry*. – 2002. – Vol. 82, No. 1. – P. 192-201.
72. Besag, F. M. C. Epilepsy in patients with autism: links, risks and treatment challenges / F. M. C. Besag // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. – 2018. – Vol. 14. – P. 1-10.
73. Betzer, O. The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: An in vivo study / O. Betzer, M. Shilo, R. Oporchinsky [et al.] // *Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 1533-1546.
74. Bharucha, N. E. Prevalence of epilepsy in the Parsi community of Bombay / N. E. Bharucha, E. P. Bharucha, A. E. Bharucha [et al.] // *Epilepsia*. – 1988. – Vol. 29, No. 2. – P. 111-115.
75. Bhide, G. P. Mechanistic overview of protein-specific polysialylation / G. P. Bhide, K. J. Colley // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2025. – Vol. 301, No. 12. – P. 110868.
76. Bian, Z. Protective Effect of Rivaroxaban Against Amyloid Pathology and Neuroinflammation Through Inhibiting PAR-1 and PAR-2 in Alzheimer's Disease Mice / Z. Bian, X. Liu, T. Feng [et al.] // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2022. – Vol. 86, No. 1. – P. 111-123.
77. Bien, C. G. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy / C. G. Bien, H. Urbach, J. Schramm [et al.] // *Neurology*. – 2007. – Vol. 69. – P. 1236-1244.
78. Bigi, A. Human sialidase NEU4 long and short are extrinsic proteins bound to outer mitochondrial membrane and the endoplasmic reticulum, respectively / A. Bigi, L. Morosi, C. Pozzi [et al.] // *Glycobiology*. – 2010. – Vol. 20. – P. 148-157.
79. Bliss, T. V. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path / T. V. Bliss, T. Lomo // *The Journal of Physiology*. – 1973. – Vol. 232, No. 2. – P. 331-356.
80. Bliss, T. V. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus / T. V. Bliss, G. L. Collingridge // *Nature*. – 1993. – Vol. 361, No. 6407. – P. 31-39.

81. Bliss, T. V. Synaptic plasticity in health and disease: introduction and overview / T. V. Bliss, G. L. Collingridge, R. G. Morris // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 369, No. 1633. – P. 20130129.
82. Blumenfeld, H. Role of hippocampal sodium channel Nav1.6 in kindling epileptogenesis / H. Blumenfeld, A. Lampert, J. P. Klein [et al.] // *Epilepsia*. – 2009. – Vol. 50. – P. 44-55.
83. Bogovik, R. Effects of protease-activated receptor 1 inhibition on anxiety and fear following status epilepticus / R. Bogovik, M. Fedoriuk, D. Isaev [et al.] // *Epilepsy and Behavior*. – 2017. – Vol. 67. – P. 66-69.
84. Bolshakov, A. P. Mechanisms of facilitation and depression in CNS synapses: presynaptic and postsynaptic components / A. P. Bolshakov, A. V. Rozov // *Neurochemical Journal*. – 2014. – Vol. 8, No. 4. – P. 238-276.
85. Bonfanti, L. The PSA-NCAM-Positive "Immature" Neurons: An Old Discovery Providing New Vistas on Brain Structural Plasticity / L. Bonfanti, T. Seki // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – P. 1-16.
86. Bornhöfft, K. F. Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins / K. F. Bornhöfft, T. Goldammer, A. Rebl [et al.] // *Developmental and Comparative Immunology*. – 2018. – Vol. 86. – P. 219-231.
87. Bortolotti, M. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks / M. Bortolotti, L. Polito, M. G. Battelli [et al.] // *Redox Biology*. – 2021. – Vol. 41. – P. 101882.
88. Bourgognon, J. M. Regulation of neuronal plasticity and fear by a dynamic change in PAR1-G protein coupling in the amygdala / J. M. Bourgognon, E. Schiavon, H. Salah-Uddin [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2013. – Vol. 18. – P. 1136-1145.
89. Bozzi, Y. The role of dopamine signaling in epileptogenesis / Y. Bozzi, E. Borrelli // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2013. – Vol. 7. – P. 157.
90. Brandt, C. Treatment with valproate after status epilepticus: Effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats / C. Brandt, A. M. Gastens, M. Sun [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2006. – Vol. 51, No. 4. – P. 789-804.
91. Brandt, C. Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: Lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats / C. Brandt,

- M. Glien, A. M. Gastens [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2007. – Vol. 53, No. 2. – P. 207-221.
92. Brandt, C. Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / C. Brandt, M. Nozadze, N. Heuchert [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. – P. 8602-8612.
 93. Brandt, C. Prevalence of anxiety disorders in patients with refractory focal epilepsy – a prospective clinic based survey / C. Brandt, M. Schoendienst, M. Trentowska [et al.] // *Epilepsy and Behavior*. – 2010. – Vol. 17. – P. 259-263.
 94. Breder, È. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia / E. Breder, F. Striggow, M. Riek-Burchardt [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 14. – P. 595-608.
 95. Bremner, J. D. The environment contributes more than genetics to smaller hippocampal volume in Posttraumatic Stress Disorder (PTSD) / J. D. Bremner, M. Hoffman, N. Afzal [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2021. – Vol. 137. – P. 579-588.
 96. Brennan, A. M. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation / A. M. Brennan, S. W. Suh, S. J. Won [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2009. – Vol. 12, No. 7. – P. 857-863.
 97. Bromfield, E. B. Basic Mechanisms Underlying Seizures and Epilepsy / E. B. Bromfield, J. E. Cavazos, J. I. Sirven. – American Epilepsy Society, 2006. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2510/>.
 98. Browne, T. R. Responsiveness before, during, and after spike-wave paroxysms / T. R. Browne, J. K. Penry, R. J. Porter [et al.] // *Neurology*. – 1974. – Vol. 24. – P. 659-665.
 99. Buendia, I. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases / I. Buendia, P. Michalska, E. Navarro [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2016. – Vol. 157. – P. 84-104.
 100. Bumanglag, A. V. No latency to dentate granule cell epileptogenesis in experimental temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis / A. V. Bumanglag, R. S. Sloviter // *Epilepsia*. – 2018. – Vol. 59, No. 11. – P. 2019-2034.

101. Bunge, M. B. F. The onset of synapse formation in spinal cord cultures as studied by electron microscopy / M. B. F. Bunge, R. P. F. Bunge, E. R. Peterson // *Brain Research*. – 1967. – Vol. 6, No. 4. – P. 728-749.
102. Burlina, A. P. Lysosomal storage diseases / A. P. Burlina, R. Manara, D. Gueraldi // *Handbook of Clinical Neurology*. – 2024. – Vol. 204. – P. 147-172.
103. Butola, T. Enhanced Distal Signaling in Human Hippocampal Neurons despite Lower Intrinsic Excitability / T. Butola, V. Robert, B. Kim [et al.] // *Research Square* [Preprint]. – 2025.
104. Butt, A. M. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study / A. M. Butt, H. C. Jones, N. J. Abbott // *The Journal of Physiology*. – 1990. – Vol. 429. – P. 47-62.
105. Calligaris, M. Development of a Proteomic Workflow for the Identification of Heparan Sulphate Proteoglycan-Binding Substrates of ADAM17 / M. Calligaris, D. P. Spanò, M. C. Puccio [et al.] // *Proteomics*. – 2024. – Vol. 24, No. 23–24. – P. e202400076.
106. Camfield, P. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children / P. Camfield, C. Camfield // *Epileptic Disorders*. – 2015. – Vol. 17, No. 2. – P. 117-123.
107. Campanac, E. Spike timing-dependent plasticity: a learning rule for dendritic integration in rat CA1 pyramidal neurons / E. Campanac, D. Debanne // *The Journal of Physiology*. – 2008. – Vol. 586. – P. 779-793.
108. Candenas, L. Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha and beta subunit mRNAs in human tissues / L. Candenas, M. Seda, P. Noheda [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2006. – Vol. 541. – P. 9-16.
109. Cannarozzi, A. Structural insights from neuraminidase diversity: Implications for selectivity in anti-infective and anticancer strategies / A. Cannarozzi, M. Volpicella, L. Guerra [et al.] // *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. – 2025. – Vol. 147. – P. 499-533.
110. Cappelletto, P. Psychiatric disorders in children and adolescents with temporal lobe epilepsy: A narrative review / P. Cappelletto, C. Accolla, M. Preti [et al.] // *Epilepsia Open*. – 2025. – Vol. 10, No. 1. – P. 74-84.

111. Carpio, A. Epilepsy in the developing world / A. Carpio, W. A. Hauser // *Current Neurology and Neuroscience Reports*. – 2009. – Vol. 9. – P. 319-326.
112. Casillas-Espinosa, P. M. Effects of the T-type calcium channel CaV3.2 R1584P mutation on absence seizure susceptibility in GAERS and NEC congenic rats models / P. M. Casillas-Espinosa, R. Lin, R. Li [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2023. – Vol. 184. – P. 106217.
113. Caspi, A. KV7/M channels mediate osmotic modulation of intrinsic neuronal excitability / A. Caspi, F. Benninger, Y. Yaari // *The Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29. – P. 11098-11111.
114. Castillo, C. Changes in sodium channel function during postnatal brain development reflect increases in the level of channel sialidation / C. Castillo, M. E. Díaz, D. Balbi [et al.] // *Developmental Brain Research*. – 1997. – Vol. 104, No. 1–2. – P. 119-130.
115. Catterall, W. A. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels / W. A. Catterall // *Neuron*. – 2000. – Vol. 26. – P. 13-25.
116. Catterall, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology / W. A. Catterall // *The Journal of Physiology*. – 2012. – Vol. 590, No. 11. – P. 2577-2589.
117. Cavalheiro, E. A. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures / E. A. Cavalheiro, J. P. Leite, Z. A. Bortolotto [et al.] // *Epilepsia*. – 1991. – Vol. 32, No. 6. – P. 778-782.
118. Celli, R. Targeting Ionotropic Glutamate Receptors in the Treatment of Epilepsy / R. Celli, F. Fornai // *Current Neuropharmacology*. – 2021. – Vol. 19, No. 6. – P. 747-765.
119. Chahal, G. The Importance of Exosite Interactions for Substrate Cleavage by Human Thrombin / G. Chahal, M. Thorpe, L. Hellman // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, No. 6. – P. e0129511.
120. Chakir, A. Drug resistance and hippocampal damage after delayed treatment of pilocarpine-induced epilepsy in the rat / A. Chakir, P. F. Fabene, R. Ouazzani [et al.] // *Brain Research Bulletin*. – 2006. – Vol. 71, No. 1–3. – P. 127-138

121. Chamberlain, S. E. L. Pre- and post-synaptic functions of kainate receptors at glutamate and GABA synapses in the rat entorhinal cortex / S. E. L. Chamberlain, D. E. Jane, R. S. G. Jones // *Hippocampus*. – 2012. – Vol. 22. – P. 555-576.
122. Chambers, J. K. A case of feline temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis and dentate gyrus malformation / J. K. Chambers, S. Iwasaki, S. Imamoto [et al.] // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2022. – Vol. 84, No. 5. – P. 634-637.
123. Chapleau, A. Longitudinal Characterization of the Clinical Course of Intermediate-Severe Salla Disease / A. Chapleau, A. Mirchi, L. T. Tran [et al.] // *Pediatric Neurology*. – 2023. – Vol. 148. – P. 133-137.
124. Chao, H. GABAergic dysfunction mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes / H. Chao, H. Chen, R. C. Samaco [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 468. – P. 263-269.
125. Chavas, L. M. Crystal structure of the human cytosolic sialidase Neu2. Evidence for the dynamic nature of substrate recognition / L. M. Chavas, C. Tringali, P. Fusi [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, No. 1. – P. 469-475.
126. Chen, B. Thrombin activity associated with neuronal damage during acute focal ischemia / B. Chen, B. Freidman, B. Freidman // *The Journal of Neuroscience*. – 2012. – Vol. 32, No. 22. – P. 7622-7631.
127. Chen, L. Temporal lobe epilepsy and adult hippocampal neurogenesis / L. Chen, Y. Wang, Z. Chen // *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2017. – Vol. 46, No. 1. – P. 22-29.
128. Chen, L. Calponin-3 is associated with epilepsy through the regulation of astrocyte activity / L. Chen, F. Yang, W. Q. Yang [et al.] // *Brain Pathology*. – 2025. – P. e70045.
129. Chen, Y. Astrocytes and brain injury / Y. Chen, R. A. Swanson // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2003. – Vol. 23, No. 2. – P. 137-149.
130. Chernorudskiy, A. L. Regulation of Calcium Homeostasis by ER Redox: A Close-Up of the ER/Mitochondria Connection / A. L. Chernorudskiy, E. Zito // *J. Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 429, No. 5. – P. 620-632.

131. Cheval, M. Early identification of seizure freedom with medical treatment in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis / M. Cheval, M. Houot, N. Chastan [et al.] // *J. Neurol.* – 2023. – Vol. 270, No. 5. – P. 2715-2723.
132. Choi, J. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy / J. Choi, D. R. Nordli Jr., T. D. Alden [et al.] // *J. Neuroinflammation.* – 2009. – Vol. 6. – P. 38.
133. Choi, Y. B. Redox modulation of the NMDA receptor / Y. B. Choi, S. A. Lipton // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2000. – Vol. 57, No. 11. – P. 1535-1541.
134. Chugani, H. T. Imaging of serotonin mechanisms in epilepsy / H. T. Chugani, D. C. Chugani // *Epilepsy Curr.* – 2005. – Vol. 5. – P. 201-206.
135. Citri, A. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms / A. Citri, R.C. Malenka // *Neuropsychopharmacology.* – 2008. – Vol. 33, No. 1. – P. 18-41.
136. Clifford, D. B. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures / D. B. Clifford, J. W. Olney, A. Maniotis [et al.] // *Neuroscience.* – 1987. – Vol. 23, No. 3. – P. 953-968.
137. Colley, K. J. Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications / K. J. Colley, K. Kitajima, C. Sato // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 49, No. 6. – P. 498-532.
138. Collingridge, G. L. The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro / G. L. Collingridge, S. J. Kehl, H. McLennan // *J. Physiol.* – 1983. – Vol. 334. – P. 19-31.
139. Colombo, F. L1-CAM and N-CAM: From Adhesion Proteins to Pharmacological Targets / F. Colombo, J. Meldolesi // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 36, No. 11. – P. 769-781.
140. Comelli, E. M. Identification and expression of Neu4, a novel murine sialidase / E. M. Comelli, M. Amado, S. R. Lusting [et al.] // *Gene.* – 2003. – Vol. 321. – P. 155-161.
141. Corfield, A. P. Glycan variation and evolution in the eukaryotes / A. P. Corfield, M. Berry // *Trends Biochem. Sci.* – 2015. – Vol. 40, No. 7. – P. 351-359.

142. Cortada, E. Role of protein domains in trafficking and localization of the voltage-gated sodium channel $\beta 2$ subunit / E. Cortada, R. Brugada, M. Verges // J. Biol. Chem. – 2024. – Vol. 300, No. 11. – P. 107833.
143. Costine-Bartell, B. A perfect storm: The distribution of tissue damage depends on seizure duration, hemorrhage, and developmental stage in a gyrencephalic, multifactorial, severe traumatic brain injury model / B. Costine-Bartell, G. Price, J. Shen [et al.] // Neurobiol. Dis. – 2021. – Vol. 154. – P. 105334.
144. Coughlin, S.R. (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature, 407(6801), 258–264. doi:10.1038/35025229.
145. Coulter, D.A. Role of astrocytes in epilepsy / D.A. Coulter, C. Steinhäuser // Cold Spring Harb. Perspect. Med. – 2015. – Vol. 5, No. 3. – P. a022434.
146. Crawley, J.N. What's Wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice / J.N. Crawley. – 2nd ed. – Hoboken: Wiley, 2007.
147. Curia, G. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / G. Curia, D. Longo, G. Biagini [et al.] // J. Neurosci. Methods. – 2008. – Vol. 172. – P. 143-157.
148. Curia, G. Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? / G. Curia, C. Lucchi, J. Vinet [et al.] // Curr. Med. Chem. – 2014. – Vol. 21, No. 6. – P. 663-688.
149. Curreli, S. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions / S. Curreli, Z. Arany, R. Gerardy-Schann [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 30346-30356.
150. Dahmen, B. Effects of early-life adversity on hippocampal structures and associated HPA axis functions / B. Dahmen, V.B. Puetz, W. Scharke [et al.] // Dev. Neurosci. – 2018. – Vol. 40, No. 1. – P. 13-22.
151. Dahms, S.O. Sirtilins – the new old members of the vitamin K-dependent coagulation factor family / S.O. Dahms, F. Demir, P.F. Huesgen [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2019. – Vol. 17, No. 3. – P. 470-481.
152. Daneman, R. The blood-brain barrier / R. Daneman, A. Prat // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2015. – Vol. 7, No. 1. – P. a020412.

153. Daneman, R. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis / R. Daneman, L. Zhou, A. A. Kebede, B. A. Barres // *Nature*. – 2010. – Vol. 468, No. 7323. – P. 562-566.
154. David, Y. Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? / Y. David, L. P. Cacheaux, S. Ivens [et al.] // *J. Neurosci*. – 2009. – Vol. 29, No. 34. – P. 10588-10599.
155. Davidson, T. Vulnerability of the hippocampus to insults: links to blood–brain barrier dysfunction / T. Davidson, R. Stevenson // *Int. J. Mol. Sci*. – 2024. – Vol. 25. – P. 1991.
156. Deane, R. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms / R. Deane, Z. Wu, A. Sagare [et al.] // *Neuron*. – 2004. – Vol. 43, No. 3. – P. 333-344.
157. Dejana, E. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability / E. Dejana, F. Orsenigo, M. G. Lampugnani // *J. Cell Sci*. – 2008. – Vol. 121, Pt 13. – P. 2115–2122.
158. Denenberg, V. H. Open-field behavior in the rat: what does it mean? / V. H. Denenberg // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. – 1969. – Vol. 159, No. 3. – P. 852–859.
159. Deng, G. TRP channels in epileptogenesis: calcium dysregulation mechanisms and pharmacological targeting strategies / G. Deng, D. Liu, Y. Zhong [et al.] // *Front. Mol. Neurosci*. – 2025. – Vol. 18. – P. 1687359.
160. De Sarro G. Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin–6 mice / G. De Sarro, E. Russo, G. Ferreri, B. Giuseppe, M. A. Flocco, E. D. Di Paola, A. De Sarro // *Pharmacol. Biochem. Behav*. – 2004. – 77. – C.761–766.
161. De Vivo, D. C. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay / D. C. De Vivo, R. R. Trifiletti, R. I. Jacobson [et al.] // *N. Engl. J. Med*. – 1991. – Vol. 325, No. 10. – P. 703-709.
162. Dhanabalan, K. Many locks to one key: N-acetylneuraminic acid binding to proteins / K. Dhanabalan, Y. Cheng, T. Thach, R. Subramanian // *IUCrJ*. – 2024. – Vol. 11, Pt 5. – P. 664-674.

163. Dityatev, A. Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses / A. Dityatev, G. Dityateva, V. Sytnyk [et al.] // J. Neurosci. – 2004. – Vol. 24, No. 42. – P. 9372-9382.
164. Donovan, A. P. A. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective / A. P. A. Donovan, M. A. Basson // J. Anat. – 2017. – Vol. 230. – P. 4-15.
165. Dos Santos, J. G. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy / J. G. Dos Santos, B. M. Longo, M. M. Blanco [et al.] // Brain Res. – 2005. – Vol. 1066, No. 1-2. – P. 37-48.
166. Doyle, E. Hippocampal NCAM 180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive response in the adult rat / E. Doyle, P. Nolan, R. Bell [et al.] // J. Neurosci. Res. – 1992. – Vol. 31. – P. 513-523.
167. Doyle, E. Cholinergic and dopaminergic agents which inhibit a passive avoidance response attenuate the paradigm-specific increases in NCAM sialylation state / E. Doyle, C.M. Regan // Neural Transm. Gen. Sect. – 1993. – Vol. 92. – P. 33-49.
168. Drake, P. M. Polysialic acid, a glycan with highly restricted expression, is found on human and murine leukocytes and modulates immune response / P. M. Drake, J. K. Nathan, C. M. Stock [et al.] // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181. – P. 6850-6858.
169. D'Souza, A. Facial features of lysosomal storage disorders / A. D'Souza, E. Ryan, E. Sidransky // Expert Rev. Endocrinol. Metab. – 2022. – Vol. 17, No. 6. – P. 467-474.
170. Dubey, V. Differential glutamate receptor expression and function in the hippocampus, anterior temporal lobe and neocortex in a pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / V. Dubey, S. Dey, A.B. Dixit [et al.] // Exp. Neurol. – 2022. – Vol. 347. – P. 113916.
171. Dubreuil, C. I. Activation of Rho after traumatic brain injury and seizure in rats / C. I. Dubreuil, N. Marklund, K. Deschamps [et al.] // Exp. Neurol. – 2006. – Vol. 198, No. 2. – P. 361-369.
172. Dudek, F. E. Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective / F.E. Dudek, T. P. Sutula // Prog. Brain Res. – 2007. – Vol. 163. – P. 755-773.
173. Dudek, S. M. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade / S.M. Dudek, M.F. Bear // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1992. – Vol. 89, No. 10. – P. 4363-4367.

174. Duvernoy, H. M. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization / H. M. Duvernoy, P. Y. Risold // *Brain Res. Rev.* – 2007. – Vol. 56, No. 1. – P. 119-147.
175. Dvorak, N. M. Development of Allosteric Modulators of Voltage-Gated Na⁺ Channels: A Novel Approach for an Old Target / N. M. Dvorak, P. A. Wadsworth, P. Wang [et al.] // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 21, No. 10. – P. 841-848.
176. El-Gazar, A. A. Elucidating PAR1 as a therapeutic target for delayed traumatic brain injury: Unveiling the PPAR- γ /Nrf2/HO-1/GPX4 axis to suppress ferroptosis and alleviate NLRP3 inflammasome activation in rats / A. A. El-Gazar, A. A. Soubh, D. M. Abdallah [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2024. – Vol. 139. – P. 112774.
177. El-Hassar, L. Hyperexcitability of the CA1 hippocampal region during epileptogenesis / L. El-Hassar, M. Esclapez, C. Bernard // *Epilepsia.* – 2007. – Vol. 48. – P. 131-139.
178. Eneva, R. Safe Sialidase Production by the Saprophyte *Oerskovia paurometabola*: Gene Sequence and Enzyme Purification / R. Eneva, S. Engibarov, Y. Gocheva [et al.] // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27, No. 24. – P. 8922.
179. Epilepsy: a public health imperative. Summary. – Geneva : World Health Organization, 2019. – URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325440/WHO-MSD-MER-19.2-eng.pdf> (дата обращения: 14.12.2025).
180. Epps, S. A. Seizure susceptibility and epileptogenesis in a rat model of epilepsy and depression co-morbidity / S. A. Epps, K. D. Tabb, S. J. Lin [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* – 2012. – Vol. 37, No. 13. – P. 2756-2763.
181. Epsztein, J. Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats / J. Epsztein, A. Represa, I. Jorquera [et al.] // *J. Neurosci.* – 2005. – Vol. 25, No. 36. – P. 8229-8239.
182. Erickson, J. R. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation / J. R. Erickson, M. L. Joiner, X. Guan [et al.] // *Cell.* – 2008. – Vol. 133, No. 3. – P. 462-474.
183. Esmon, C. T. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond / C.T. Esmon // *Thromb. Haemost.* – 2014. – Vol. 111, No. 4. – P. 625-633.
184. Falcón-Moya, R. Kainate Receptors: Role in Epilepsy / R. Falcón-Moya, T.S. Sihra, A.

- Rodríguez-Moreno // *Front. Mol. Neurosci.* – 2018. – Vol. 11. – P. 217.
185. Falco-Walter, J. Epilepsy – definition, classification, pathophysiology, and epidemiology / J. Falco-Walter // *Semin. Neurol.* – 2020. – Vol. 40. – P. 617-623.
 186. Fanselow, M. S. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? / M. S. Fanselow, H. W. Dong // *Neuron.* – 2010. – Vol. 65, No. 1. – P. 7-19.
 187. Fanzani, A. The enzymatic activity of sialidase Neu2 is inversely regulated during in vitro myoblast hypertrophy and atrophy / A. Fanzani, R. Giuliani, F. Colombo [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – Vol. 370, No. 2. – P. 376-381.
 188. Fauser, S. Epilepsy / S. Fauser, H. Tumani // *Handb. Clin. Neurol.* – 2017. – Vol. 146. – P. 259-266.
 189. Fedulova, S. A. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons / S. A. Fedulova, D. V. Vasilyev, E. V. Isaeva [et al.] // *Neuroscience.* – 1999. – Vol. 92, No. 4. – P. 1217-1230.
 190. Fiest, K. M. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies / K. M. Fiest, K. M. Sauro, S. Wiebe [et al.] // *Neurology.* – 2017. – Vol. 88, No. 3. – P. 296-303.
 191. Flaumenhaft, R. Targeting PAR1: Now What? / R. Flaumenhaft, K. de Ceunynck // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2017. – Vol. 38, No. 8. – P. 701-716.
 192. Frasca, A. Misplaced NMDA receptors in epileptogenesis contribute to excitotoxicity / A. Frasca, M. Aalbers, F. Frigerio [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2011. – Vol. 43, No. 2. – P. 507-515.
 193. Freeman, J. M. The efficacy of the ketogenic diet – 1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children / J. M. Freeman, E. P. Vining, D. J. Pillas [et al.] // *Pediatrics.* – 1998. – Vol. 102. – P. 1358-1363.
 194. Friedman, A. Blood-brain barrier dysfunction, status epilepticus, seizures, and epilepsy: a puzzle of a chicken and egg? / A. Friedman // *Epilepsia.* – 2011. – Vol. 52, Suppl. 8. – P. 19-20.
 195. Fujii, S. Depotentiation depends on IP3 receptor activation sustained by synaptic inputs after LTP induction / S. Fujii, Y. Yamazaki, J.I. Goto [et al.] // *Learn. Mem.* – 2020. – Vol. 27. – P. 52-66.

196. Fujimoto, S. Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo / S. Fujimoto, H. Katsuki, M. Ohnishi [et al.] // *Neuroscience*. – 2007. – Vol. 144, No. 2. – P. 694–701.
197. Furuse, M. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions / M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1993. – Vol. 123, No. 6, Pt 2. – P. 1777-1788.
198. Gaidin, S. G. Epileptiform activity promotes decreasing of Ca^{2+} conductivity of NMDARs, AMPARs, KARs, and voltage-gated calcium channels in Mg^{2+} -free model / S. G. Gaidin, V. P. Zinchenko, I. Y. Teplov [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2019. – Vol. 158. – P. 106224.
199. Galanopoulou, A. S. Developmental patterns in the regulation of chloride homeostasis and GABA(A) receptor signaling by seizures / A. S. Galanopoulou // *Epilepsia*. – 2007. – Vol. 48, Suppl. 5. – P. 14-18.
200. Gamal El-Din, T. M. Tracking S4 movement by gating pore currents in the bacterial sodium channel NaChBac / T. M. Gamal El-Din, T. Scheuer, W. A. Catterall // *J. Gen. Physiol.* – 2014. – Vol. 144, No. 2. – P. 147-157.
201. Gama-Reyes, E. G. Migraine-like headaches: a systematic review of secondary etiologies, clinical features and therapeutic patterns (1977–2024) / E. G. Gama-Reyes, A.N. de Caceres-García, M. F. Castillo-Vaca [et al.] // *J. Headache Pain*. – 2025. – Vol. 26, No. 1. – P. 232.
202. Garcia, J. D. Differential roles of NaV1.2 and NaV1.6 in neocortical pyramidal cell excitability / J. D. Garcia, C. Wang, R. P. D. Alexander [et al.] // *Elife*. – 2025. – Vol. 14. – P. e105696.
203. García, P. S. Concentration-dependent dual role of thrombin in protection of cultured rat cortical neurons / P. S. García, V. T. Ciavatta, J. A. Fidler [et al.] // *Neurochem. Res.* – 2015. – Vol. 40. – P. 2220-2229.
204. Gascon, E. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons / E. Gascon, L. Vutskits, J. Z. Kiss // *Brain Res. Rev.* – 2007. – Vol. 56. – P. 101-118.

205. Gattani, A. Evaluation of catalytic activity of human and animal origin viral neuraminidase: Current prospect / A. Gattani, A. Agrawal, M. H. Khan [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2023. – Vol. 671. – P. 115157.
206. de Geest, N. Systemic and neurologic abnormalities distinguish the lysosomal disorders sialidosis and galactosialidosis in mice / N. de Geest, E. Bonten, L. Mann [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – Vol. 11. – P. 1455-1464.
207. Gingrich, M. B. Serine proteases and brain damage – is there a link? / M. B. Gingrich, S.F. Traynelis // *Trends Neurosci.* – 2000. – Vol. 23, No. 9. – P. 399-407.
208. Glanz, V. Y. Sialidase activity in human pathologies / V. Y. Glanz, V. A. Myasoedova, A. V. Grechko, A. N. Orekhov // *Eur. J. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 842. – P. 345-350.
209. Glauser, T. A. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy / T. A. Glauser, A. Cnaan, S. Shinnar [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 362. – P. 790-799.
210. Glien, M. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy / M. Glien, C. Brandt, H. Potschka [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2001. – Vol. 46, No. 2. – P. 111-119.
211. Glien, M. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / M. Glien, C. Brandt, H. Potschka, W. Löscher // *Epilepsia.* – 2002. – Vol. 43, No. 4. – P. 350-357.
212. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 / GBD Epilepsy Collaborators // *Lancet Public Health.* – 2025. – Vol. 10, No. 3. – P. e203-e227.
213. Goffin, K. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat / K. Goffin, J. Nissinen, K. van Laere, A. Pitkänen // *Exp. Neurol.* – 2007. – Vol. 205, No. 2. – P. 501-505.
214. Goldberg, E. M. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction / E. M. Goldberg, D. A. Coulter // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2013. – Vol. 14, No. 5. – P. 337-349.

215. Golderman, V. Thrombin and the protease-activated receptor-1 in organophosphate-induced status epilepticus / V. Golderman, E. Shavit-Stein, O. Gera [et al.] // J. Mol. Neurosci. – 2018. – Vol. 66, No. 1. – P. 94-100.
216. Gordon, E. A. Selective targeting of voltage-gated sodium channels to achieve analgesia: current status and future directions / E. A. Gordon, S. Tyagi, S. D. Dib-Hajj, D. L. Bennett // Pain. – 2025. – Vol. 166, No. 11S. – P. S42-S46.
217. Gorter, J. A. The Roof is Leaking and a Storm is Raging: Repairing the Blood-Brain Barrier in the Fight Against Epilepsy / J. A. Gorter, E. Aronica, E. A. van Vliet // Epilepsy Curr. – 2019. – Vol. 19. – P. 177-181.
218. Gower, H. J. Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain / H. J. Gower, C. H. Barton, V. L. Elsom [et al.] // Cell. – 1988. – Vol. 55. – P. 955-964.
219. Green, J. D. The Hippocampus / J. D. Green // Physiol. Rev. – 1964. – Vol. 44, No. 4. – P. 561-608.
220. Green, W. N. Surface charge and ion channel function / W. N. Green, O. S. Andersen // Annu. Rev. Physiol. – 1991. – Vol. 53. – P. 341-359.
221. Greene, C. Microvascular stabilization via blood-brain barrier regulation prevents seizure activity / C. Greene, N. Hanley, C. Reschke [et al.] // Nat. Commun. – 2022. – Vol. 13, No. 1. – P. 2003.
222. Gutierrez-Merino, C. Cytosolic Calcium Homeostasis in Neurons – Control Systems, Modulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species, and Space and Time Fluctuations / C. Gutierrez-Merino, D. Marques-da-Silva, S. Fortalezas, A.K. Samhan-Arias // Neurochemistry / ed. T. Heinbockel. – London: InTech, 2014. – P. 1-52.
223. Haast, R. A. M. Multiscale structural alterations of the thalamus and basal ganglia in focal epilepsy using 7T MRI / R. A. M. Haast, B. Testud, J. Makhalova [et al.] // Hum. Brain Mapp. – 2023. – Vol. 44, No. 13. – P. 4754-4771.
224. Haglund, M. M. Furosemide and mannitol suppression of epileptic activity in the human brain / M. M. Haglund, D. W. Hochman // J. Neurophysiol. – 2005. – Vol. 94. – P. 907-918.

225. Hamill, C. E. Protease-activated receptor 1-dependent neuronal damage involves NMDA receptor function / C. E. Hamill, G. Mannaioni, P. Lyuboslavsky [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2009. – Vol. 217, No. 1. – P. 136-146.
226. Hamilton, S. E. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice / S. E. Hamilton, M. D. Loose, M. Qi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – Vol. 94, No. 24. – P. 13311-13316.
227. Hammond, M. S. Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid inhibits GLUN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors and prevents glutamate-induced cell death / M. S. Hammond, C. Sims, K. Parameshwaran [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, No. 46. – P. 34859-34869.
228. Han, K. S. Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus / K. S. Han, G. Mannaioni, C. E. Hamill [et al.] // *Mol. Brain.* – 2011. – Vol. 4. – P. 32.
229. Han, T. Seizure induced synaptic plasticity alteration in hippocampus is mediated by IL-1 β receptor through PI3K/Akt pathway / T. Han, Y. Qin, C. Mou [et al.] // *Am. J. Transl. Res.* – 2016. – Vol. 8. – P. 4499-4509.
230. Hånell, A. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research / A. Hånell, N. Marklund // *Front. Behav. Neurosci.* – 2014. – Vol. 8. – P. 252.
231. Hardingham, G. E. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways / G.E. Hardingham, Y. Fukunaga, H. Bading // *Nat. Neurosci.* – 2002. – Vol. 5, No. 5. – P. 405-414.
232. Hardingham, G. E. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders / G. E. Hardingham, H. Bading // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2010. – Vol. 11, No. 10. – P. 682-696.
233. Hargus, N. J. Temporal lobe epilepsy induces intrinsic alterations in Na channel gating in layer II medial entorhinal cortex neurons / N. J. Hargus, E. C. Merrick, A. Nigam [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2011. – Vol. 41. – P. 361-376.
234. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber / R. G. Harrison // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1907. – Vol. 4. – P. 140-143.

235. Hata, K. Distinct Roles of Different Presynaptic and Postsynaptic NCAM Isoforms in Early Motoneuron-Myotube Interactions Required for Functional Synapse Formation / K. Hata, Y. Maeno-Hikichi, N. Yumoto [et al.] // *J. Neurosci.* – 2018. – Vol. 38, No. 2. – P. 498-510.
236. Hauser, W. A. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935–1984 / W. A. Hauser, J. F. Annegers, L. T. Kurland // *Epilepsia.* – 1993. – Vol. 34, No. 3. – P. 453-468.
237. He, B. Sustainable inflammatory activation following spinal cord injury is driven by thrombin-mediated dynamic expression of astrocytic chemokines / B. He, L. Niu, S. Li [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2024. – Vol. 116. – P. 85-100.
238. Hebb, D. O. *The Organisation of Behaviour* / D. O. Hebb. – New York: John Wiley & Sons, 1949.
239. Heine, M. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission / M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht [et al.] // *Science.* – 2008. – Vol. 320. – P. 201-205.
240. Heinemann, U. Extracellular calcium and potassium concentration changes in chronic epileptic brain tissue / U. Heinemann, A. Konnerth, R. Pumain, W.J. Wadman // *Adv. Neurol.* – 1986. – Vol. 44. – P. 641-661.
241. Heinemann, U. An Overview of In Vitro Seizure Models in Acute and Organotypic Slices / U. Heinemann, O. Kann, S. Schuchmann // *Models of Seizures and Epilepsy.* – 2006. – P. 35-44.
242. Heinemann, U. Blood-brain barrier dysfunction, TGF β signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy / U. Heinemann, D. Kaufer, A. Friedman // *Glia.* – 2012. – Vol. 60, No. 8. – P. 1251-1257.
243. Hellier, J. L. NMDA receptor-mediated long-term alterations in epileptiform activity in experimental chronic epilepsy / J. L. Hellier, A. White, P. A. Williams [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2009. – Vol. 56, No. 2. – P. 414-421.
244. Hernan, A. E. Attention deficit associated with early life interictal spikes in a rat model is improved with ACTH / A. E. Hernan, A. Alexander, P.-P. Lenck-Santini [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, No. 2. – P. e89812.

245. Hesdorffer, D. C. Are certain diuretics also anticonvulsants? / D. C. Hesdorffer, J.P. Stables, W. A. Hauser [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2001. – Vol. 50. – P. 458-462.
246. Hicks, R. R. Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus / R. R. Hicks, D. H. Smith, D. H. Lowenstein [et al.] // *J. Neurotrauma.* – 1993. – Vol. 10, No. 4. – P. 405-414.
247. Hinderlich, S. UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase (GNE): A Master Regulator of Sialic Acid Synthesis / S. Hinderlich, W. Weidemann, T. Yardeni [et al.] // *Top. Curr. Chem.* – 2015. – Vol. 366. – P. 97-137.
248. Hladky, S. B. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence / S. B. Hladky, M. A. Barrand // *Fluids Barriers CNS.* – 2014. – Vol. 11. – P. 26.
249. Holper, S. Emergency presentation of new onset versus recurrent undiagnosed seizures: a retrospective review / S. Holper, E. Foster, Z. Chen, P. Kwan // *Emerg. Med. Aust.* – 2020. – Vol. 32. – P. 430-437.
250. Holzmann, K. Signal transduction as an assimilation of signals with different origins and different intracellular states / K. Holzmann, H. Sutterlüty // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, No. 12. – P. 10085.
251. Horii, Y. Increased anxiety-like behavior in neuropsin (kallikrein-related peptidase 8) gene-deficient mice / Y. Horii // *Behav. Neurosci.* – 2008. – Vol. 122. – P. 498-504.
252. Hu, W. The molecular mechanism of sialic acid transport mediated by Sialin / W. Hu, C. Chi, K. Song, H. Zheng // *Sci. Adv.* – 2023. – Vol. 9, No. 3. – P. eade8346.
253. Huang, N. Blood brain barrier dysfunction in epilepsy: Mechanisms, therapeutic strategies and future orientation (Review) / N. Huang, Y. Huang, Z. Deng [et al.] // *Int. J. Mol. Med.* – 2025. – Vol. 56, No. 3. – P. 136.
254. Huang, X. Rapamycin attenuates aggressive behavior in a rat model of pilocarpine-induced epilepsy / X. Huang, J. McMahon, Y. Huang // *Neuroscience.* – 2012. – Vol. 215. – P. 90-97.
255. Huemmeke, M. Lesion-induced enhancement of LTP in rat visual cortex is mediated by NMDA receptors containing the GLUN2B subunit / M. Huemmeke, U.T. Eysel, T. Mittmann // *J. Physiol.* – 2004. – Vol. 559, No. 3. – P. 875.

256. Huguenard, J. Current controversy: spikes, bursts, and synchrony in generalized absence epilepsy: unresolved questions regarding thalamocortical synchrony in absence epilepsy / J. Huguenard // *Epilepsy Curr.* – 2019. – Vol. 19, No. 2. – P. 105-111.
257. Huizing, M. Free sialic acid storage disorder: Progress and promise / M. Huizing, M.E. Hackbarth, D.R. Adams [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2021. – Vol. 755. – P. 135896.
258. Hunter, C. Site-specific immobilization of the endosialidase reveals QSOX2 is a novel polysialylated protein / C. Hunter, T. Derksen, S. Makhsous [et al.] // *Glycobiology.* – 2024. – Vol. 34, No. 5. – P. cwae026.
259. Iadecola, C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease / C. Iadecola // *Neuron.* – 2017. – Vol. 96, No. 1. – P. 17-42.
260. Imiruaye, O. E. Spatiotemporal differential regulation of extrasynaptic GluN2B receptor subunits and PSA-NCAM in brain aging and Alzheimer's disease / O. E. Imiruaye, I. G. Perez, B. C. Carson [et al.] // *Front. Neurosci.* – 2025. – Vol. 19. – P. 1649625.
261. Inostroza, M. Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats / M. Inostroza, E. Cid, J. Brotons-Mas [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, No. 7. – P. e22372.
262. Inostroza, M. Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats / M. Inostroza, E. Cid, L. Menendez de la Prida, C. Sandi // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, No. 6. – P. e38959.
263. Iptyshev, A. M. Comparison of the tests "Radial Arm Maze" and "Morris Water Maze" at evaluation spatial memory in experimental animals in the process of neurobehavioral testing / A. M. Iptyshev, Y. V. Gorina, N. A. Lopatina [et al.] // *Fundamental and Clinical Medicine.* – 2017. – Vol. 2, No. 2. – P. 62-69.
264. Isaev, D. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus / D. Isaev, E. Isaeva, T. Shatskih [et al.] // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 11587-11594.
265. Isaev, D. Surface charge impact on transit ion metal gated sodium channels / D. Isaev, G. Ivanchick, V. Khmyz [et al.] // *J. Neurophysiol.* – 2012. – Vol. 107. – P. 417-423.

266. Isaev, D. Contribution of protease-activated receptor 1 in status epilepticus induced epileptogenesis / D. Isaev, I. Lushnikova, O. Lunko [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2015. – Vol. 78. – P. 68-76.
267. Isaeva, E. V. Metabolic regulation of Ca^{2+} release in permeabilized mammalian skeletal muscle fibres / E. V. Isaeva, N. Shirokova // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 547, Pt 2. – P. 453-462.
268. Isaeva, E. V. Mitochondrial redox state and Ca^{2+} sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle / E. V. Isaeva, V. M. Shkryl, N. Shirokova // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 565, Pt 3. – P. 855-872.
269. Isaeva, E. V. Effects of isoflurane on hippocampal seizures at immature rats in vivo / E. V. Isaeva // *Fiziol. Zh.* – 2008. – Vol. 54, No. 5. – P. 40-45.
270. Isaeva, E. V. Mechanism of antiseizure effect of isoflurane in the immature rat hippocampus / E. V. Isaeva // *Fiziol. Zh.* – 2009. – Vol. 55, No. 1. – P. 57–60.
271. Isaeva, E. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus / E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – Vol. 32. – P. 1889-1896.
272. Isaeva, E. Effect of neuraminidase treatment on persistent epileptiform activity in the rat hippocampus / E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova [et al.] // *Pharmacol. Rep.* – 2011. – Vol. 63. – P. 840-844.
273. Isaeva, E. Thrombin facilitates seizures through activation of persistent sodium current / E. Isaeva, A. Hernan, D. Isaev, G. L. Holmes // *Ann. Neurol.* – 2012. – Vol. 72. – P. 192-198.
274. Ishizuka, N. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat / N. Ishizuka, J. Weber, D. G. Amaral // *J. Comp. Neurol.* – 1990. – Vol. 295, No. 4. – P. 580-623.
275. Isosaari, L. In vitro identification of kainic acid-induced, concentration-dependent responses in human cortical neuronal networks / L. Isosaari, O. Kulta, S. Jäntti [et al.] // *Neuroscience.* – 2025. – Vol. 592. – P. 83-96.

276. Itzekson, Z. Reversal of trauma-induced amnesia in mice by a thrombin receptor antagonist / Z. Itzekson, N. Maggio, A. Milman [et al.] // *J. Mol. Neurosci.* – 2014. – Vol. 53, No. 1. – P. 87.
277. Ivannikov, M. V. Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons / M. V. Ivannikov, M. Sugimori, R. R. Llinás // *Cell Calcium.* – 2010. – Vol. 47, No. 6. – P. 507-513.
278. Ivens, S. TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis / S. Ivens, D. Kaufer, L. P. Flores [et al.] // *Brain.* – 2007. – Vol. 130, Pt 2. – P. 535-547.
279. Ivens, S. Blood-brain barrier breakdown as a novel mechanism underlying cerebral hyperperfusion syndrome / S. Ivens, S. Gabriel, G. Greenberg [et al.] // *J. Neurol.* – 2010. – Vol. 257, No. 4. – P. 615-620.
280. Itoh, K. Lysosomal sialidase NEU1, its intracellular properties, deficiency, and use as a therapeutic agent / K. Itoh, J. Tsukimoto // *Glycoconj. J.* – 2023. – Vol. 40, No. 6. – P. 611-619.
281. Izumi, Y. Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite / Y. Izumi, K. Tokuda, K. O'Dell [et al.] // *Neurosci. Lett.* – 2007. – Vol. 426. – P. 54-58.
282. Izumi, Y. Synaptic and behavioral interactions of oseltamivir (Tamiflu) with neurostimulants / Y. Izumi, K. Tokuda, K. O'Dell [et al.] // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2008. – Vol. 27. – P. 911-917.
283. Jablonski, J. Experimental Epileptogenesis in a Cell Culture Model of Primary Neurons from Rat Brain: A Temporal Multi-Scale Study / J. Jablonski, L. Hoffmann, I. Blümcke [et al.] // *Cells.* – 2021. – Vol. 10, No. 11. – P. 3004.
284. Jackman, S. L. The mechanisms and functions of synaptic facilitation / S. L. Jackman, W. G. Regehr // *Neuron.* – 2017. – Vol. 94, No. 3. – P. 447-464.
285. Jarero-Basulto, J. Interactions between epilepsy and plasticity / J. Jarero-Basulto, Y. Gasca-Martínez, M. Rivera-Cervantes [et al.] // *Pharmaceuticals.* – 2018. – Vol. 11, No. 1. – P. 17-26.
286. Jefferys, J. G. Nonsynaptic modulation of neuronal activity in the brain: electric currents and extracellular ions / J. G. Jefferys // *Physiol. Rev.* – 1995. – Vol. 75. – P. 689-723.

287. Jeon, B. T. The Rho-kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 protects against excitotoxicity-induced neuronal death in vivo and in vitro / B. T. Jeon, E. A. Jeong, S.-Y. Park [et al.] // *Neurotox. Res.* – 2013. – Vol. 23, No. 3. – P. 238-248.
288. Jiang, W. Involvement of extracellular regulated kinase and p38 kinase in hippocampal seizure tolerance / W. Jiang, J. Van Cleemput, A.H. Sheerin [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – Vol. 81, No. 4. – P. 581-588.
289. Jiang, Y. Thrombin-receptor activation and thrombin-induced brain tolerance / Y. Jiang, J. Wu, Y. Hua [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2002. – Vol. 22, No. 4. – P. 404-410.
290. Jiang, Y. Microstructure and functional connectivity-based evidence for memory-related regional impairments in the brains of pilocarpine-treated rats / Y. Jiang, D.F. Liu, X. Zhang [et al.] // *Brain Res. Bull.* – 2020. – Vol. 154. – P. 127-134.
291. Jiang, Y. New insight into the agonism of protease-activated receptors as an immunotherapeutic strategy / Y. Jiang, L. Lu // *J. Biol. Chem.* – 2024. – Vol. 300, No. 2. – P. 105614.
292. Jing, H. Arsenic activates the NLRP3 inflammasome and disturbs the Th1/Th2/Th17/Treg balance in the hippocampus in mice / H. Jing, N. Yan, R. Fan [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2023. – Vol. 201, No. 7. – P. 3395-3403.
293. Johanson, C. E. Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid Transport Dynamics: Support of Brain Health and a Role in Neurotherapeutics / C. E. Johanson // *Conn's Translational Neuroscience.* – 2017. – P. 233-261.
294. Johnsen, K. B. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery / K. B. Johnsen, A. Burkhart, L. B. Thomsen [et al.] // *Prog. Neurobiol.* – 2019. – Vol. 181. – P. 101665.
295. Johnson, D. Isoform-specific effects of the beta2 subunit on voltage-gated sodium channel gating / D. Johnson, E.S. Bennett // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 25875-25881.
296. Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // *American Journal of Physiology.* – 2008. – Vol. 295, No. 4. – P.849-868.

297. Jope, R. S. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats / R.S. Jope, R.A. Morrisett, O.C. Snead // *Exp. Neurol.* – 1986. – Vol. 91, No. 3. – P. 471-480.
298. Jung, K.-H. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus / K.-H. Jung, K. Chu, S.-T. Lee [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2006. – Vol. 23, No. 2. – P. 237-246.
299. Junge, C. E. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia / C. E. Junge, T. Sugawara, G. Mannaioni [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – Vol. 100, No. 22. – P. 13019-13024.
300. Junge, C. E. Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes / C. E. Junge, C. J. Lee, K. B. Hubbard [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2004. – Vol. 188. – P. 94-103.
301. Juvale, I. I. A. The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus / I. I. A. Juvale, A. T. C. Has // *Heliyon.* – 2020. – Vol. 6. – P. e04557.
302. Kaeck, S. Culturing hippocampal neurons / S. Kaeck, G. Banker // *Nat. Protoc.* – 2006. – Vol. 1, No. 5. – P. 2406-2415.
303. Kalaparti, S. V. G. V. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: comparative clinical and arterial spin labeling findings according to neocortical MRI changes / S. V. G. V. Kalaparti, A. Radhakrishnan, D.A. Narasimhaiah [et al.] // *Neuroradiology.* – 2025. – Vol. 67, No. 10. – P. 2823-2833.
304. Kalliokoski, A. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics / A. Kalliokoski, M. Niemi // *Br. J. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 158, No. 3. – P. 693-705.
305. Katz, B. The role of calcium in neuromuscular facilitation / B. Katz, R. Miledi // *J. Physiol.* – 1968. – Vol. 195, No. 2. – P. 481-492.
306. Kerchner, G. A. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP / G.A. Kerchner, R.A. Nicoll // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2008. – Vol. 9. – P. 813-825.
307. Keuker, J. I. A cytoarchitectonic study of the hippocampal formation of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) / J. I. Keuker, C. D. Rochford, M. P. Witter, E. Fuchs // *J. Chem. Neuroanat.* – 2003. – Vol. 26, No. 1. – P. 1-15.

308. Kim, H. N. The thrombin receptor modulates astroglia-neuron trophic coupling and neural repair after spinal cord injury / H. N. Kim, E. M. Triplet, M. Radulovic [et al.] // *Glia*. – 2021. – Vol. 69, No. 9. – P. 2111-2132.
309. Kim, Y. Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse / Y. Kim, K. U. Venkataraju, K. Pradhan [et al.] // *Cell Rep.* – 2015. – Vol. 10. – P. 292-305.
310. Kirolos, S. A. The extracellular sialidase NEU3 primes neutrophils / S. A. Kirolos, D. Pilling, R. H. Gomer // *J. Leukoc. Biol.* – 2022. – Vol. 112, No. 6. – P. 1399-1411.
311. Klebe, D. Dabigatran ameliorates post-haemorrhagic hydrocephalus development after germinal matrix haemorrhage in neonatal rat pups / D. Klebe, J.J. Flores, D.W. McBride [et al.] // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2017. – Vol. 37, No. 9. – P. 3135.
312. Kondziella, D. Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression? / D. Kondziella, S. Alvestad, A. Vaaler, U. Sonnewald // *J. Neurochem.* – 2007. – Vol. 103. – P. 2136-2152.
313. Kostyuk, P. G. Effects of calcium and calcium chelating agents on the inward and outward current in the membrane of mollusk neurons / P. G. Kostyuk, O. A. Krishtal // *J. Physiol.* – 1977. – Vol. 270. – P. 569-580.
314. Kovács, R. Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: role of astroglia / R. Kovács, U. Heinemann, C. Steinhäuser // *Epilepsia*. – 2012. – Vol. 53, Suppl. 6. – P. 53-59.
315. Kowski, A. B. Electrically induced limbic seizures: preliminary findings in a rodent model / A. B. Kowski, M. Holtkamp // *J. Exp. Neurosci.* – 2015. – Vol. 9. – P. 7-14.
316. Krishnaswamy, V. R. Demystifying the extracellular matrix and its proteolytic remodeling in the brain: structural and functional insights / V. R. Krishnaswamy, A. Benbenishty, P. Blinder, I. Sagi // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2019. – Vol. 76, No. 16. – P. 3229-3248.
317. Kryukov, K. A. Status epilepticus alters hippocampal long-term synaptic potentiation in a rat lithium-pilocarpine model / K. A. Kryukov, K. K. Kim, L.G. Magazanik, A. V. Zaitsev // *Neuroreport*. – 2016. – Vol. 27, No. 16. – P. 1191.

318. Kuhnline Sloan, C. D. Analytical and biological methods for probing the blood-brain barrier / C. D. Kuhnline Sloan, P. Nandi, T. H. Linz [et al.] // *Annu. Rev. Anal. Chem.* – 2012. – Vol. 5. – P. 505-531.
319. Kwan, P. Early identification of refractory epilepsy / P. Kwan, M. J. Brodie // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – P. 314-319.
320. Kwan, P. Drug-resistant epilepsy / P. Kwan, S. C. Schachter, M. J. Brodie // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 365, No. 10. – P. 919-926.
321. Langton, P. D. Calcium channel currents recorded from isolated myocytes of rat basilar artery are stretch sensitive / P. D. Langton // *J. Physiol.* – 1993. – Vol. 471. – P. 1-11.
322. Lee, C. J. Astrocytic control of synaptic NMDA receptors / C. J. Lee, G. Mannaioni, H. Yuan [et al.] // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 581. – P. 1057-1081.
323. Lee, K. R. Seizures induced by intracerebral injection of thrombin: a model of intracerebral hemorrhage / K. R. Lee, I. Drury, E. Vitarbo, J. T. Hoff // *J. Neurosurg.* – 1997. – Vol. 87. – P. 73-78.
324. Lee, P. R. Dietary treatments for epilepsy: management guidelines for the general practitioner / P. R. Lee, E. H. Kossoff // *Epilepsy Behav.* – 2011. – Vol. 21. – P. 115-121.
325. Leifeld, J. Considering the Role of Extracellular Matrix Molecules, in Particular Reelin, in Granule Cell Dispersion Related to Temporal Lobe Epilepsy / J. Leifeld, E. Förster, G. Reiss, M.I.K. Hamad // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2022. – Vol. 10. – P. 917575.
326. Leite, J. P. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy / J. P. Leite, Z. A. Bortolotto, E. A. Cavalheiro // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1990. – Vol. 14, No. 4. – P. 511-517.
327. Leite, J. P. New insights from the use of pilocarpine and kainate models / J. P. Leite, N. Garcia-Cairasco, E. A. Cavalheiro // *Epilepsy Res.* – 2002. – Vol. 50, No. 1-2. – P. 93-103.
328. Lenz, M. Systemic thrombin inhibition ameliorates seizures in a mouse model of pilocarpine-induced status epilepticus / M. Lenz, M. B. Shimon, F. Benninger [et al.] // *J. Mol. Med. (Berl).* – 2019. – Vol. 97, No. 11. – P. 1567-1574.

329. Leung, W. L. Inherent susceptibility to acquired epilepsy in selectively bred rats influences the acute response to traumatic brain injury / W. L. Leung, L. K. Dill, P. Perucca [et al.] // *J. Neurotrauma*. – 2023. – Vol. 40, No. 19–20. – P. 2174-2192.
330. Lewis, D. V. Febrile status epilepticus and epileptogenesis: The FEBSTAT study / D. V. Lewis, D. R. Nordli Jr., D. R. Nordli 3rd [et al.] // *Epilepsia Open*. – 2025. – Vol. 10. – P. e70113.
331. Li, C. Intraventricular administration of endoneuraminidase-N facilitates ectopic migration of subventricular zone-derived neural progenitor cells into 6-OHDA lesioned striatum of mice / C. Li, Y.X. Zhang, C. Yang [et al.] // *Exp. Neurol*. – 2016. – Vol. 277. – P. 139-149.
332. Li, H. Impaired hippocampal circuit function underlying memory encoding and consolidation precede robust A β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease / H. Li, Z. Zhao, A. Fassini [et al.] // *Sci. Rep*. – 2025. – Vol. 15, No. 1. – P. 21957.
333. Li, N. Voltage-gated sodium channels in the nervous system: Molecular physiology to therapeutic interventions / N. Li, L. Yan, A. Peng [et al.] // *Neural Regen. Res*. – 2025. – In press.
334. Li, X. Effect of GABA $_A$ -receptors on neuronal discharge and ion activity in focal seizures / X. Li, Z. Qu, Z. Li [et al.] // *Cereb. Cortex*. – 2024. – Vol. 34, No. 3. – P. bhae110.
335. Li, X. G. The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study / X. G. Li, P. Somogyi, A. Ylinen, G. Buzsáki // *J. Comp. Neurol*. – 1994. – Vol. 339, No. 2. – P. 181-208.
336. Li, X. Long-term expressional changes of Na $^+$ -K $^+$ -Cl $^-$ co-transporter 1 (NKCC1) and K $^+$ -Cl $^-$ co-transporter 2 (KCC2) in CA1 region of hippocampus following lithium-pilocarpine induced status epilepticus (PISE) / X. Li, J. Zhou, Z. Chen [et al.] // *Brain Res*. – 2008. – Vol. 1221. – P. 141-146.
337. Li, Y. Zebrafish: A promising in vivo model for assessing the delivery of natural products, fluorescence dyes and drugs across the blood-brain barrier / Y. Li, T. Chen, X. Miao [et al.] // *Pharmacol. Res*. – 2017. – Vol. 125. – P. 246-257.

338. Liao, S.M. Molecular Interactions of the Polysialyltransferase Domain (PSTD) in ST8Sia IV with CMP-Sialic Acid and Polysialic Acid Required for Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule Proteins: An NMR Study / S.M. Liao, B. Lu, X.H. Liu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, No. 5. – P. 1590.
339. Lim, Z. D. Exploring metabolic biomarkers and pathways in pharmacoresistant epilepsy: A systematic review / Z. D. Lim, N. A. S. Abdullah, K. S. Lim [et al.] // *Epilepsy Res.* – 2025. – Vol. 218. – P. 107656.
340. Lippmann, K. A reduction in the readily releasable vesicle pool impairs GABAergic inhibition in the hippocampus after blood-brain barrier dysfunction / K. Lippmann // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25, No. 13. – P. 6862.
341. Liu, D. In vitro and in vivo studies on the transport of PEGylated silica nanoparticles across the blood-brain barrier / D. Liu, B. Lin, W. Shao [et al.] // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2014. – Vol. 6. – P. 2131-2136.
342. Liu, R. Dysregulation of ion channels and transporters and blood-brain barrier dysfunction in Alzheimer's disease and vascular dementia / R. Liu, J. M. Collier, N. H. Abdul-Rahman [et al.] // *Aging Dis.* – 2024. – Vol. 15, No. 4. – P. 1748–1770.
343. Liu, X. B. Reticular nucleus-specific changes in alpha3 subunit protein at GABA synapses in genetically epilepsy-prone rats / X. B. Liu, J. Coble, G. van Luijtelaar, E. G. Jones // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – Vol. 104, No. 30. – P. 12512-12517.
344. Loescher, W. Structural, Molecular, and Functional Alterations of the Blood-Brain Barrier during Epileptogenesis and Epilepsy: A Cause, Consequence, or Both? / W. Loescher, A. Friedman // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 604.
345. Lopes, M. W. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy / M. W. Lopes, S. C. Lopes, D. B. Santos [et al.] // *Epilepsy Behav.* – 2016. – Vol. 55. – P. 92-100.
346. López-Amador, N. Addressing the Medicolegal Aspects of Temporal Lobe Epilepsy: A Literature Review / N. López-Amador, R. Castro-Morales, P. Denis-Rodríguez, O. Carvajal-Zarrabal // *Cureus.* – 2024. – Vol. 16, No. 12. – P. e76310.
347. Löscher, W. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family / W. Löscher, H. Potschka // *NeuroRx.* – 2005. – Vol. 2, No. 1. – P. 86-98.

348. van Luijtelaar, G. Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models / G. van Luijtelaar, E. Sitnikova // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2006. – Vol. 30, No. 7. – P. 983-1003.
349. van Luijtelaar, G. Spike-wave discharges in WAG/Rij rats are preceded by delta and theta precursor activity in cortex and thalamus / G. van Luijtelaar, A. Hramov, E. Sitnikova, A. Koronovskii // *Clinical Neurophysiology*. – 2011. – Vol. 122, No. 4. – P. 687-695.
350. Lunko, O. O. The protease-activated receptor 1 inhibition during epileptogenesis does not alter behavioral excitability in rats / O. O. Lunko, R. I. Bogovyk, M. P. Fedoriuk [et al.] // *Fiziol. Zh.* – 2018. – Vol. 64, No. 1. – P. 12-18.
351. Luo, W. Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection / W. Luo, Y. F. Wang, G. Reiser // *Brain Res. Rev.* – 2007. – Vol. 56. – P. 331-345.
352. Lushnikova, I. V. Spatial distribution of synaptic vesicles in CA1 hippocampal synapses under conditions of induced long-term potentiation in vitro / I. V. Lushnikova, I. R. Nikonenko, O. H. Nikonenko [et al.] // *Fiziol. Zh.* – 2008. – Vol. 54. – P. 35-44.
353. Lüthi, A. Endogenous Serine Protease Inhibitor Modulates Epileptic Activity and Hippocampal Long-Term Potentiation / A. Lüthi, H. van der Putten, F. M. Botteri [et al.] // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol. 17, No. 12. – P. 4688-4699.
354. Lynch, G. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long term potentiation / G. Lynch, J. Larson, S. Kelso [et al.] // *Nature*. – 1983. – Vol. 305, No. 5936. – P. 719-721.
355. Ma, G. Development of a high-efficiency N-acetylneuraminic acid production platform through multi-pathway synergistic engineering / G. Ma, X. Jiang, B. Yang [et al.] // *Trends Biotechnol.* – 2025. – Vol. 43, No. 12. – P. 3105-3133.
356. Mac, T. L. AEDs availability and professional practices in delivery outlets in a city center in southern Vietnam / T. L. Mac, V. T. Le, A. N. Vu [et al.] // *Epilepsia*. – 2006. – Vol. 47. – P. 330-334.
357. Maggio, N. 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 / N. Maggio, E. Shavit, J. Chapman, M. Segal // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol. 28. – P. 732-736.
358. Maggio, N. Thrombin regulation of synaptic transmission: implications for seizure onset / N. Maggio, C. Cavaliere, M. Papa [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2013a. – Vol. 50. – P. 171-178.
359. Maggio, N. Thrombin regulation of synaptic plasticity: implications for physiology and pathology / N. Maggio, Z. Itsekson, D. Dominissini [et al.] // *Exp. Neurol.* – 2013b. – Vol. 247. – P. 595-604.
360. Maggio, N. Cannabidiol Regulates Long Term Potentiation Following Status Epilepticus: Mediation by Calcium Stores and Serotonin / N. Maggio, E. Shavit Stein, M. Segal // *Front. Mol. Neurosci.* – 2018. – Vol. 11. – P. 32.
361. Malenka, R. C. LTP and LTD / R. C. Malenka, M.F. Bear // *Neuron.* – 2004. – Vol. 44, No. 1. – P. 5-21.
362. Malkin, S. L. Enhanced excitability of CA1 pyramidal neurons during the latent phase of the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / S. L. Malkin, A. V. Zaitsev // *Neuroscience.* – 2025. – Vol. 579. – P. 144-156.
363. Malykh, Y. N. Distribution and localization of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase and N-glycolylneuraminic acid-containing glycoconjugates in porcine lymph node and peripheral blood lymphocytes / Y. N. Malykh, B. Krisch, L. Shaw [et al.] // *Eur. J. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 80, No. 1. – P. 48-58.
364. Manaenko, A. PAR-1 antagonist SCH79797 ameliorates apoptosis following surgical brain injury through inhibition of ASK1-JNK in rats / A. Manaenko, X. Sun, C.H. Kim [et al.] // *Neurobiol. Dis.* – 2013. – Vol. 50. – P. 13-20.
365. Marchetti, C. South African plants used in traditional medicine to treat epilepsy have an antagonistic effect on NMDA receptor currents / C. Marchetti, P. Gavazzo, G.I. Stafford, J. Van Staden // *J. Ethnopharmacol.* – 2011. – Vol. 137. – P. 382-388.
366. Marchi, N. The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders / N. Marchi, W. Tierney, A.V. Alexopoulos [et al.] // *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 482415.

367. Marchi, N. Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: Pathophysiologic role and therapeutic approaches / N. Marchi, T. Granata, C. Ghosh, D. Janigro // *Epilepsia*. – 2012. – Vol. 53. – P. 1877-1886.
368. Maroso, M. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures / M. Maroso, S. Balosso, T. Ravizza [et al.] // *Nat. Med.* – 2010. – Vol. 16, No. 4. – P. 413-419.
369. Marques-Carneiro, J. E. Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): Inclusion of Wistar rats as a second control / J. E. Marques-Carneiro, J. B. Faure, B. Cosquer [et al.] // *Epilepsia*. – 2014. – Vol. 55, No. 9. – P. 1460-1468.
370. Martín-Padura, I. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration / I. Martín-Padura, S. Lostaglio, M. Schneemann [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1998. – Vol. 142, No. 1. – P. 117-127.
371. Mathiisen, T.M. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction / T. M. Mathiisen, K. P. Lehre, N. C. Danbolt, O. P. Ottersen // *Glia*. – 2010. – Vol. 58, No. 9. – P. 1094-1103.
372. Matovic, S. Neuronal hypertrophy dampens neuronal intrinsic excitability and stress responsiveness during chronic stress / S. Matovic, A. Ichiyama, H. Igarashi [et al.] // *J. Physiol.* – 2020. – Vol. 598, No. 13. – P. 2757-2773.
373. Matsubara, S. Regulation of Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis by Cell Extrinsic and Intrinsic Factors / S. Matsubara, T. Matsuda, K. Nakashima // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, No. 5. – P. 1145.
374. Matsuka, Y. Hyperosmolar solutions selectively block action potentials in rat myelinated sensory fibers: implications for diabetic neuropathy / Y. Matsuka, I. Spigelman // *J. Neurophysiol.* – 2004. – Vol. 91. – P. 48-56.
375. Matsumoto, M. Neuraminidase inhibition promotes the collective migration of neurons and recovery of brain function / M. Matsumoto, K. Matsushita, M. Hane [et al.] // *EMBO Mol. Med.* – 2024. – Vol. 16. – P. 1228-1253.
376. McHugh, S.B. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to

- mechanisms of fear and anxiety / S.B. McHugh, R.M.J. Deacon, J.N.P. Rawlins, D.M. Bannerman // *Behav. Neurosci.* – 2004. – Vol. 118, No. 1. – P. 63-78.
377. McNamara, J. O. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy / J. O. McNamara // *Ann. Neurol.* – 1984. – Vol. 16. – P. 72–76.
378. McNamara, J. O. Kindling model of epilepsy / J. O. McNamara // *Adv. Neurol.* – 1986. – Vol. 44. – P. 303-318.
379. McQuate, A. Rapid exchange of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in hippocampal CA1 neurons / A. McQuate, A. Barria // *J. Neurophysiol.* – 2020. – Vol. 123, No. 3. – P. 1004-1014.
380. Meadows, L. S. Functional modulation of human brain Nav1.3 sodium channels, expressed in mammalian cells, by auxiliary beta 1, beta 2 and beta 3 subunits / L. S. Meadows, Y. H. Chen, A. J. Powell [et al.] // *Neuroscience.* – 2002. – Vol. 114. – P. 745-756.
381. Mellor, J. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels / J. Mellor, R. Nicoll, D. Schmitz // *Science.* – 2002. – Vol. 295. – P. 143-147.
382. Mendes, N. F. The Blood-Brain Barrier Breakdown During Acute Phase of the Pilocarpine Model of Epilepsy Is Dynamic and Time-Dependent / N. F. Mendes, A. P. Pansani [et al.] // *Front. Neurol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 382.
383. Meuillet, E. J. Sialidase gene transfection enhances epidermal growth factor receptor activity in an epidermoid carcinoma cell line, A431 / E. J. Meuillet, R. Kroes, H. Yamamoto [et al.] // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59, No. 1. – P. 234-240.
384. Meyers, K. T. Serial electroconvulsive seizure alters dendritic complexity and promotes cellular proliferation in the mouse dentate gyrus; a role for Egr3 / K. T. Meyers, C. C. Damphousse, A. B. Ozols [et al.] // *Brain Stimul.* – 2023. – Vol. 16, No. 3. – P. 889-900.
385. Miesenböck, G. Optogenetic control of cells and circuits / G. Miesenböck // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 731-758.
386. Mihály, A. Immunohistochemical localization of extravasated serum albumin in the hippocampus of human subjects with partial and generalized epilepsies and epileptiform convulsions / A. Mihály, B. Bozóky // *Acta Neuropathol.* – 1984. – Vol. 65, No. 1. – P. 25-34.

387. Miles, R. Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus / R. Miles, R.K. Wong // *J. Physiol.* – 1986. – Vol. 373. – P. 397-418.
388. Minami, A. Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent spatial memory / A. Minami, M. Saito, S. Mamada [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – P. 1-13.
389. Minami, A. The Function of Sialidase Revealed by Sialidase Activity Imaging Probe / A. Minami, Y. Kurebayashi, T. Takahashi [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, No. 6. – P. 3187.
390. Mindler, K. The polyfunctional polysialic acid: A structural view / K. Mindler, E. Ostertag, T. Stehle // *Carbohydr. Res.* – 2021. – Vol. 507. – P. 108376.
391. Miyagi, T. Sialidase NEU3 and its pathological significance / T. Miyagi, K. Yamamoto // *Glycoconj. J.* – 2022. – Vol. 39, No. 5. – P. 677-683.
392. Mody, I. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release / I. Mody, J. F. MacDonald // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1995. – Vol. 16. – P. 356-359.
393. Mohammad, H. Perampanel but Not Amantadine Prevents Behavioral Alterations and Epileptogenesis in Pilocarpine Rat Model of Status Epilepticus / H. Mohammad, S. Sekar, Z. Wei [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2019. – Vol. 56, No. 4. – P. 2508-2523.
394. Montagne, A. Blood-brain barrier permeability and gadolinium: benefits and potential pitfalls in research / A. Montagne, A. W. Toga, B. V. Zlokovic // *JAMA Neurol.* – 2016. – Vol. 73. – P. 13-14.
395. Moremen, K. W. Expression system for structural and functional studies of human glycosylation enzymes / K. W. Moremen, A. Ramiah, M. Stuart [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – Vol. 14, No. 2. – P. 156-162.
396. Morimoto, K. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain / K. Morimoto, M. Fahnstock, R. J. Racine // *Prog. Neurobiol.* – 2004. – Vol. 73, No. 1. – P. 1-60.
397. Morris, R. G. M. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions / R. G. M. Morris, P. Garrud, J. N. P. Rawlins, J. O'Keefe // *Nature.* – 1982. – Vol. 297. – P. 681-683.
398. Moser, V. C. Comparison of chlordimeform and carbaryl using a functional observational battery / V. C. Moser, J. P. McCormick, J. P. Creason, R. C. MacPhail //

- Fundam. Appl. Toxicol. – 1988. – Vol. 11, No. 2. – P. 189-206.
399. Moser, V. C. Functional Assays for Neurotoxicity Testing / V. C. Moser // Toxicol. Pathol. – 2011. – Vol. 39, No. 1. – P. 36-45.
400. Moya, M. L. A Reconfigurable In Vitro Model for Studying the Blood-Brain Barrier / M. L. Moya, M. Triplett, M. Simon [et al.] // Ann. Biomed. Eng. – 2020. – Vol. 48. – P. 780-793.
401. Mula, M. Treatment of anxiety disorders in epilepsy: An evidence-based approach / M. Mula // Epilepsia. – 2013. – Vol. 54. – P. 13-18.
402. Müller, C. J. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: Development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage / C. J. Müller, M. Bankstahl, I. Gröticke, W. Löscher // Eur. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 619, No. 1–3. – P. 15-24.
403. Muller, D. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity / D. Muller, C. Wang, G. Skibo [et al.] // Neuron. – 1996. – Vol. 17, No. 3. – P. 413-422.
404. Muller, D. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus / D. Muller, Z. Djebbara-Hannas, P. Jourdain [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2000. – Vol. 97, No. 8. – P. 4315-4320.
405. Müller, L. Enhanced NMDA receptor-dependent LTP in the epileptic CA1 area via upregulation of GLUN2B / L. Müller, T. Tokay, K. Porath [et al.] // Neurobiol. Dis. – 2013. – Vol. 54. – P. 183.
406. Muralikrishna Adibhatla, R. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia / R. Muralikrishna Adibhatla, J.F. Hatcher // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – Vol. 40, No. 3. – P. 376-387.
407. Murray, M. R. Nervous tissue in vitro / M. R. Murray // Cells and Tissue in Culture / ed. E. N. Willmer. – New York : Academic Press, 1965. – P. 311-372.
408. Muzykewicz, D. A. Efficacy, safety, and tolerability of the low glycemic index treatment in pediatric epilepsy / D. A. Muzykewicz, D. A. Lyczkowski, N. Memon [et al.] // Epilepsia. – 2009. – Vol. 50. – P. 1118-1126.

409. Nadjat-Haiem, C. Anesthesia for carotid and cerebrovascular procedures in interventional neuroradiology / C. Nadjat-Haiem, K. Ziv, I. Osborn // *Int. Anesthesiol. Clin.* – 2009. – Vol. 47, No. 2. – P. 29-43.
410. Nadler, J. J. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice / J. J. Nadler, S. S. Moy, G. Dold [et al.] // *Genes Brain Behav.* – 2004. – Vol. 3, No. 5. – P. 303-314.
411. Nagao, T. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation / T. Nagao, A. Alonso, M. Avoli // *Neuroscience.* – 1996. – Vol. 72, No. 2. – P. 399-408.
412. Nagelhus, E. A. Physiological roles of aquaporin-4 in brain / E. A. Nagelhus, O. P. Ottersen // *Physiol. Rev.* – 2013. – Vol. 93, No. 4. – P. 1543-1562.
413. Nakazawa, K. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall / K. Nakazawa, M. C. Quirk, R. A. Chitwood [et al.] // *Science.* – 2002. – Vol. 297, No. 5579. – P. 211-218.
414. Nakazawa, K. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory / K. Nakazawa, T. J. McHugh, M. A. Wilson, S. Tonegawa // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2004. – Vol. 5, No. 5. – P. 361-372.
415. Nascimento Häckl, L. P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats / L. P. Nascimento Häckl, A. P. Carobrez // *Neurobiol. Learn. Mem.* – 2007. – Vol. 88. – P. 177-185.
416. Neal, E. G. Network connectivity separate from the hypothesized irritative zone correlates with impaired cognition and higher rates of seizure recurrence / E. G. Neal, L. Di, A. Reale-Caldwell [et al.] // *Epilepsy Behav.* – 2019. – Vol. 101, Pt A. – P. 106585.
417. Nevin, S. T. Functional modulation of the human voltage-gated sodium channel NaV1.8 by auxiliary β subunits / S. T. Nevin, N. Lawrence, A. Nicke [et al.] // *Channels (Austin).* – 2021. – Vol. 15, No. 1. – P. 79-93.
418. Nicoll, R. A. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation / R. A. Nicoll, R. C. Malenka // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 868. – P. 515-525.

419. Nicoll, R. A. A Brief History of Long-Term Potentiation / R. A. Nicoll // *Neuron*. – 2017. – Vol. 93, No. 2. – P. 281-290.
420. Niewoehner, B. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus / B. Niewoehner, F.N. Single, Ø. Hvalby [et al.] // *Eur. J. Neurosci*. – 2007. – Vol. 25. – P. 837-846.
421. Niimura, M. Changes in phosphorylation of the NMDA receptor in the rat hippocampus induced by status epilepticus / M. Niimura, R. Moussa, N. Bissoon [et al.] // *J. Neurochem*. – 2005. – Vol. 92, No. 6. – P. 1377-1385.
422. Nitta, T. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice / T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh [et al.] // *J. Cell Biol*. – 2003. – Vol. 161, No. 3. – P. 653-660.
423. Noebels, J. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies / J. Noebels, M. Avoli, M. Rogawski [et al.]. – 4th edition. – Oxford : Oxford Medical, 2012. – 1264 p.
424. Noristani, H. Increased hippocampal CA1 density of serotonergic terminals in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: an ultrastructural study / H. Noristani, R. Meadows, M. Olabarria [et al.] // *Cell Death Dis*. – 2011. – Vol. 2. – P. e210.
425. Nunez, J. Morris water maze experiment / J. Nunez // *J. Vis. Exp*. – 2008. – P. 12-13.
426. Nuthikattu, S. Single nuclei transcriptomics in diabetic mice reveals altered brain hippocampal endothelial cell function, permeability, and behavior / S. Nuthikattu, D. Milenkovic, J.E. Norman, A.C. Villablanca // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis*. – 2024. – Vol. 1870, No. 2. – P. 166970.
427. Obermeier, B. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier / B. Obermeier, R. Daneman, R. M. Ransohoff // *Nat. Med*. – 2013. – Vol. 19. – P. 1584-1596.
428. Oby, E. The blood-brain barrier and epilepsy / E. Oby, D. Janigro // *Epilepsia*. – 2006. – Vol. 47, No. 11. – P. 1761-1774.
429. Ochoa, J. G. Electrolyte therapy for refractory seizures in familial dysautonomia / J. G. Ochoa // *Epilepsia*. – 2004. – Vol. 45. – P. 1461-1462.
430. Oddo, A. Advances in Microfluidic Blood-Brain Barrier (BBB) Models / A. Oddo, B. Peng, Z. Tong [et al.] // *Trends Biotechnol*. – 2019. – Vol. 37, No. 12. – P. 1295-1314.

431. Odermatt, P. Availability and costs of antiepileptic drugs and quality of phenobarbital in Vientiane municipality, Lao PDR / P. Odermatt, S. Ly, C. Simmala [et al.] // *Neuroepidemiology*. – 2007. – Vol. 28. – P. 169-174.
432. Oh, S. J. Protease activated receptor 1-induced glutamate release in cultured astrocytes is mediated by Bestrophin-1 channel but not by vesicular exocytosis / S. J. Oh, K. S. Han, H. Park [et al.] // *Molecular Brain*. – 2012. – Vol. 5. – P. 38.
433. Oldendorf, W. H. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat / W. H. Oldendorf, M. E. Cornford, W. J. Brown // *Annals of Neurology*. – 1977. – Vol. 1, No. 5. – P. 409-417.
434. O'Leary, H. Nucleotides and phosphorylation bi-directionally modulate Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) binding to the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit GluN2B / H. O'Leary, W. H. Liu, J. M. Rorabaugh [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, No. 36. – P. 31272-31281.
435. Oliveira, M. S. Altered expression and function of small-conductance (SK) $\text{Ca}^{(2+)}$ -activated K^{+} channels in pilocarpine-treated epileptic rats / M. S. Oliveira, F. Skinner, M. F. Arshadmansab [et al.] // *Brain Research*. – 2010. – Vol. 1348. – P. 187-199.
436. Olney, J. W. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents / J. W. Olney, T. de Gubareff, J. Labruyere // *Nature*. – 1983. – Vol. 301, No. 5900. – P. 520-522.
437. Olson, E. E. PAR-1 deficiency protects against neuronal damage and neurologic deficits after unilateral cerebral hypoxia/ischemia / E. E. Olson, P. Lyuboslavsky, S. F. Traynelis [et al.] // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2004. – Vol. 24, No. 9. – P. 964-971.
438. Onimaru, H. Cell Responses of the Ventrolateral Medulla to PAR1 Activation and Changes in Respiratory Rhythm in Newborn Rat En Bloc Brainstem-Spinal Cord Preparations / H. Onimaru, I. Fukushi, K. Ikeda [et al.] // *Neuroscience*. – 2023. – Vol. 528. – P. 89-101.
439. Orbán-Kis, K. Spatial memory deficits in juvenile rats with pilocarpine induced temporal lobe epilepsy / K. Orbán-Kis, I. Mihály, I. Lukács [et al.] // *Acta Medica Marisiensis*. – 2014. – Vol. 60. – P. 191-195.

440. Orrenius, S. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link / S. Orrenius, B. Zhivotovsky, P. Nicotera // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2003. – Vol. 4, No. 7. – P. 552–565.
441. Ortega, A. ASTROGLIA: Molecular Mechanisms, Functional Roles, and Neurophysiological Implications in the Central Nervous System / A. Ortega, L. A. Martínez-Nuncio, E. Taddei [et al.] // *Life (Basel)*. – 2025. – Vol. 15, No. 10. – P. 1505.
442. Ou, S. Development and Validation of a Prognostic Model to Predict Late Seizures After Traumatic Brain Injury: A Retrospective Analysis / S. Ou, L. Sun, Y. Lu [et al.] // *Journal of Craniofacial Surgery*. – 2025. – Vol. 36, No. 5. – P. 1827-1834.
443. Öz, P. Action potential initiation in a multi-compartmental model with cooperatively gating Na channels in the axon initial segment / P. Öz, M. Huang, F. Wolf // *Journal of Computational Neuroscience*. – 2015. – Vol. 39, No. 1. – P. 63-75.
444. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease / P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet // *Physiological Reviews*. – 2007. – Vol. 87, No. 1. – P. 315-424.
445. Pandis, C. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus / C. Pandis, E. Sotiriou, E. Kouvaras [et al.] // *Neuroscience*. – 2006. – Vol. 140. – P. 163-175.
446. Paoletti, P. Mechanosensitivity of NMDA receptors in cultured mouse central neurons / P. Paoletti, P. Ascher // *Neuron*. – 1994. – Vol. 13. – P. 645-655.
447. Paoletti, P. NMDA receptor subunits: function and pharmacology / P. Paoletti, J. Neyton // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2007. – Vol. 7, No. 1. – P. 39-47.
448. Papatheodoropoulos, C. 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 / C. Papatheodoropoulos, C. Moschovos, G. Kostopoulos // *Neuroscience*. – 2005. – Vol. 135. – P. 765-779.
449. Papini, N. The plasma membrane-associated sialidase MmNEU3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cell supporting its involvement in cell-to-cell interactions / N. Papini, L. Anastasia, C. Tringali [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – P. 16989-16995.

450. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development / W. M. Pardridge // *NeuroRx*. – 2005. – Vol. 2, No. 1. – P. 3-14.
451. Pardridge, W. M. Blood–brain barrier delivery / W. M. Pardridge // *Drug Discovery Today*. – 2007. – Vol. 12. – P. 54-61.
452. Pardridge, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier / W. M. Pardridge // *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. – 2012. – Vol. 32, No. 11. – P. 1959-1972.
453. Park, H. High glutamate permeability and distal localization of Best1 channel in CA1 hippocampal astrocyte / H. Park, K. S. Han, S. J. Oh [et al.] // *Molecular Brain*. – 2013. – Vol. 6. – P. 54.
454. Parys, J. B. Full focus on calcium / J. B. Parys, A. H. Guse // *Science Signaling*. – 2019. – Vol. 12, No. 599. – P. eaaz0961.
455. Patel, D. C. Neuron-glia interactions in the pathophysiology of epilepsy / D. C. Patel, B. P. Tewari, L. Chaunsali, H. Sontheimer // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2019. – Vol. 20. – P. 282-297.
456. Patel, K. H. Pearls & Oy-sters: Mesial Temporal Seizures in the Absence of the Mesial Temporal Lobe. Seizure Onset vs Seizure Network / K. H. Patel, S. Mitropanopoulos, G. Kalamangalam // *Neurology*. – 2024. – Vol. 102, No. 2. – P. e208012.
457. Pawlak, R. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior / R. Pawlak, A. M. Magarinos, J. Melchor [et al.] // *Nature Neuroscience*. – 2003. – Vol. 2. – P. 168-174.
458. Peacock, J. H. F. Morphology of dissociated hippocampal cultures from fetal mice / J. H. F. Peacock, D. F. F. Rush, L. H. Mathers // *Brain Research*. – 1979. – Vol. 169, No. 2. – P. 231-246.
459. Peña, F. Paired pulse facilitation is turned into paired pulse depression in hippocampal slices after epilepsy induced by 4-aminopyridine in vivo / F. Peña, J. Bargas, R. Tapia // *Neuropharmacology*. – 2002. – Vol. 42. – P. 807-812.
460. Peng, S. J. Evaluation of subcortical grey matter abnormalities in patients with MRI-negative cortical epilepsy determined through structural and tensor magnetic resonance

- imaging / S. J. Peng, T. Harnod, J. Z. Tsai [et al.] // BMC Neurology. – 2014. – Vol. 14. – P. 104.
461. Perota, A. N-Glycolylneuraminic Acid (Neu5Gc) Null Large Animals by Targeting the CMP-Neu5Gc Hydroxylase (CMAH) / A. Perota, C. Galli // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 2396.
462. Perrière, N. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters / N. Perrière, S. Yousif, S. Cazaubon [et al.] // Brain Research. – 2007. – Vol. 1150. – P. 1-13.
463. Pitkänen, A. Advances in the development of biomarkers for epilepsy / A. Pitkänen, W. Löscher, A. Vezzani [et al.] // The Lancet Neurology. – 2016. – Vol. 15, No. 8. – P. 843-856.
464. Polascheck, N. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy / N. Polascheck, M. Bankstahl, W. Löscher // Experimental Neurology. – 2010. – Vol. 224, No. 1. – P. 219-233.
465. Postnikova, T. Y. Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors / T. Y. Postnikova, O. E. Zubareva, A. A. Kovalenko [et al.] // Biochemistry (Moscow). – 2017. – Vol. 82, No. 3. – P. 282-290.
466. Postnikova, T. Y. Administration of bacterial lipopolysaccharide during early postnatal ontogenesis induces transient impairment of long-term synaptic plasticity associated with behavioral abnormalities in young rats / T. Y. Postnikova, A. V. Griflyuk, J. L. Ergina [et al.] // Pharmaceuticals (Basel). – 2020. – Vol. 13, No. 3. – P. 48.
467. Priel, M. R. Short-term effects of pilocarpine on rat hippocampal neurons in culture / M. R. Priel, E. X. Albuquerque // Epilepsia. – 2002. – Vol. 43, Suppl. 5. – P. 40-46.
468. Qiao, X. A neural cell adhesion molecule from oyster *Crassostrea gigas*: Molecular identification and immune functional characterization / X. Qiao, C. Liu, W. Wang [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – Vol. 247. – P. 125756.

469. Qu, Z. Wnt/ β -catenin signalling pathway mediated aberrant hippocampal neurogenesis in kainic acid-induced epilepsy / Z. Qu, F. Su, X. Qi [et al.] // Cell Biochemistry and Function. – 2017. – Vol. 35, No. 7. – P. 472-476.
470. Racine, R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor Seizure / R. Racine, V. Okujava, S. Chipashvili // Electroencephalography and Clinical Neurophysiology. – 1972. – Vol. 32. – P. 295-299.
471. Raman, I. M. Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice / I. M. Raman, L. K. Sprunger, M. H. Meisler, B. P. Bean // Neuron. – 1997. – Vol. 19. – P. 881-891.
472. Rasmussen, R. Interstitial ions: A key regulator of state-dependent neural activity? / R. Rasmussen, J. O'Donnell, F. Ding, M. Nedergaard // Progress in Neurobiology. – 2020. – P. 101802.
473. Rasmussen, T. Focal seizures due to chronic localized encephalitis / T. Rasmussen, J. Olszewski, D. Lloydsmith // Neurology. – 1958. – Vol. 8, No. 6. – P. 435-445.
474. Ravizza, T. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy / T. Ravizza, B. Gagliardi, F. Noé [et al.] // Neurobiology of Disease. – 2008. – Vol. 29, No. 1. – P. 142-160.
475. Reddy, D. S. Prospects of modeling poststroke epileptogenesis / D. S. Reddy, A. Bhimani, R. Kuruba [et al.] // Journal of Neuroscience Research. – 2017. – Vol. 95, No. 4. – P. 1000-1016.
476. Regan, C. M. Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging / C. M. Regan, G. B. Fox // Neurochemical Research. – 1995. – Vol. 20. – P. 593-598.
477. Reinert, M. High extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure / M. Reinert, A. Khaldi, A. Zauner [et al.] // Neurosurgical Focus. – 2000. – Vol. 8, No. 1. – P. 1-8.
478. Riazi, K. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: Cytokines and brain excitability / K. Riazi, M. A. Galic, Q. J. Pittman // Epilepsy Research. – 2010. – Vol. 89. – P. 34-42.

479. Rice, A. C. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy / A. C. Rice, R. J. DeLorenzo // *Brain Research*. – 1998. – Vol. 782, No. 1–2. – P. 240-247.
480. Richardson, C. A. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? / C. A. Richardson, P. A. Flecknell // *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*. – 2005. – Vol. 33, No. 2. – P. 119-127.
481. Rocca, B. Platelets, coagulation, and the vascular wall: the quest to better understand and smarten up our therapeutic targeting of this triad in primary and secondary prevention of cardiovascular events / B. Rocca, K. Peter // *Cardiovascular Research*. – 2021. – Vol. 117, No. 9. – P. 1998-2000.
482. Rohatgi, T. Protease-activated receptors in neuronal development, neurodegeneration, and neuroprotection: thrombin as signaling molecule in the brain / T. Rohatgi, F. Sedehizade, K. G. Reymann [et al.] // *The Neuroscientist*. – 2004. – Vol. 10, No. 6. – P. 501-512.
483. Ronen, G. M. Long-term prognosis in children with neonatal seizures: A population-based study / G. M. Ronen, D. Buckley, S. Penney, D. L. Streiner // *Neurology*. – 2007. – Vol. 69. – P. 1816-1822.
484. Rosenberg, G. A. Ischemic brain edema / G. A. Rosenberg // *Progress in Cardiovascular Diseases*. – 1999. – Vol. 42, No. 3. – P. 209-216.
485. Royeck, M. Role of axonal NaV1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons / M. Royeck, M.-T. Horstmann, S. Remy [et al.] // *Journal of Neurophysiology*. – 2008. – Vol. 100. – P. 2361-2380.
486. Ruan, Y. Remodeling of synapses in the CA1 area of the hippocampus after transient global ischemia / Y. Ruan, X. Han, Z. Shi [et al.] // *Neuroscience*. – 2012. – Vol. 218. – P. 268-277.
487. Russo, E. Upholding WAG/Rij rats as a model of absence epileptogenesis: Hidden mechanisms and a new theory on seizure development / E. Russo, R. Citraro, A. Constanti [et al.] // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2016. – Vol. 71. – P. 388-408.
488. Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system / U. Rutishauser // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2008. – No. 9. – P. 26-35.

489. Sachs, F. Stretch-activated ion channels and membrane mechanics / F. Sachs, M. Sokabe // Neuroscience Research Supplements. – 1990. – Vol. 12. – P. S1-S4.
490. Sackin, H. Mechanosensitive channels / H. Sackin // Annual Review of Physiology. – 1995. – Vol. 57. – P. 333-353.
491. Saini, V. The neuroplasticity marker PSA-NCAM: Insights into new therapeutic avenues for promoting neuroregeneration / V. Saini, T. Kaur, S. Kalotra [et al.] // Pharmacological Research. – 2020. – Vol. 160. – P. 105186.
492. Sakimura, K. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit / K. Sakimura, T. Kutsuwada, I. Ito [et al.] // Nature. – 1995. – Vol. 373. – P. 151-155.
493. Sakkaki, S. Blockade of T-type calcium channels prevents tonic-clonic seizures in a maximal electroshock seizure model / S. Sakkaki, G. Gangarossa, B. Lerat [et al.] // Neuropharmacology. – 2016. – Vol. 101. – P. 320-329.
494. Salar, S. Synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices following intraventricular application of albumin / S. Salar, E. Lapilover, J. Müller [et al.] // Neurobiology of Disease. – 2016. – Vol. 91. – P. 155.
495. Salvage, S. C. Cell-Adhesion Properties of β -Subunits in the Regulation of Cardiomyocyte Sodium Channels / S. C. Salvage, C. L. Huang, A. P. Jackson // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, No. 7. – P. 989.
496. Salviati, L. Cytochrome c oxidase deficiency due to a novel SCO2 mutation mimics Werdnig-Hoffmann disease / L. Salviati, S. Sacconi, M. M. Rasalan [et al.] // Archives of Neurology. – 2002. – Vol. 59, No. 5. – P. 862-865.
497. Samavat, M. Long-Term Potentiation Produces a Sustained Expansion of Synaptic Information Storage Capacity in Adult Rat Hippocampus / M. Samavat, T. M. Bartol, C. Bromer [et al.] // bioRxiv [Preprint]. – 2024.
498. Samland, H. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6 / H. Samland, S. Huitron-Resendiz, E. Masliah [et al.] // Journal of Neuroscience Research. – 2003. – Vol. 73. – P. 176-187.

499. Samson, A. L. Tissue-Type Plasminogen Activator: A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity / A. L. Samson, R. L. Medcalf // *Neuron*. – 2006. – Vol. 50. – P. 673-678.
500. Sato, Y. Location of sialoglycoconjugates containing the Sia(alpha)2-3Gal and Sia(alpha)2-6Gal groups in the rat hippocampus and the effect of aging on their expression / Y. Sato, Y. Akimoto, H. Kawakami [et al.] // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. – 2001. – Vol. 49. – P. 1311-1319.
501. Savotchenko, A. Neuraminidase inhibition primes short-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in the rat hippocampus / A. Savotchenko, A. Romanov, D. Isaev [et al.] // *Neural Plasticity*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-10.
502. Savotchenko, A. The role of thrombin in early-onset seizures / A. Savotchenko, M. Klymenko, M. Shypshyna, D. Isaev // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2023. – Vol. 17. – P. 1101006.
503. Savrasova, A. The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus / A. Savrasova, I. Lushnikova, E. Isaeva [et al.] // *Fiziologichnyi Zhurnal*. – 2010. – Vol. 56(4). – P. 14-18.
504. Schauer, R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man / R. Schauer // *Zoology*. – 2004. – Vol. 107. – P. 49-64.
505. Schinkel, A. H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier / A. H. Schinkel // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1999. – Vol. 36, No. 2–3. – P. 179-194.
506. Schmidt-Kastner, R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia / R. Schmidt-Kastner // *Neuroscience*. – 2015. – Vol. 309. – P. 259-279.
507. Schnaar, R. L. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration / R. L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt // *Physiological Reviews*. – 2014. – Vol. 94, No. 2. – P. 461-518.
508. Schubert, M. Kindling-induced changes in plasticity of the rat amygdala and hippocampus / M. Schubert, H. Siegmund, H.-C. Pape, D. Albrecht // *Learning and Memory*. – 2005. – Vol. 12. – P. 520-526.

509. Schulz, E. C. Structural basis for the recognition and cleavage of polysialic acid by the bacteriophage K1F tailspike protein EndoNF / E. C. Schulz, D. Schwarzer, M. Frank [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 397, No. 1. – P. 341-351.
510. Schwartzkroin, P. A. Osmolarity, ionic flux, and changes in brain excitability / P. A. Schwartzkroin, S. C. Baraban, D. W. Hochman // *Epilepsy Research*. – 1998. – Vol. 32. – P. 275-285.
511. Seiffert, E. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex / E. Seiffert // *Journal of Neuroscience*. – 2004. – Vol. 24, No. 36. – P. 7829-7836
512. Seki, T. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons / T. Seki // *Journal of Neuroscience Research*. – 2002. – Vol. 69, No. 6. – P. 772-783.
513. Semenikhina, M. Inhibition of protease-activated receptor 1 ameliorates behavioral deficits and restores hippocampal synaptic plasticity in a rat model of status epilepticus / M. Semenikhina, R. Bogovyk, M. Fedoriuk [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2019. – Vol. 692. – P. 64.
514. Senkov, O. Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm / O. Senkov, M. Sun, B. Weinhold [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26, No. 42. – P. 10888-10898.
515. Seyrantepe, V. Neu4 – a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells / V. Seyrantepe, K. Landry, S. Trudel [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – P. 37021-37029.
516. Shandra, O. Repetitive Diffuse Mild Traumatic Brain Injury Causes an Atypical Astrocyte Response and Spontaneous Recurrent Seizures / O. Shandra, A. R. Winemiller, B. P. Heithoff [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2019. – Vol. 39, No. 10. – P. 1944-1963.
517. Sharma, A. K. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions / A. K. Sharma, R. Y. Reams, W. H. Jordan [et al.] // *Toxicologic Pathology*. – 2007. – Vol. 35. – P. 984-999.

518. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D.P. Jones // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2020. – Vol. 21, No. 7. – P. 363-383.
519. Siegrist, R. Discovery and In-Vivo Characterization of Kv7 Channel Openers through a Phenotypic Approach / R. Siegrist, O. Bezençon, C. Deymier [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2025. – Vol. 68, No. 16. – P. 17412-17426.
520. Siller-Matula, J. M. Thrombin as a multi-functional enzyme. Focus on in vitro and in vivo effects / J. M. Siller-Matula, M. Schwameis, A. Blann [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 106, No. 6. – P. 1020-1033.
521. Singh, T. Thrombin mediates seizures following cortical injury-induced status epilepticus / T. Singh, A. Mehra, T. Batabyal [et al.] // *Epilepsy Research*. – 2025. – Vol. 2013. – P. 107549.
522. Sitnikova, E. Cortical and thalamic coherence during spike-wave seizures in WAG/Rij rats / E. Sitnikova, G. van Luijtelaar // *Epilepsy Research*. – 2006. – Vol. 71, No. 2–3. – P. 159-180.
523. Sloviter, R. S. "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies / R. S. Sloviter // *Brain Research Bulletin*. – 1983. – Vol. 10, No. 5. – P. 675-697.
524. Sloviter, R. S. Temporal Lobe Epileptogenesis: A Focus on Etiology, Neuron Loss, the Latent Period, and Dentate Granule Cell Disinhibition / R. S. Sloviter // *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* / eds. J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski [et al.]. – 5th ed. – New York: Oxford University Press, 2024. – Chapter 24.
525. Smolders, I. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis / I. Smolders, G. M. Khan, J. Manil [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 1997. – Vol. 121, No. 6. – P. 1171-1179.
526. Somjen, G. G. Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices / G. G. Somjen, M. Müller // *Brain Research*. – 2000. – Vol. 885. – P. 102-110.

527. Sorra, K. E. Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1 / K. E. Sorra, K. M. Harris // *Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18, No. 2. – P. 658-671.
528. Spiel, A. O. Increased platelet aggregation and in vivo platelet activation after granulocyte colony-stimulating factor administration. A randomised controlled trial / A. O. Spiel, J. Bartko, M. Schwameis [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2011. – Vol. 105, No. 4. – P. 655-662.
529. Staak, R. Contribution of GABA(A) and GABA(B) receptors to thalamic neuronal activity during spontaneous absence seizures in rats / R. Staak, H. C. Pape // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 21, No. 4. – P. 1378-1384.
530. Stafstrom, C. E. Persistent sodium current and its role in epilepsy / C. E. Stafstrom // *Epilepsy Currents*. – 2007. – Vol. 7. – P. 15-22.
531. Stafstrom, C. E. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists / C. E. Stafstrom, L. Carmant // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2015.
532. Stein, E. S. Thrombin induces ischemic LTP (iLTP): implications for synaptic plasticity in the acute phase of ischemic stroke / E. S. Stein, Z. Itsekson-Hayosh, A. Aronovich [et al.] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 7912.
533. Steinberg, S. F. The cardiovascular actions of protease-activated receptors / S. F. Steinberg // *Molecular Pharmacology*. – 2005. – Vol. 67, No. 1. – P. 2-11.
534. Stoenica, L. In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid / L. Stoenica, O. Senkov, R. Gerardy-Schahn [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 23, No. 9. – P. 2255-2264.
535. Stone, N. L. A Novel Transwell Blood Brain Barrier Model Using Primary Human Cells / N. L. Stone, T. J. England, S. E. O'Sullivan // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2019. – Vol. 13. – P. 230.
536. Stoyanova, I. I. Functional Diversity of Neuronal Cell Adhesion and Recognition Molecule L1CAM through Proteolytic Cleavage / I. I. Stoyanova, D. Lutz // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, No. 19. – P. 3085.

537. Strande, J. L. SCH 79797, a selective PAR1 antagonist, limits myocardial ischemia/reperfusion injury in rat hearts / J. L. Strande, A. Hsu, J. Su [et al.] // *Basic Research in Cardiology*. – 2007. – Vol. 102, No. 4. – P. 350-358.
538. Strazielle, N. Physiology of Blood-Brain Interfaces in Relation to Brain Disposition of Small Compounds and Macromolecules / N. Strazielle, J. F. Ghersi-Egea // *Molecular Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 10. – P. 1473-1491.
539. Striggow, F. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia / F. Striggow, M. Riek-Burchardt, A. Kiesel [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 14, No. 4. – P. 595-608.
540. Strohschein, S. Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus / S. Strohschein, K. Hüttmann, S. Gabriel [et al.] // *Glia*. – 2011. – Vol. 59, No. 6. – P. 973-980.
541. Stühmer, W. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel / W. Stühmer, F. Conti, H. Suzuki [et al.] // *Nature*. – 1989. – Vol. 339, No. 6226. – P. 597-603.
542. Su, H. Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons / H. Su, G. Alroy, E. D. Kirson [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 21. – P. 4173-4182.
543. Sutula, T. Facilitation of kindling by prior induction of long-term potentiation in the perforant path / T. Sutula, O. Steward // *Brain Research*. – 1987. – Vol. 420, No. 1. – P. 109-117.
544. Suzuki, M. Thrombin activity in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage / M. Suzuki, A. Ogawa, Y. Sakurai [et al.] // *Stroke*. – 1992. – Vol. 23. – P. 1181-1182.
545. Sweeney, M. D. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders / M. D. Sweeney, A. P. Sagare, B. V. Zlokovic // *Nature Reviews Neurology*. – 2018. – Vol. 14, No. 3. – P. 133-150.
546. Sweeney, M. D. Blood-brain barrier: from physiology to disease and back / M. D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne [et al.] // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99, No. 1. – P. 21-78.

547. Swissa, E. Blood-brain barrier dysfunction in status epilepticus: Mechanisms and role in epileptogenesis / E. Swissa, Y. Serlin, U. Vazana [et al.] // *Epilepsy and Behavior*. – 2019. – Vol. 101, Pt B. – P. 106285.
548. Swissa, E. Cortical plasticity is associated with blood-brain barrier modulation / E. Swissa, U. Monsonego, L. T. Yang [et al.] // *eLife*. – 2024. – Vol. 12. – P. RP89611.
549. Suleymanova, E. The Role of Blood-Brain Barrier Disruption in Epilepsy: Mechanisms and Consequences / E. Suleymanova, A. Karan // *Neurology International*. – 2025. – Vol. 18, No. 1. – P. 1.
550. Szu, J. I. Mechanisms Underlying Aquaporin-4 Subcellular Mislocalization in Epilepsy / J. I. Szu, D. K. Binder // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 900588.
551. Szyndler, J. Effects of pentylenetetrazol-induced kindling of seizures on rat emotional behavior and brain monoaminergic systems / J. Szyndler, P. Rok, P. Maciejak [et al.] // *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. – 2002. – Vol. 73. – P. 851-861.
552. Tan, T. H. Inflammation, ictogenesis, and epileptogenesis: An exploration through human disease / T. H. Tan, P. Perucca, T. J. O'Brien [et al.] // *Epilepsia*. – 2021. – Vol. 62, No. 2. – P. 303-324.
553. Tanaka, K. Hippocampal damage after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus and seizure preconditioning-mediated neuroprotection in SJL mice / K. Tanaka, E. M. Jimenez-Mateos, S. Matsushima [et al.] // *Epilepsy Research*. – 2010. – Vol. 88, No. 2–3. – P. 151-161.
554. Temkin, N. R. Valproate therapy for prevention of posttraumatic seizures: a randomized trial / N. R. Temkin, S. S. Dikmen, G. D. Anderson [et al.] // *Journal of Neurosurgery*. – 1999. – Vol. 91. – P. 593-600.
555. Temkin, N. R. Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: Meta-analysis of controlled trials / N. R. Temkin // *Epilepsia*. – 2001. – Vol. 42. – P. 515-524.
556. Teppa, R. E. Molecular dynamics simulations shed light into the donor substrate specificity of vertebrate poly-alpha-2,8-sialyltransferases ST8Sia IV / R. E. Teppa, S. P.

- Galuska, A. Harduin-Lepers // *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects.* – 2024. – Vol. 1868, No. 8. – P. 130647.
557. Theis, T. Depletion of Cell Adhesion Molecule L1 from Microglia and Macrophages Reduces Recovery After Spinal Cord Injury / T. Theis, S. Kumar, P. Shah [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2025. – Vol. 26, No. 7. – P. 3285.
558. Theodosis, D. T. Differential expression of two adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, F3 and polysialylated NCAM, in hypothalamic magnocellular neurones capable of plasticity / D. T. Theodosis, K. Pierre, D. A. Poulain // *Experimental Physiology.* – 2000. – Vol. 85, Spec. No. – P. 187S-196S.
559. Thompson, M. G. The polysialyltransferases interact with sequences in two domains of the neural cell adhesion molecule to allow its polysialylation / M. G. Thompson, D. A. Foley, K. J. Colley // *Journal of Biological Chemistry.* – 2013. – Vol. 288, No. 10. – P. 7282-7293.
560. Tomkins, O. Blood-brain barrier disruption results in delayed functional and structural alterations in the rat neocortex / O. Tomkins, O. Friedman, S. Ivens [et al.] // *Neurobiology of Disease.* – 2007. – Vol. 25. – P. 367-377.
561. Tomkins, O. Blood-brain barrier breakdown following traumatic brain injury: a possible role in posttraumatic epilepsy / O. Tomkins, A. Feintuch, M. Benifla [et al.] // *Cardiovascular Psychiatry and Neurology.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 765923.
562. Tomkins, O. Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy / O. Tomkins, I. Shelef, I. Kaizerman [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* – 2008. – Vol. 79, No. 7. – P. 774-777.
563. Traub, R. D. Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy / R. D. Traub, R. K. Wong // *Science.* – 1982. – Vol. 216, No. 4547. – P. 745-747.
564. Traynelis, S. F. Role of extracellular space in hyperosmotic suppression of potassium-induced electrographic seizures / S. F. Traynelis, R. Dingledine // *Journal of Neurophysiology.* – 1989. – Vol. 61. – P. 927-938.
565. Traynelis, S. F. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms / S. F. Traynelis, J. Trejo // *Current Opinion in Hematology.* – 2007. – Vol. 14, No. 3. – P. 268-235.

566. Trimble, M. Treatment issues for personality disorders in epilepsy / M. Trimble // *Epilepsia*. – 2013. – Vol. 54. – P. 41-45.
567. Troisi, R. New insight into the traditional model of the coagulation cascade and its regulation: illustrated review of a three-dimensional view / R. Troisi, N. Balasco, I. Autiero [et al.] // *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. – 2023. – Vol. 7, No. 6. – P. 102160.
568. Tsodyks, M. V. The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability / M. V. Tsodyks, H. Markram // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94, No. 2. – P. 719-723.
569. Tuchman, R. Epilepsy in autism / R. Tuchman, I. Rapin // *Lancet Neurology*. – 2002. – Vol. 1. – P. 352-358.
570. Tumani, H. The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations / H. Tumani, A. Huss, F. Bachhuber // *Cerebrospinal Fluid in Neurologic Disorders*. – 2018. – Vol. 146. – P. 21-32.
571. Turgeon, V. L. Activation of the protease-activated thrombin receptor (PAR)-1 induces motoneuron degeneration in the developing avian embryo / V. L. Turgeon, C. E. Milligan, L. J. Houenou // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. – 1999. – Vol. 58. – P. 499-504.
572. Turrigiano, G. G. The dialectic of Hebb and homeostasis / G. G. Turrigiano // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. – 2017. – Vol. 372. – P. 20160258.
573. Turski, W. A. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study / W. A. Turski, E. C. Cavalheiro, M. Schwarz // *Behavioural Brain Research*. – 1983. – Vol. 9. – P. 315-335.
574. Tyrrell, L. Glycosylation alters steady-state inactivation of sodium channel Nav1.9/NaN in dorsal root ganglion neurons and is developmentally regulated / L. Tyrrell, M. Renganathan, S. D. Dib-Hajj [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – Vol. 21. – P. 9629-9637.

575. Tzoulis, C. The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases / C. Tzoulis, B. A. Engelsens, W. Telstad [et al.] // *Brain*. – 2006. – Vol. 129, Pt 7. – P. 1685-1692.
576. Ubl, J. J. Desensitisation of protease-activated receptor-1 (PAR-1) in rat astrocytes: evidence for a novel mechanism for terminating Ca²⁺ signalling evoked by the tethered ligand / J. J. Ubl, M. Sergeeva, G. Reiser // *Journal of Physiology*. – 2000. – Vol. 525, No. 2. – P. 319-330.
577. Urizar, E. Genetic Insights and Diagnostic Challenges in Highly Attenuated Lysosomal Storage Disorders / E. Urizar, E. P. McCarron, C. Gadepalli [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2025. – Vol. 16, No. 8. – P. 915.
578. Usami, A. Oseltamivir enhances hippocampal network synchronization / A. Usami, T. Sasaki, N. Satoh [et al.] // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2008. – Vol. 106. – P. 659-662.
579. Uva, L. Acute induction of epileptiform discharges by pilocarpine in the in vitro isolated guinea-pig brain requires enhancement of blood-brain barrier permeability / L. Uva, L. Librizzi, N. Marchi [et al.] // *Neuroscience*. – 2008. – Vol. 151, No. 1. – P. 303-312.
580. Vaithianathan, T. Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents / T. Vaithianathan, K. Matthias, B. Bahr [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – P. 47975-47984.
581. Valls, P. O. Signalling dynamics, cell decisions, and homeostatic control in health and disease / P. O. Valls, A. Esposito // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2022. – Vol. 75. – P. 102066.
582. Vance, K. M. PAR1-activated astrocytes in the nucleus of the solitary tract stimulate adjacent neurons via NMDA receptors / K. M. Vance, R. C. Rogers, G. E. Hermann // *Journal of Neuroscience*. – 2015. – Vol. 35. – P. 776-785.
583. van Vliet, E. A. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy / E. A. van Vliet, S. da Costa Araújo, S. Redeker [et al.] // *Brain*. – 2007. – Vol. 130, No. 2. – P. 521.

584. Van Vliet, E. A. Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation / E. A. Van Vliet, G. Forte, L. Holtman [et al.] // *Epilepsia*. – 2012. – Vol. 53, No. 7. – P. 1254-1263.
585. van Vliet, E. A. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy / E. A. van Vliet, E. Aronica, J. A. Gorter // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2015. – Vol. 38. – P. 26-34.
586. van Vliet, E. A. Blood-brain barrier leakage after status epilepticus in rapamycin-treated rats I: Magnetic resonance imaging / E. A. van Vliet, W. M. Otte, W. J. Wadman [et al.] // *Epilepsia*. – 2016. – Vol. 57, No. 1. – P. 59-69.
587. Van Wart, A. Impaired firing and cell-specific compensation in neurons lacking Nav1.6 sodium channels / A. Van Wart, G. Matthews // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – P. 7172–7180.
588. Varbanov, H. Regulation of extrasynaptic signaling by polysialylated NCAM: Impact for synaptic plasticity and cognitive functions / H. Varbanov, A. Dityatev // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2017. – Vol. 81. – P. 12-21.
589. Varho, T. Central and peripheral nervous system dysfunction in the clinical variation of Salla disease / T. Varho, S. Jääskeläinen, U. Tolonen [et al.] // *Neurology*. – 2000. – Vol. 55, No. 1. – P. 99-104.
590. Varho, T. T. Phenotypic spectrum of Salla disease, a free sialic acid storage disorder / T. Varho, L. E. Alajoki, K. M. Posti [et al.] // *Pediatric Neurology*. – 2002. – Vol. 26, No. 4. – P. 267-273.
591. Varki, A. Origins and Evolution of Essentials of Glycobiology / A. Varki // *Glycobiology*. – 2025. – Vol. 35, No. 11. – P. cwaf062.
592. Veeramah, K. R. De novo pathogenic SCN8A mutation identified by whole-genome sequencing of a family quartet affected by infantile epileptic encephalopathy and SUDEP / K. R. Veeramah, J. E. O'Brien, M. H. Meisler [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 2012. – Vol. 90. – P. 502-510.
593. Veilleux-Lemieux, D. Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats / D. Veilleux-Lemieux, A. Castel, D. Carrier [et al.] // *Journal of the*

- American Association for Laboratory Animal Science. – 2013. – Vol. 52, No. 5. – P. 567-570.
594. Venero, C. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory / C. Venero, A. Herrero, K. Touyarot [et al.] // *European Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 23. – P. 1585-1595.
595. Vezzani, A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy / A. Vezzani, A. Friedman // *Biomarkers in Medicine*. – 2011. – Vol. 5, No. 5. – P. 607-614.
596. Vezzani, A. The role of inflammation in epileptogenesis / A. Vezzani, A. Friedman, R. J. Dingledine // *Neuropharmacology*. – 2013. – Vol. 69. – P. 16-24.
597. Villamizar-Torres, D. Mesial temporal sclerosis and epilepsy: a narrative review / D. Villamizar-Torres, A. C. Cepeda Trillos, A. Vargas-Moreno // *Acta Epileptologica*. – 2024. – Vol. 6, No. 1. – P. 28.
598. Vilorio Alebesque, A. Usefulness of electroencephalography for the management of epilepsy in emergency departments / A. Vilorio Alebesque, A. López Bravo, E. Bellosta Diago [et al.] // *Neurologia*. – 2020. – Vol. 35. – P. 238-244.
599. Vincent, A. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults / A. Vincent, C. G. Bien // *The Lancet Neurology*. – 2008. – Vol. 7. – P. 1074-1075.
600. Vining, E. P. A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet / E. P. Vining, J. M. Freeman, K. Ballaban-Gil [et al.] // *Archives of Neurology*. – 1998. – Vol. 55. – P. 1433-1437.
601. von Der Ohe, M. Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM / M. von Der Ohe, S. F. Wheeler, M. Wuhler [et al.] // *Glycobiology*. – 2002. – Vol. 12. – P. 47-63.
602. Voytenko, L. P. Hippocampal GABAergic interneurons coexpressing alpha7-nicotinic receptors and connexin-36 are able to improve neuronal viability under oxygen-glucose deprivation / L. P. Voytenko, I. V. Lushnikova, A. V. Savotchenko [et al.] // *Brain Research*. – 2015. – Vol. 1616. – P. 134.

603. Vu, T.-K. H. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation / T.-K. H. Vu, D. T. Hung, V. I. Wheaton, S. R. Coughlin // *Cell*. – 1991. – Vol. 64, No. 6. – P. 1057-1068.
604. Wada, A. Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases / A. Wada, H. Yokoo, T. Yanagita, H. Kobayashi // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2005. – Vol. 99, No. 4. – P. 307-321.
605. Waldbaum, S. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? / S. Waldbaum, M. Patel // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2010. – Vol. 42, No. 6. – P. 449-455.
606. Wang, J. Role of protease-activated receptor-1 in brain injury after experimental global cerebral ischemia / J. Wang, H. Jin, Y. Hua [et al.] // *Stroke*. – 2012. – Vol. 43, No. 9. – P. 2476-2482.
607. Wang, J. D. Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier / J. D. Wang, E. S. Khafagy, K. Khanafer [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 13. – P. 895-906.
608. Wang, H. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways / H. Wang, J. J. Ubl, R. Stricker, G. Reiser // *American Journal of Physiology – Cell Physiology*. – 2002. – Vol. 283. – P. 1351-1364.
609. Wang, H. Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling / H. Wang, J. J. Ubl, G. Reiser // *Glia*. – 2002. – Vol. 37. – P. 53-63.
610. Wang, X. Potential applications of microfluidics-based blood brain barrier (BBB)-on-chips for in vitro drug development / X. Wang, Y. Hou, X. Ai [et al.] // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 132. – P. 110822.
611. Wang, X. A novel strategy for quantification of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids in sialylated glycoproteins / X. Wang, L. Yue, F. Zhang [et al.] // *Carbohydrate Research*. – 2023. – Vol. 531. – P. 108892.
612. Wang, Y. A close association of the ganglioside-specific sialidase Neu3 with caveoline in membrane microdomains / Y. Wang, K. Yamaguchi, T. Wada [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – P. 26252-26259.

613. Weston, N. M. Dendritic morphological development of traumatic brain injury-induced new neurons in the dentate gyrus is important for post-injury cognitive recovery and is regulated by Notch1 / N. M. Weston, J. C. Green, T. N. Keoprasert, D. Sun // *Experimental Neurology*. – 2024. – Vol. 382. – P. 114963.
614. Wiertz, R. W. Neural cell-cell and cell-substrate adhesion through N-cadherin, N-CAM and L1 / R. W. Wiertz, E. Marani, W. L. Rutten // *Journal of Neural Engineering*. – 2011. – Vol. 8, No. 4. – P. 046004.
615. Wieser, H.-G. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis / H.-G. Wieser // *Epilepsia*. – 2004. – Vol. 45, No. 6. – P. 695-714.
616. Winkler, E. A. Central nervous system pericytes in health and disease / E. A. Winkler, R. D. Bell, B. V. Zlokovic // *Nature Neuroscience*. – 2011. – Vol. 14, No. 11. – P. 1398-1405.
617. Wong, A. D. The blood-brain barrier: an engineering perspective / A. D. Wong, M. Ye, A. F. Levy [et al.] // *Frontiers in Neuroengineering*. – 2013. – Vol. 6. – P. 7.
618. World Health Organization. Epilepsy: a public health imperative / World Health Organization. – Geneva: WHO, 2022.
619. Wu, H. Y. Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation / H. Y. Wu, E. Hudry, T. Hashimoto [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30, No. 7. – P. 2636-2649.
620. Wuhrer, M. Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM / M. Wuhrer, H. Geyer, O. M. von Der Ohe [et al.] // *Biochimie*. – 2003. – Vol. 85. – P. 207-218.
621. Wunder, A. Imaging blood-brain barrier dysfunction in animal disease models / A. Wunder, K. Schoknecht, D. B. Stanimirovic [et al.] // *Epilepsia*. – 2012. – Vol. 53. – P. 14-21.
622. Xi, G. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? / G. Xi, G. Reiser, R. F. Keep // *Journal of Neurochemistry*. – 2003. – Vol. 84, No. 1. – P. 3-9.

623. Xie, L. Dynamic alteration of dendrites and dendritic spines in the hippocampus and microglia in mouse brain tissues after kainate-induced status epilepticus / L. Xie, T. Li, X. Song [et al.] // *International Journal of Neuroscience*. – 2021. – Vol. 131, No. 11. – P. 1045-1057.
624. Xin, H. Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma / H. Xin, X. Jiang, J. Gu [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 4293-4305.
625. Xu, J. Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons / J. Xu, N. Kang, L. Jiang [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 25. – P. 1750-1760.
626. Xu, T. Neuraminidase 1 secondary deficiency contributes to CNS pathology in neurological mucopolysaccharidoses via brain protein hypersialylation / T. Xu, R. Heon-Roberts, T. Moore [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2025. – Vol. 135, No. 16. – P. e177430.
627. Yabe, U. Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein / U. Yabe, C. Sato, T. Matsuda [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – P. 13875-13880.
628. Yamaguchi, K. Evidence for mitochondrial localization of a novel human sialidase (NEU4) / K. Yamaguchi, K. Hata, K. Koseki [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2005. – Vol. 390. – P. 85-93.
629. Yamanaka, G. Links between Immune Cells from the Periphery and the Brain in the Pathogenesis of Epilepsy: A Narrative Review / G. Yamanaka, S. Morichi, T. Takamatsu [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22., No. – P. 94395.
630. Yamashita, A. Pathology and Mechanisms Underlying Thrombus Formation in Stroke / A. Yamashita, Y. Asada // *Brain Nerve*. – 2021. – Vol. 73, No. 9. – P. 965-974.
631. Yang, J. Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic GLUN2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats / J. Yang, G. L. Woodhall, R. S. G. Jones // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26, No. 2. – P. 406-410.

632. Yang, Q. Protocol for culturing low density pure rat hippocampal neurons supported by mature mixed neuron cultures / Q. Yang, Y. Ke, J. Luo, Y. Tang // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2017. – Vol. 277. – P. 38-45.
633. Yang, T. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: Uncontrolled inflammation drives disease progression? / T. Yang, D. Zhou, H. Stefan // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2010. – Vol. 296. – P. 1-6.
634. Yang, T. Thrombin acts as inducer of proinflammatory macrophage migration inhibitory factor in astrocytes following rat spinal cord injury / T. Yang, H. Jiang, X. Luo [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2022. – Vol. 19, No. 1. – P. 120.
635. Yassa, M. A. Pattern separation in the hippocampus / M. A. Yassa, C. E. Stark // *Trends in Neurosciences*. – 2011. – Vol. 34, No. 10. – P. 515-525.
636. Yazdi, S. M. The path to post-traumatic epilepsy: A review of emerging biomarkers and therapeutic targets / S. M. Yazdi, A. J. Gomez, A. Goldman, S. Tsetsou // *Seizure*. – 2025. – Vol. 133. – P. 195-201.
637. Yong, S. The hippocampal vulnerability to herpes simplex virus type I infection: relevance to Alzheimer's disease and memory impairment / S. Yong, M. Yong, S. Teoh [et al.] // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2021. – Vol. 15. – P. 695738.
638. Yoon, H. Regulation of CNS Lipids by Protease Activated Receptor 1 / H. Yoon, E. M. Triplet, L. Wurtz [et al.] // *Journal of Neurochemistry*. – 2025. – Vol. 169, No. 3. – P. e70047.
639. Yu, T. Risk factors for Drug-resistant Epilepsy (DRE) and a nomogram model to predict DRE development in post-traumatic epilepsy patients / T. Yu, X. Liu, L. Sun [et al.] // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. – 2022. – Vol. 28, No. 10. – P. 1557-1567.
640. Yuan, J. Altered expression of the small guanosine triphosphatase RhoA in human temporal lobe epilepsy / J. Yuan, L. Wang, J. Li [et al.] // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2010. – Vol. 42, No. 1. – P. 53-58.
641. Yurchenco, P. D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms / P. D. Yurchenco // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2011. – Vol. 3, No. 2. – P. a004911.

642. Zahra, A. Convulsive behaviors of spontaneous recurrent seizures in a mouse model of extended hippocampal kindling / A. Zahra, Y. Sun, N. Aloysius, L. Zhang // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2022. – Vol. 16. – P. 1076718.
643. Zauner, A. Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury / A. Zauner, R. Bullock, A. J. Kuta [et al.] // *Acta Neurochirurgica. Supplement*. – 1996. – Vol. 67. – P. 40-44.
644. Zhang, Y. Glycosylation influences voltage-dependent gating of cardiac and skeletal muscle sodium channels / Y. Zhang, H. A. Hartmann, J. Satin // *Journal of Membrane Biology*. – 1999. – No. 171. – P. 195-207.
645. Zheng, Z. H. Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala / Z. H. Zheng, J. L. Tu, X. H. Li [et al.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2021. – Vol. 91. – P. 505-518.
646. Zito, K. Activity-Dependent Synaptogenesis in the Adult Mammalian Cortex / K. Zito, K. Svoboda // *Neuron*. – 2002. – No. 35. – P. 1015-1017.
647. Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders / B. V. Zlokovic // *Neuron*. – 2008. – Vol. 57, No. 2. – P. 178-201.
648. Zuber, C. P. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain / C. P. Zuber, M. Lackie, W. A. Catterall [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – No. 267. – P. 9965-9971.
649. Zucker, R. S. Short-term synaptic plasticity / R. S. Zucker // *Annual Review of Neuroscience*. – 1989. – Vol. 12. – P. 13-31.
650. Zucker, R. S. Short-term synaptic plasticity / R. S. Zucker, W. G. Regehr // *Annual Review of Physiology*. – 2002. – Vol. 64. – P. 355-405.