ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

ЗМІНИ ЛОКАЛЬНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ ЗБУДЛИВИХ ТКАНИН ТА ПОВЕДІНКОВИХ РЕАКЦІЙ У НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

на здобуття
щорічної Премії Президента України
для молодих вчених

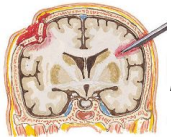
ФЕДОРЮК Михайло Петрович, к.б.н., м.н.с. Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця.
БОГОВИК Руслан Ігорович, к.б.н., м.н.с. Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця.
СТЕФАНЕНКО Марія Володимирівна, аспірант Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця.

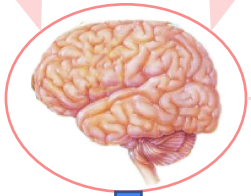
Київ – 2021

ПРИЧИНИ ТА ПРОЯВИ ЕПІЛЕПСІЇ

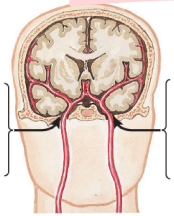
Судинні (інфаркт або крововилив)

Травма (перелом черепа, проникаюча рана)





Метаболічні порушення



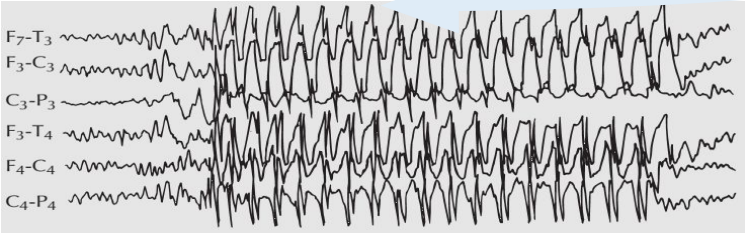
Біохімічні порушення

Системні причини

Невідомі причини (генетична або біохімічна схильність)

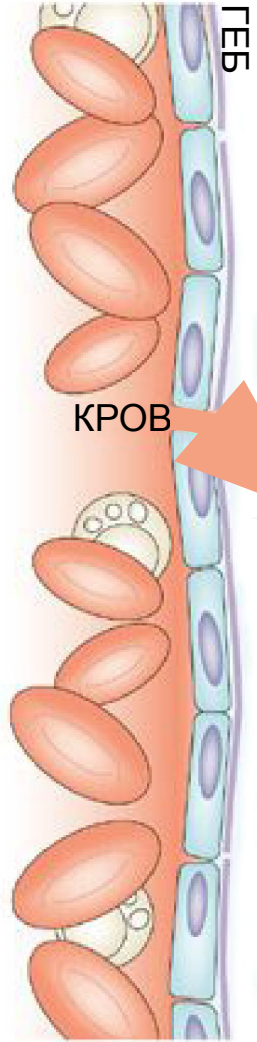
Порушення ГЕБ

Напади та Епілепсія

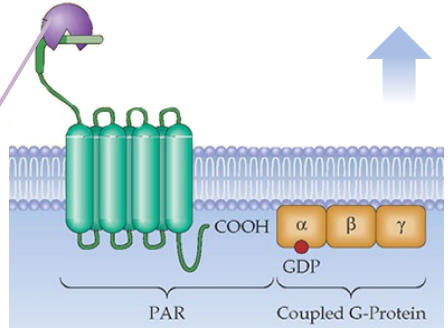


Тоніко - клонічний напад

РОЛЬ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНОГО БАР'ЄРУ У РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПСІЇ



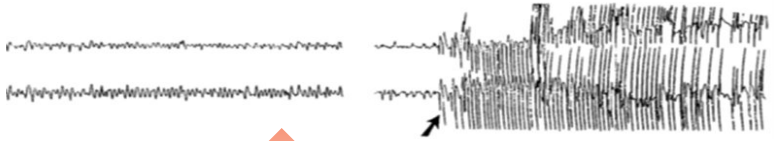
…
Альбумін
Залізо
ТРОМБІН
Глобулін
Фібріноген
…



Низька концентрація тромбіну
Нормальне функціонування ПАР

підвищення пластичності нейронів
зниження збудливості нейронів
нейропротектонний ефект

Інтроцеребральні ін'єкції тромбіну спроможні викликати локальну епілептоформну активність, через активацію ПАР1 рецепторів



Тромбін

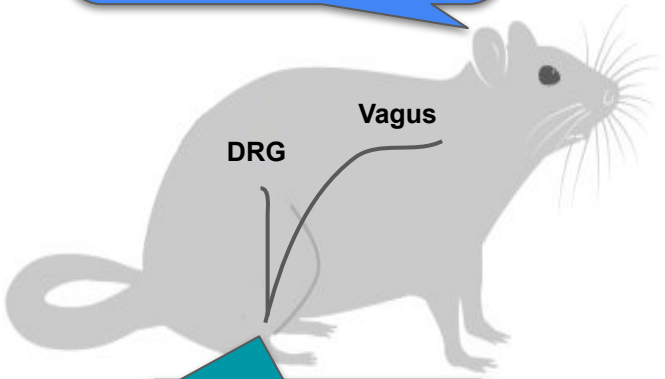
Lee et al., 1997

Висока концентрація тромбіну
Гіперактивація функціонування ПАР

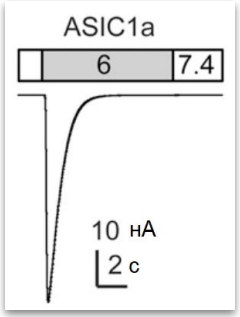
епілептогенез
пошкодження нейронів
нейродегенерація

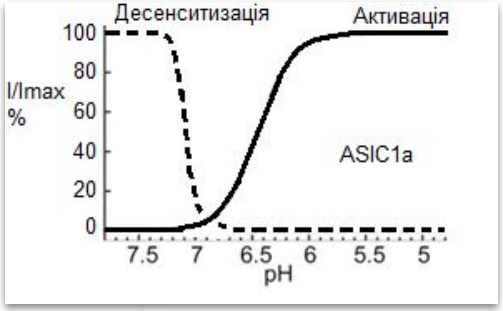
ASICs: РОЗПОДІЛ В ТКАНИНАХ, ФУНКЦІЇ, РОЛЬ У ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСАХ

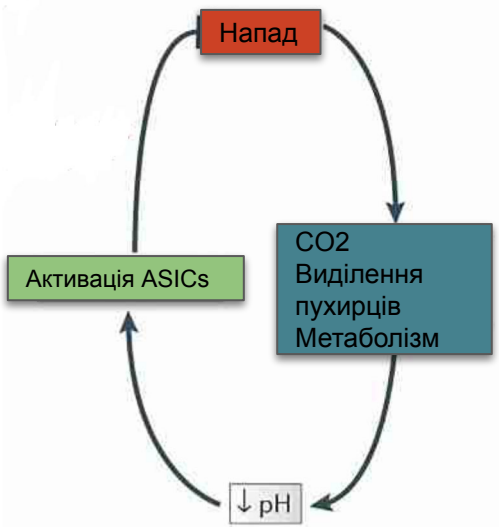
ЦНС (гіпокамп, мозочок, мигдалевидне тіло)
ASIC1a
ASIC2a
ASIC2b

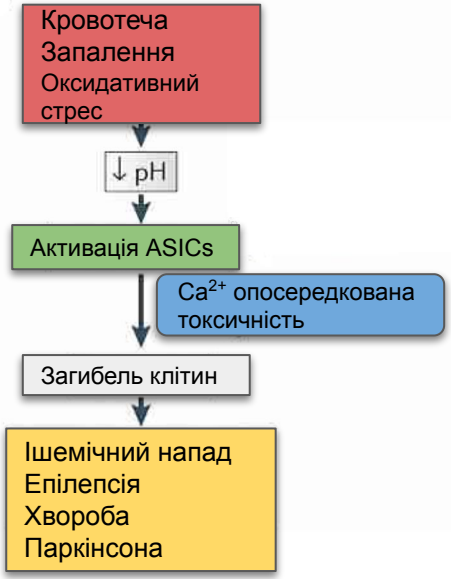


ПНС (нейрони задніх корінців спинного мозку, трійчастий і блукаючий нерв)
ASIC1a, 1b
ASIC2a, 2b
ASIC3





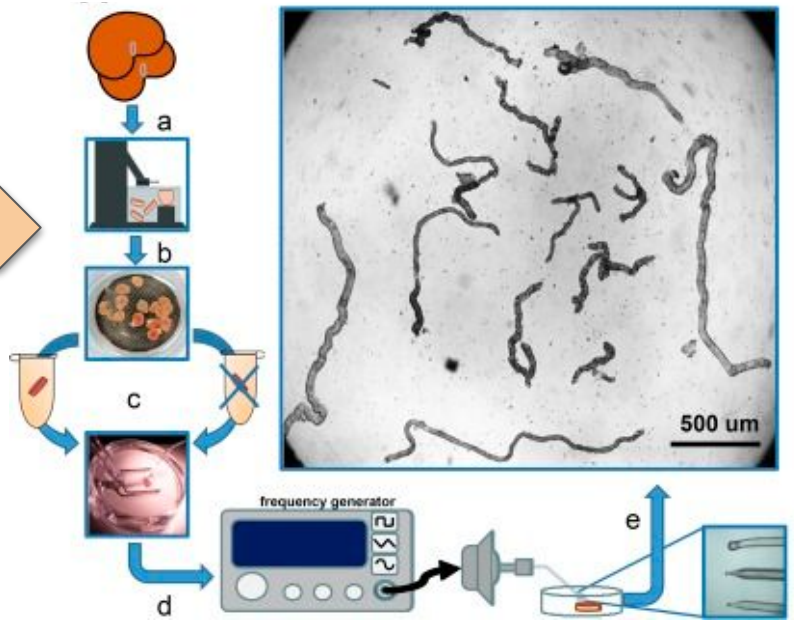




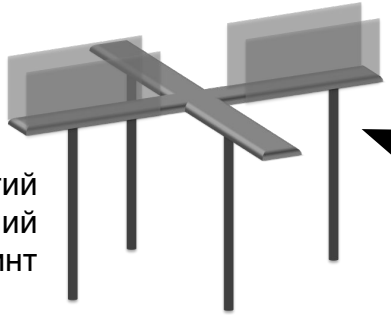
МЕТОДИ: РЕЄСТРАЦІЯ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГІПОКАМПА, ВІБРОДИСОЦІАЦІЯ, ПОВЕДІНКОВІ ТЕСТИ, SICM

Операція з імплантації реєструючих електродів

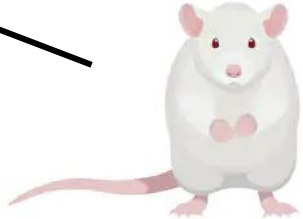
Вібродисоціація

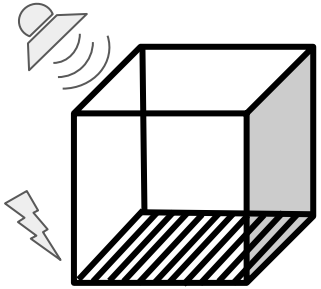


Поведінка



Припіднятий хрестоподібний лабіринт

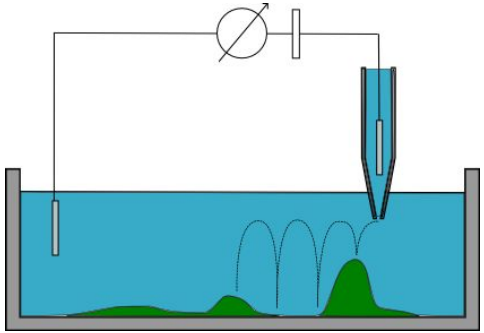




Дослідження пам’яті, що зумовлена страхом

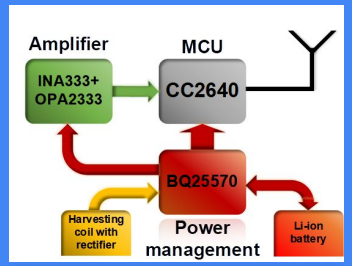
Відкрите поле

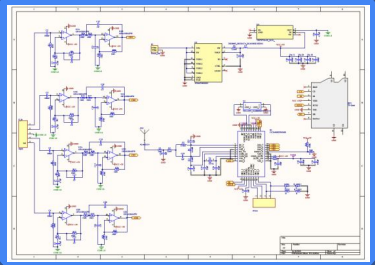
SICM



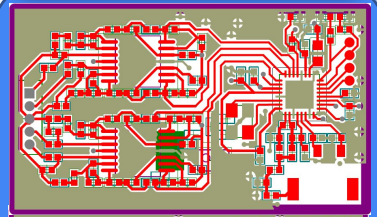
РОЗРОБЛЕНА ЧОТИРЬОХ КАНАЛЬНА БЕЗДРОТОВА СИСТЕМА ДЛЯ РЕЄСТРАЦІЇ ЕЛЕКТРОФІЗИЧНИХ ПОТЕНЦІАЛІВ У ЩУРІВ ПІД ЧАС ЕПІЛЕПТИЧНИХ НАПАДІВ ТА ВИКОНАННЯ ПОВЕДІНКОВИХ ТЕСТІВ.

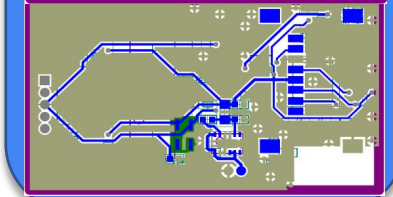
Stage 1

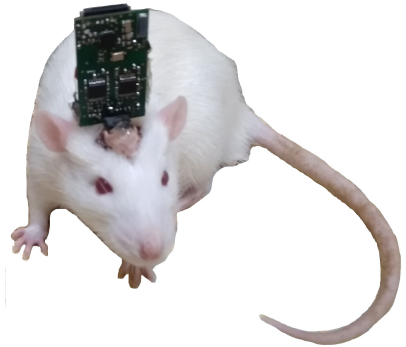




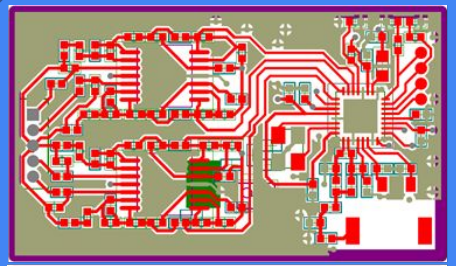
Stage 2

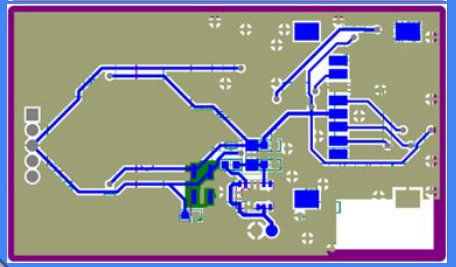


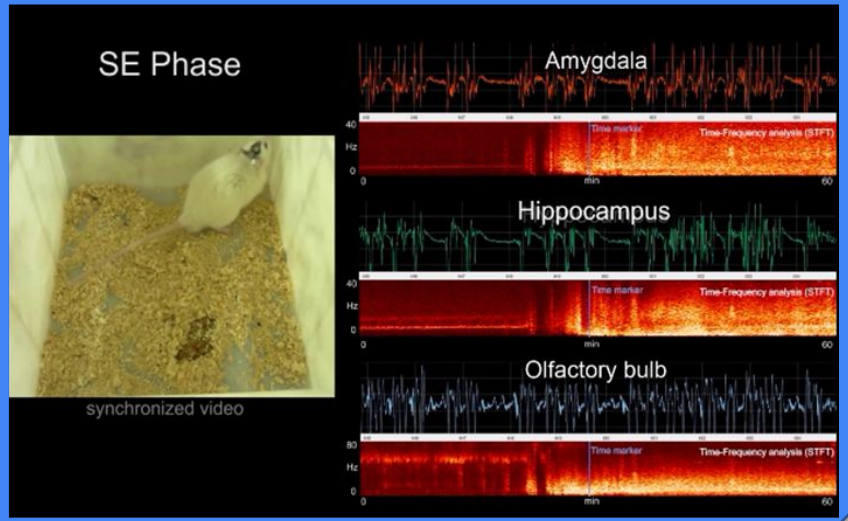




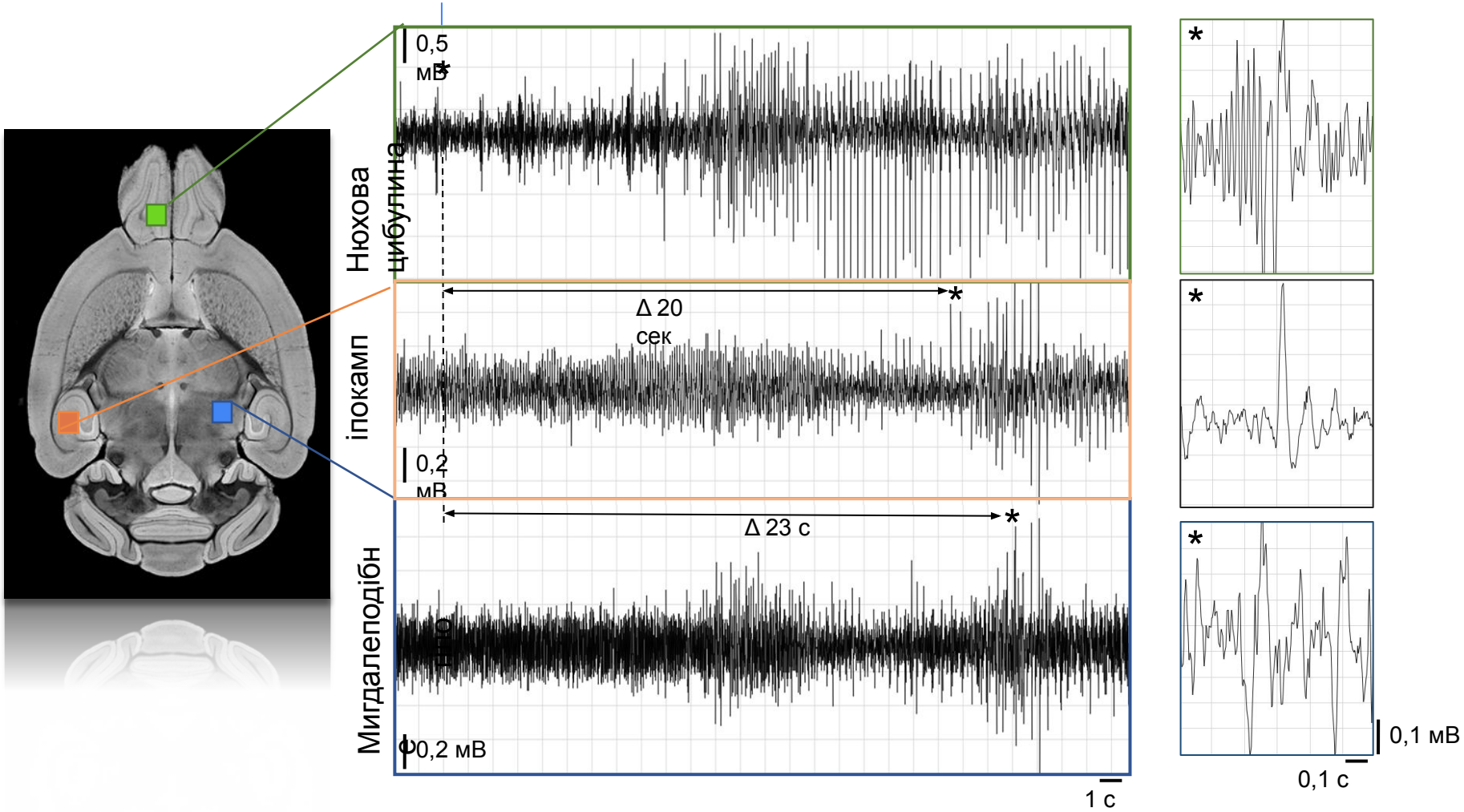
Переваги:
- ➢ 4 реєструючі канали
- ➢ передача даних у режимі реального часу по Bluetooth LE
- ➢ довготривалий запис до 12 годин
- ➢ перезаряджаємий Li-Ion акумулятор





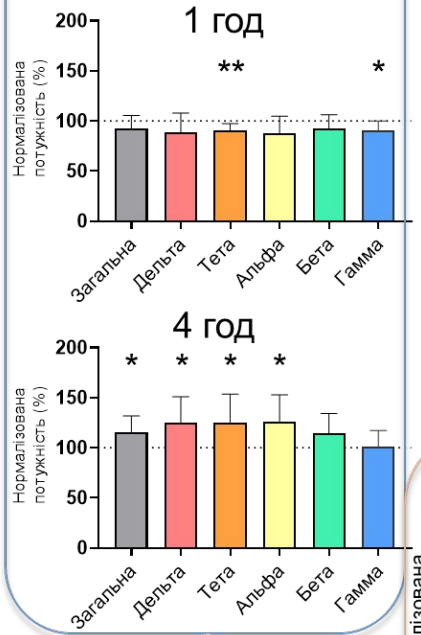


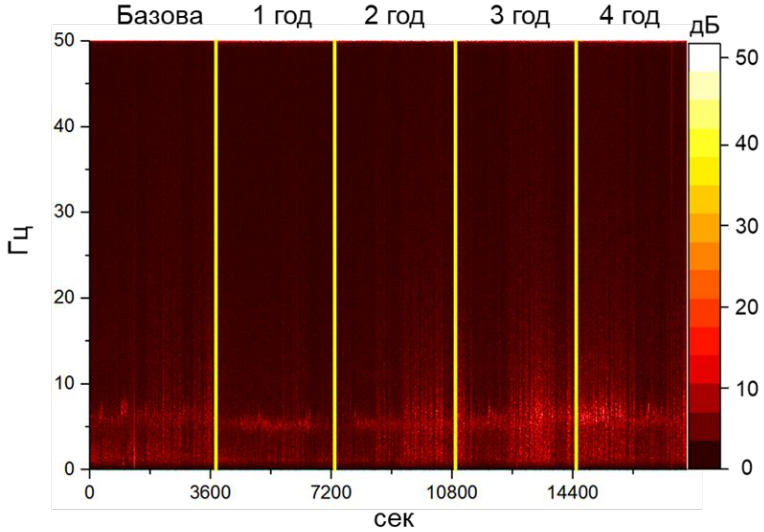
ПОЯВА ПЕРШИХ ІКТАЛЬНИХ СПАЛАХІВ ПІД ЧАС РОЗВИТКУ ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ



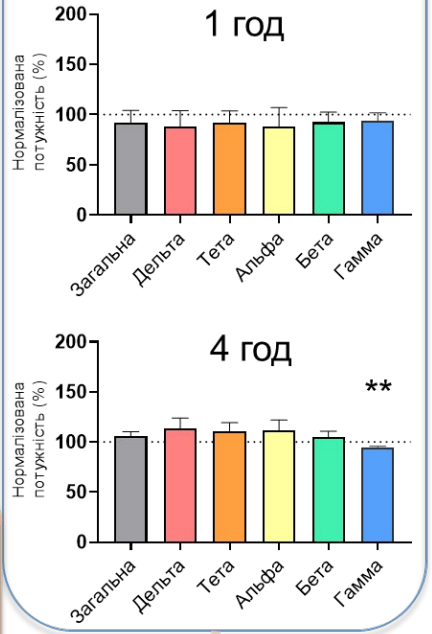
Вплив LiCl на зміни локальних потенціалів гіпокампа

Зміни відносно базової лінії у групі Контроль

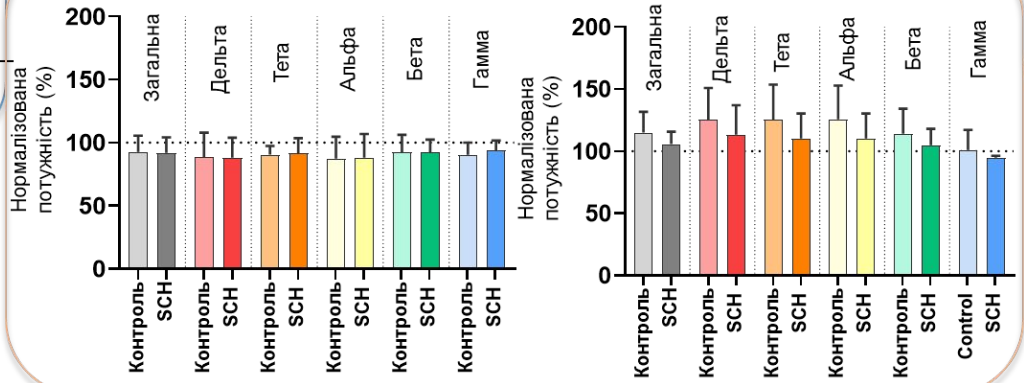




Зміни відносно базової лінії у групі SCH

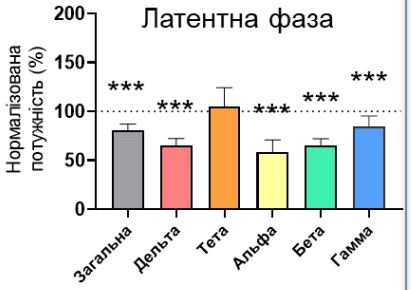


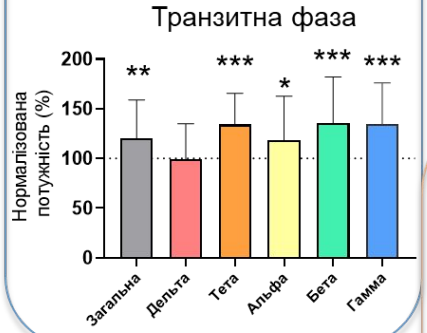
Порівняння між групами

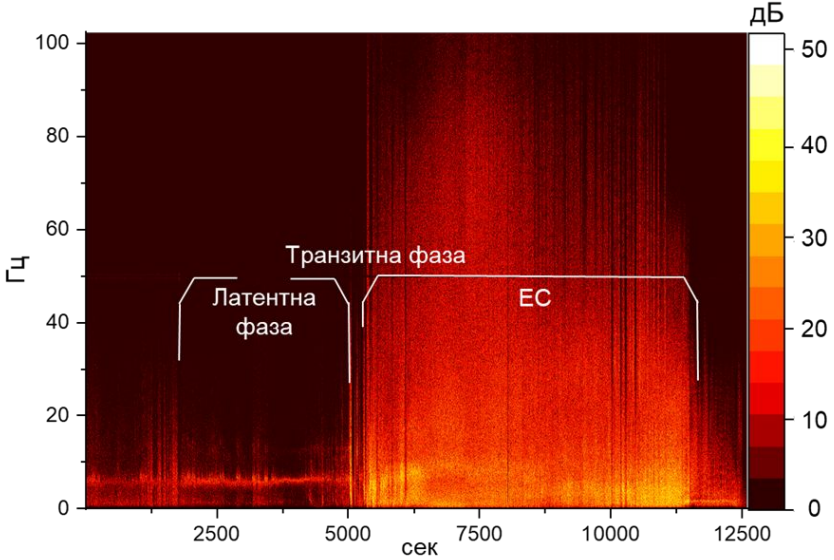


Зміни потужності локальних потенціалів гіпокампа під час розвитку ЕС

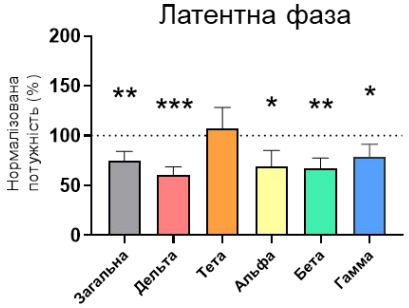
Зміни відносно базової лінії у групі Контроль

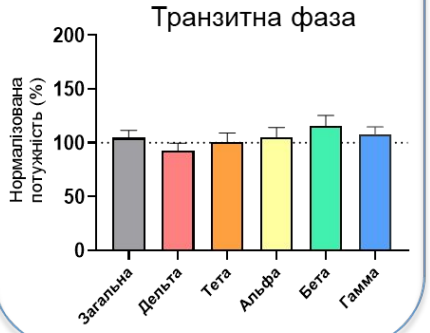


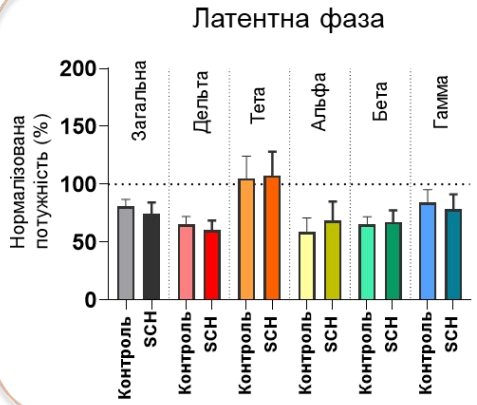


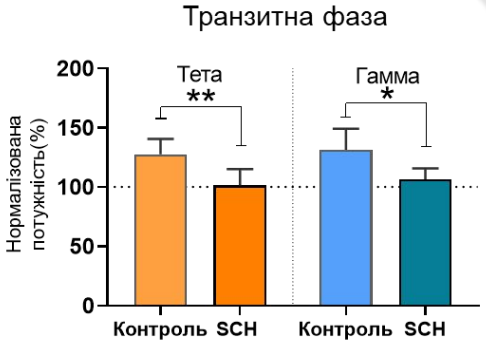


Зміни відносно базової лінії у групі SCH





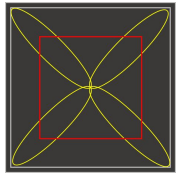


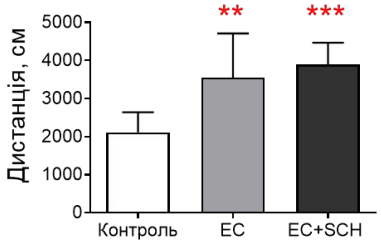


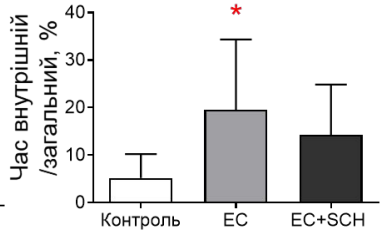
БЛОКУВАННЯ ПАР 1 НОРМАЛІЗУЄ РІВЕНЬ ТРИВОЖНОСТІ ТА РІВЕНЬ ЕМОЦІЙНО-ЗУМОВЛЕНОЇ ПАМ'ЯТІ У ЩУРІВ ПІД ЧАС ЛАТЕНТНОГО ТА ХРОНІЧНОГО ПЕРІОДУ ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗУ

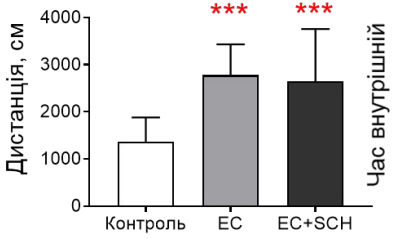
Латентний період | Хронічний період

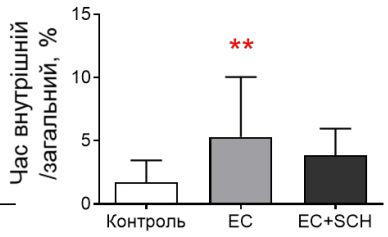
Відкрите поле



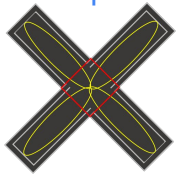




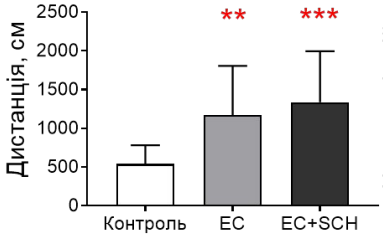


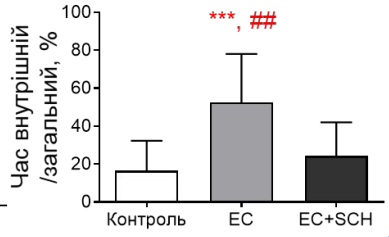


Хрестоподібний лабіринт

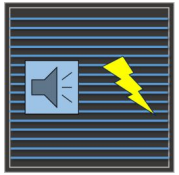


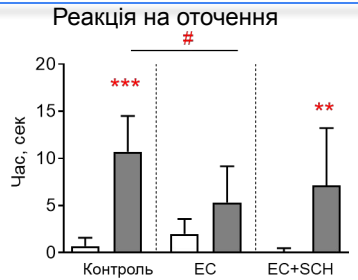
Різниці не виявлено

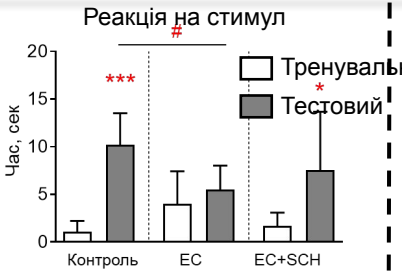


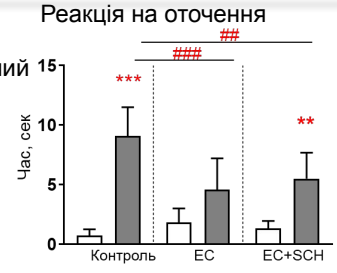


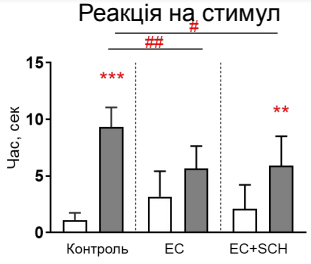
Зумовлений страх



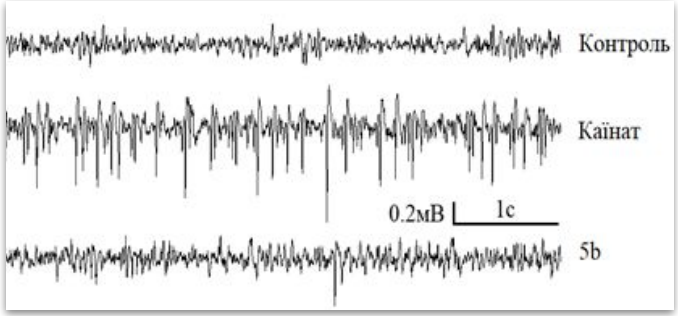




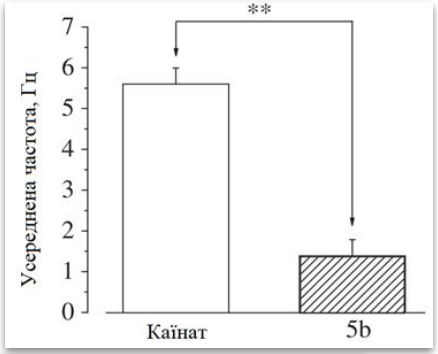




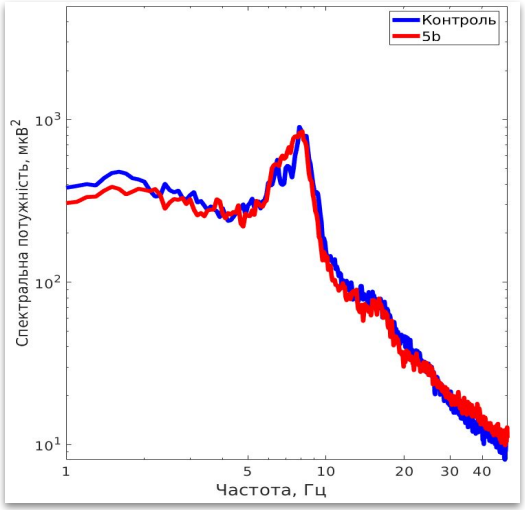
БЛОКАДА ASICs ЗМЕНШУЄ ЕПІЛЕПТИФОРМНУ АКТИВНІСТЬ ТА ЧАСТОТУ ГІПОКАМПАЛЬНОГО ТЕТА-РИТМУ

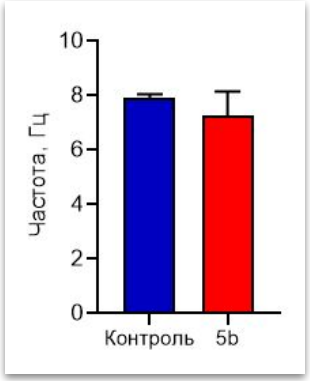


Ін'єкція каїнату у гіпокамп (зона CA1) *in vivo* викликала епілептиформну активність, яка знизилась після ін'єкції сполуки 5b (1 мкмоль)

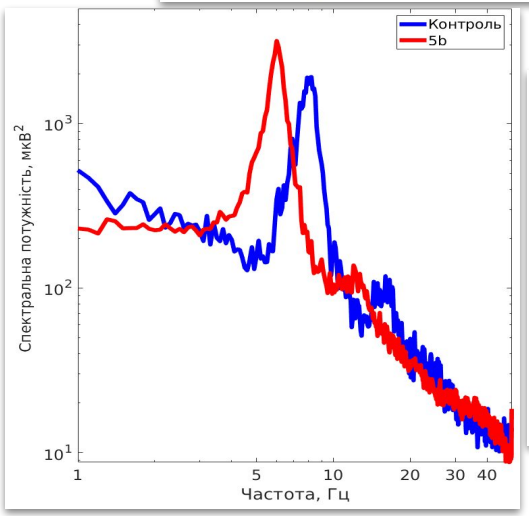


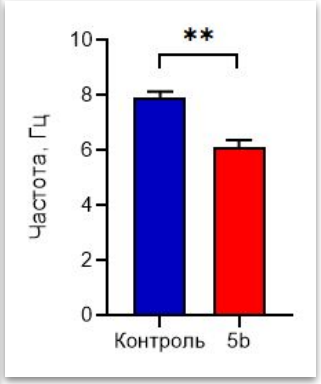
Вплив сполуки 5b на частоту індукованих каїнатом нападів у гіпокампі щурів (n=7, p<0.005)





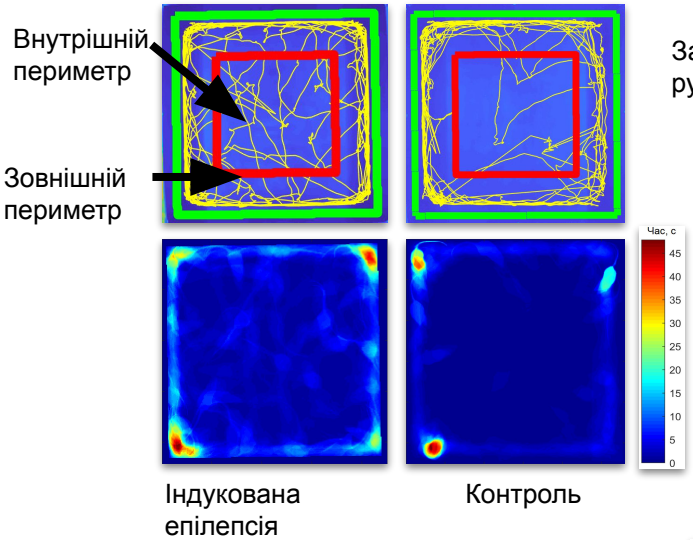
Під час перебування в домашній клітці на початку експерименту (контроль n=8, 5b n=8)

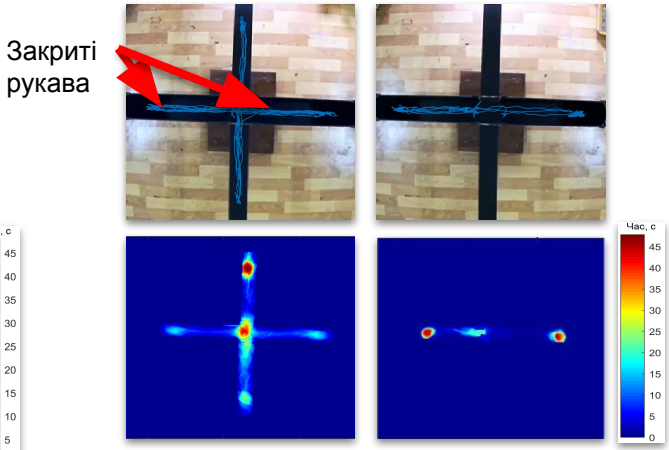


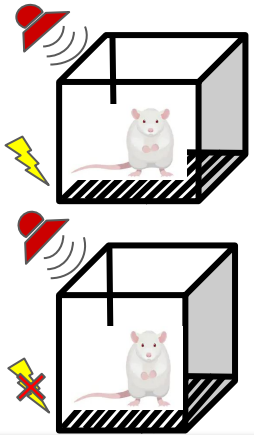


Під час перебування у експериментальній установці (контроль n=8, 5b n=8)

ФАРМАКОЛОГІЧНА БЛОКАДА ASICs НОРМАЛІЗУЄ ПОВЕДІНКУ ТА ВІДНОВЛЮЄ ЕМОЦІЙНЕ НАВЧАННЯ ЩУРІВ З ЕПІЛЕПСІЄЮ

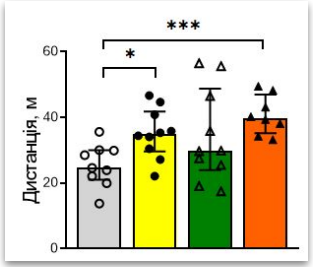


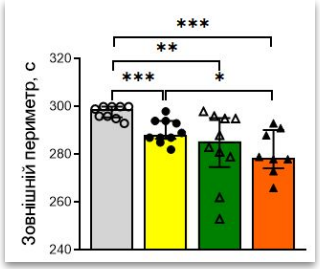


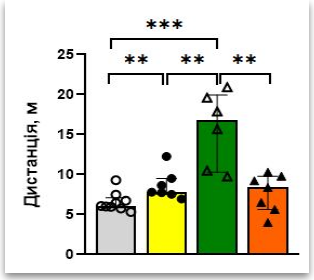


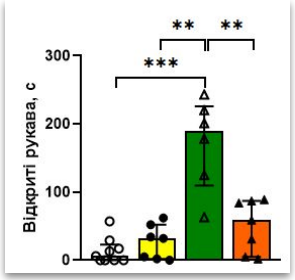
1 День експерименту (оточення, звуковий та електричний стимули)

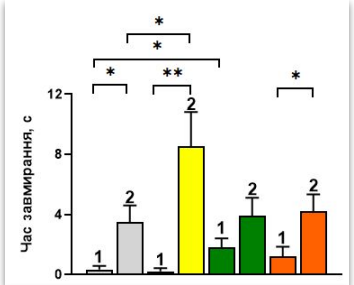
2 День експерименту (оточення, звуковий стимул)



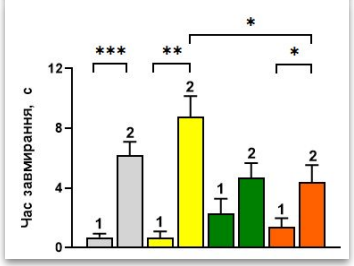








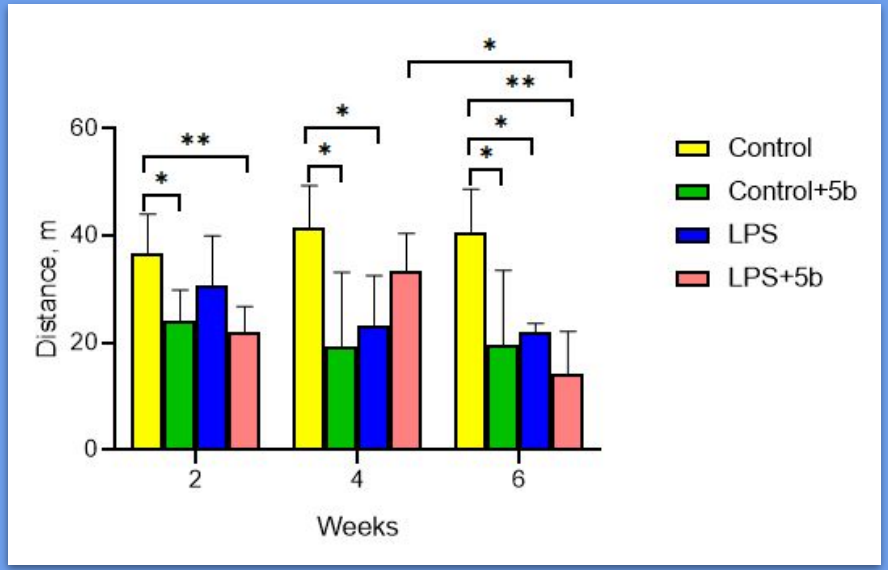
Реакція на оточення



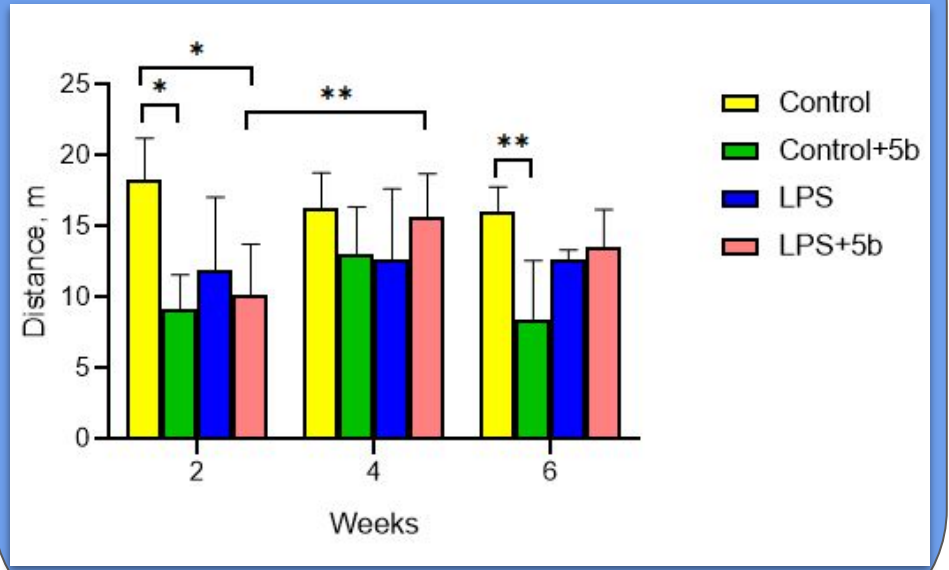
Реакція на звуковий стимул

ЕФЕКТ БЛОКУВАННЯ ASICs НА ЗАГАЛЬНУ ДИСТАНЦІЮ, ПРОЙДЕНУ КОНТРОЛЬНИМИ ТВАРИНАМИ ТА ТВАРИНАМИ ІЗ МОДЕЛЛЮ ЗАХВОРЮВАННЯ ПАРКІНСОНА ПІД ЧАС ПОВЕДІНКОВИХ ТЕСТІВ

ТЕСТ «ВІДКРИТЕ» ПОЛЕ»

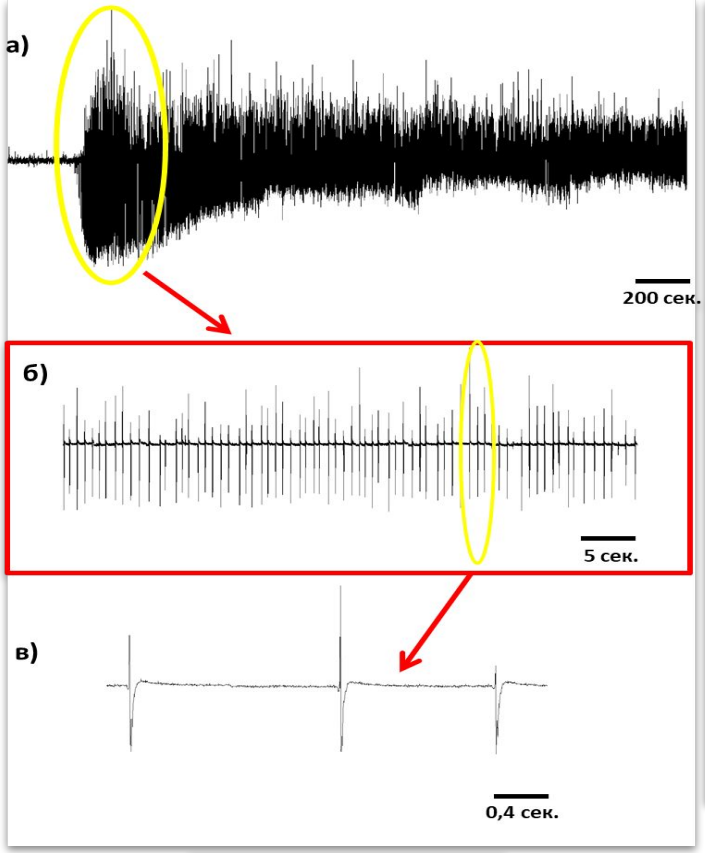


ТЕСТ «ХРЕСТОПОДІБНИЙ ЛАБІРИНТ»

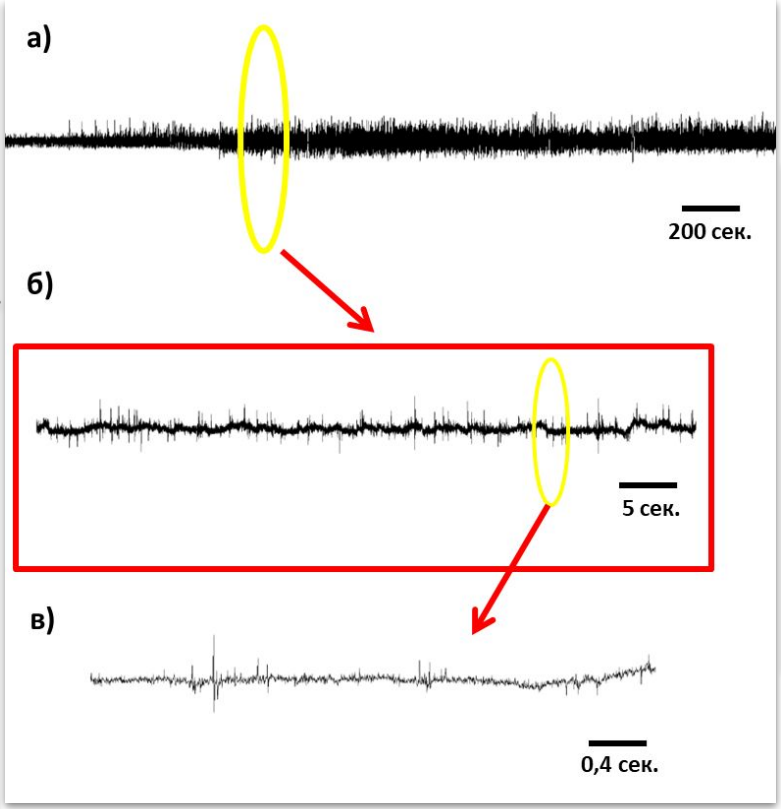


* - різниця достовірна при $p<0.05$

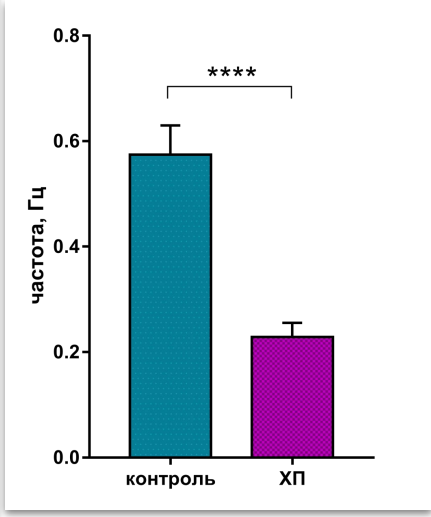
ЕПІЛЕПТИФОРМНА АКТИВНІСТЬ У ЗОНІ СА1 ГІПОКАМПА У КОНТРОЛІ ТА ПРИ ХВОРОБІ ПАРКІНСОНА



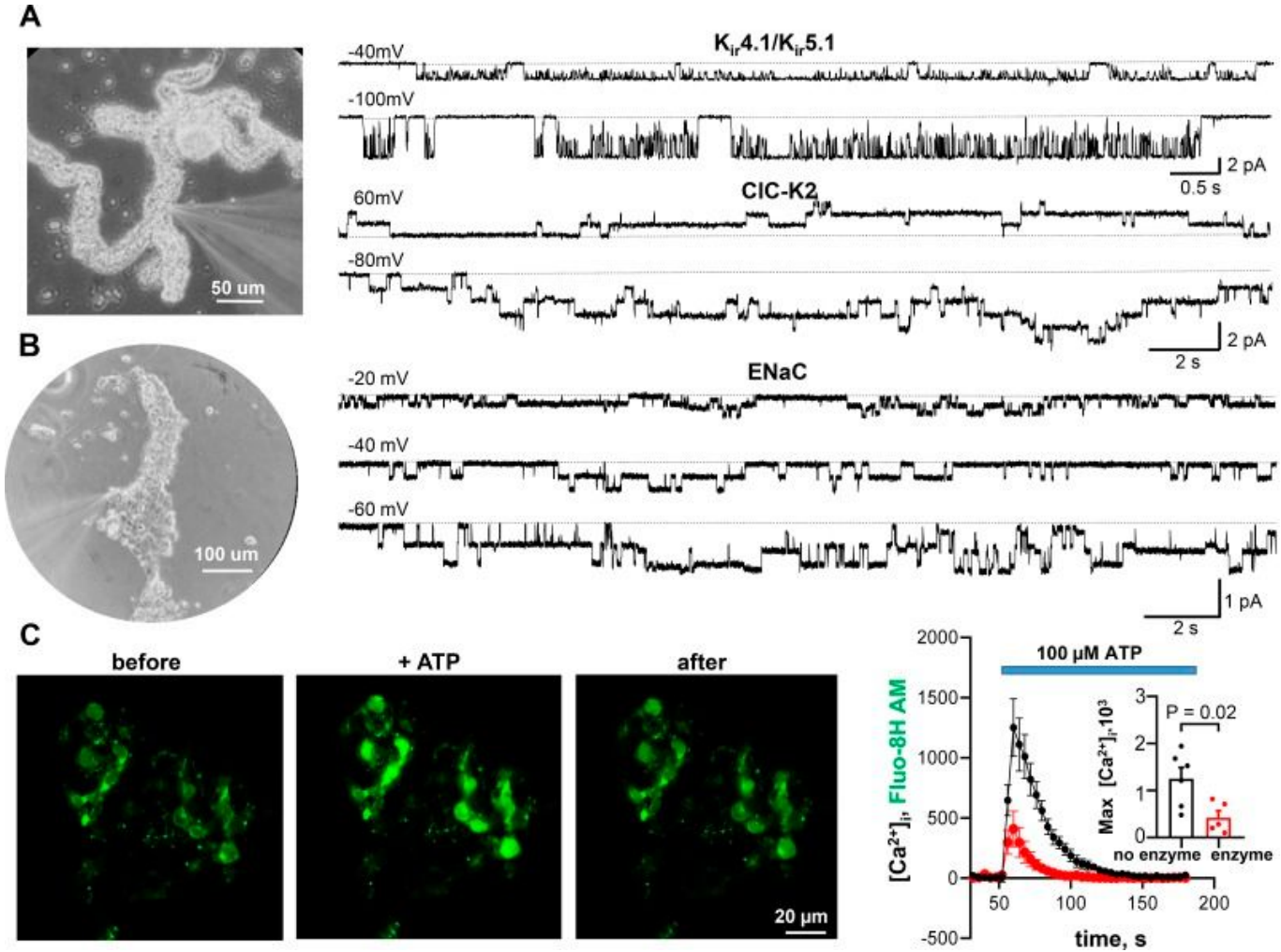
Контрольні щури



Щури з хворобою Паркінсона



ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНІКИ ВІБРОДІССОЦІАЦІЇ ДЛЯ ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

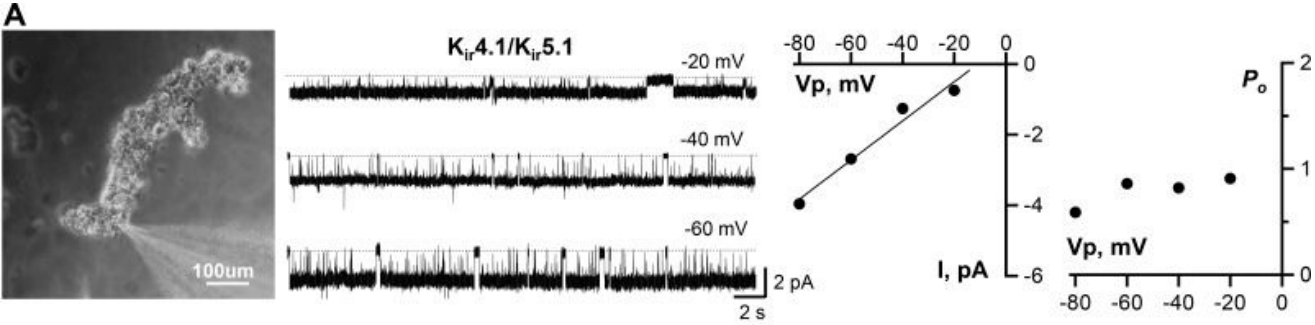


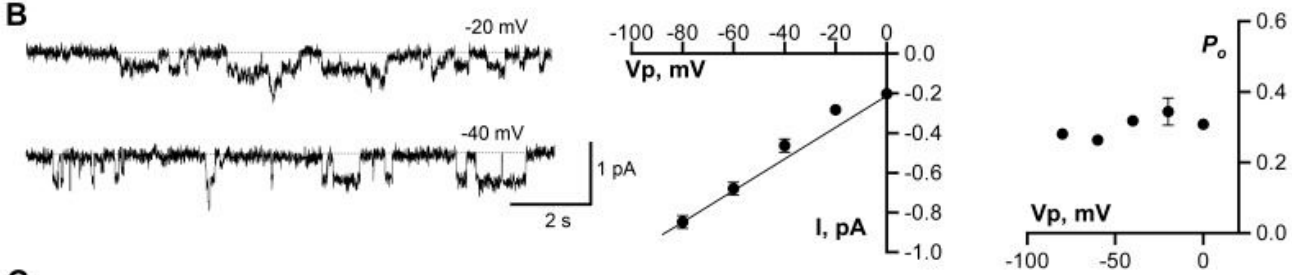
A - кортикальні збірні канальці (CCD) миші та реєстрації K^+ і Cl^- каналів з базолатеральної при різних мембранних потенціалах.

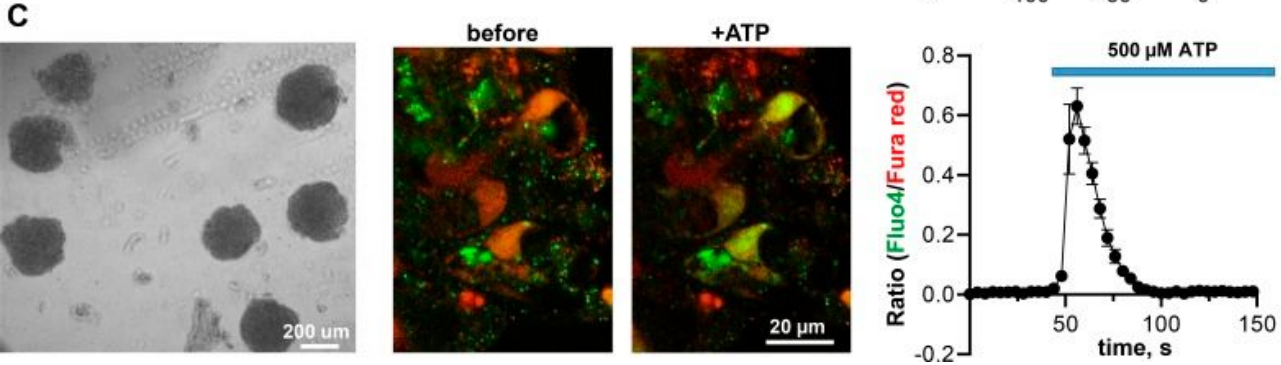
B - розщеплена CCD, ізольована від нирки щура та реєстрації епітеліального Na^+ каналу (ENaC) з апікальної мембрани CCD при різних мембранних потенціалах.

C - ефект попередньої ферментативної обробки на АТФ-індуковану відповідь Ca^{2+}, зареєстрований у подоцитах щурів та сумарний графік внутрішньоклітинних змін концентрації Ca^{2+}, індукованих АТФ, зафіксованих у подоцитах гломерул, виділених із (червоний) та без (чорний) ферментативної попередньої обробки зрізів нирок.

ВИКОРИСТАННЯ ТЕХНІКИ ВІБРОДІССОЦІАЦІЇ ДЛЯ ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ





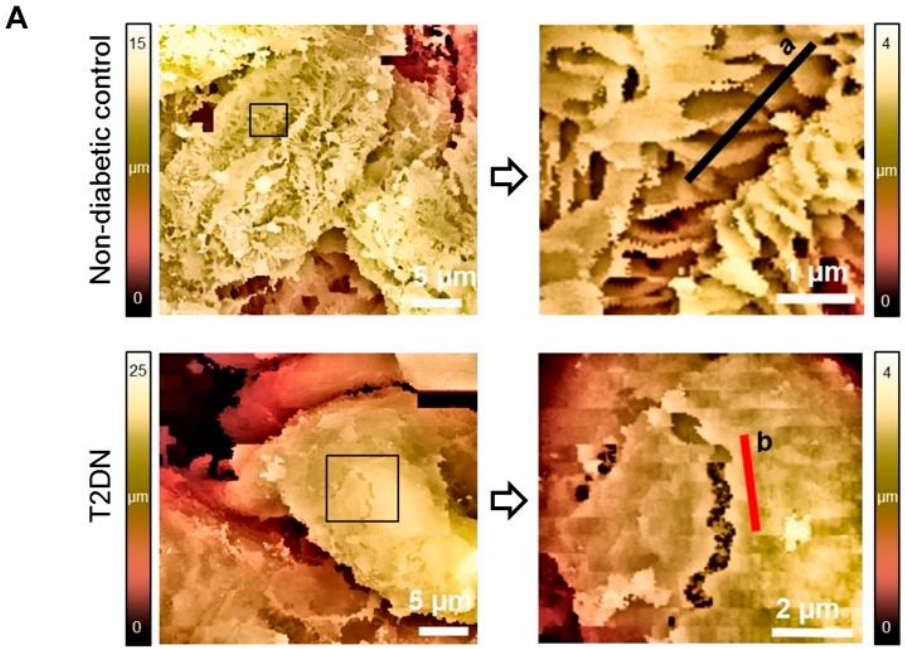


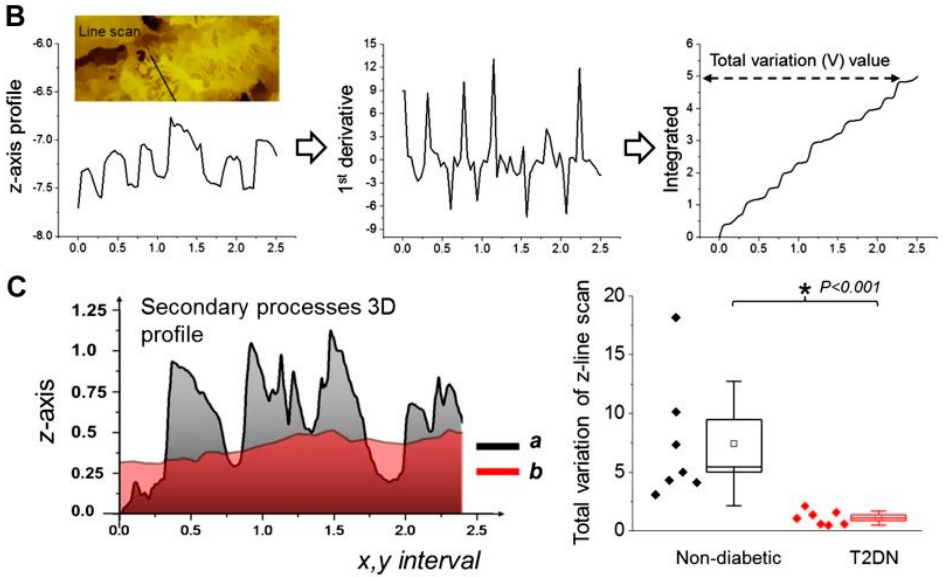
A - репрезентативне зображення кортикального збірного канальця людини (CCD) з піпеткою, прикріпленою до клітинної мембрани. Реєстрація K^+ з різним потенціалом піпетки, опосередкована активацією каналів $Kir_{4.1}/Kir_{5.1}$, експресованих на базолатеральній мембрані клітин CCD людини. Залежність струму (I) - напруги (Vp) та залежність напруги відкритої ймовірності каналу (Po) для цього запису.

B - приклад записів епітеліального Na^+ каналу (ліворуч) із розщеплених CCD, виділених із нирки людини.

C - зображення гломерул людини у світлому полі, виділених методом вібродіссоціації без ферментативної попередньої обробки. Зображення людських гломерул, попередньо завантажених фторо-4 (зелений) та фура-червоний (червоний) до та після застосування АТФ. Співвідношення фтору 4- до фура-червоного у відповідь на застосування 500 мкМ АТФ, вилученого з 16 подоцитів свіжоізольованої людської гломерули.

ОЦІНКА СТРУКТУРНИХ ЗМІН РОЗРОСТАННЯ СТОПИ ПОДОЦИТІВ МЕТОДОМ СКАНУЮЧОЇ ІОННОЇ ПРОВІДНИКОВОЇ МІКРОСКОПІЇ (SICM).





A - тривимірні топографічні зображення недіабетичних (чутливих до солі) щурів та T2DN щурів (> 48 тижнів), отримані за допомогою SICM. Сканування з надвисокою роздільною здатністю проводили у вибраній ділянці гломерул під різним збільшенням і виявляли міжпальцеві відростки стопи, що огортають капіляри гломерул. При скануванні гломерули, виділеної від щура T2DN, повністю відсутній міжпальцевий відросток стопи на вибраній ділянці.

B - приклад кількісного визначення профілю осі z для оцінки форми та варіації відростків стоп подоцитів. Загальна довжина кривої сегмента дуги через сканування лінії осі z представляє мінливість/щільність відростків стопи подоцитів, отриманих із зображень топографії SICM, і визначалася інтегралом першої похідної кривої осі z на вибраний інтервал.

C - приклади профілю сканування ліній z-осі для тривимірних топографічних зображень, показаних в A. Зведений графік виявив значні зміни в загальних варіаціях профілю осей z-осі та вказав серйозні втрати росту стопи у тварин T2DN (N ≥ 3 клубочки, n = 7 сканування рядків, * P <0,001, ANOVA).

ВИСНОВКИ

1. Розроблена багатоканальна бездротова система реєстрації електрофізіологічних потенціалів, яка дозволяє у режимі реального часу на протязі довгого часу одночасно реєструвати локальні потенціали різних ділянок мозку тварин у спокою, під час проведення поведінкових тестів, та надає можливості реєструвати епілептичний статус тим самим роблячи більш детальні дослідження розвитку патогенних станів.
2. Розвиток епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії у дорослих щурів супроводжується ранньою появою іктальних спалахів та збільшенням потужності локальних потенціалів у нюховій цибулині в порівнянні з гіпокампом та мигдалеподібним комплексом.
3. Фармакологічне блокування PAR1 у дорослих щурів призводить до зменшення потужності тета- та гамма-ритмів гіпокампа під час становлення епілептичного статусу у літій-пілокарпіновій моделі епілепсії, а також до нормалізації рівня тривожності та емоційно-зумовленої пам'яті у дорослих щурів під час латентного та хронічного періодів епілептогенезу.
4. Блокада провідності ASICs пригнічує епілептиформну активність нейронів зони CA1 гіпокампа *in vivo* в умовах каїнатної моделі скроневої епілепсії та при моделюванні хвороби Паркінсона.
5. Блокування активності ASICs призводить до зниження домінуючої частоти гіпокампального тета-ритму у щурів.
6. Пригнічення ASICs нормалізує рівень тривожності у щурів з епілепсією та при хворобі Паркінсона.
7. Фармакологічна блокада ASICs у щурів значно відновлювала порушене внаслідок індукції епілепсії емоційне навчання, що зумовлене страхом.
8. Розроблений метод вібродисоціації являє собою універсальний та надійний спосіб відокремлення добре збережених сегментів нефрону від різноманітних видів тварин, що вдосконалює сучасні методології виділення компонентів нирок та забезпечує чудову платформу для оцінки їх властивостей in vitro.
9. Застосування нового підходу скануючої іонної мікроскопії (SICM) із надвисокою роздільною здатністю для візуалізації та кількісної оцінки змін у морфології росту стоп подоцитів під час розвитку DN у щурів T2DN. Наші дані вказують на важке пошкодження подоцитів та зниження відростків стопи у щурів T2DN, включаючи кілька крайніх випадків з повністю оголеними ендотеліальними клітинами, що утворюють стінку капілярів гломерул. Більше того, отримані тривимірні топографічні зображення дозволили кількісно визначити розмір та щільність відростка стопи подоциту, що, на нашу думку, в майбутньому може бути корисним для досліджень та клінічних оцінок патології подоцитів у зразках біопсії.