

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології і біоінформатики  
Доцент Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол №\_\_\_ засідання кафедри  
Від “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2022 р.

**ЗМІНИ СТРУКТУРИ СНУ, ОБУМОВЛЕНІ ФАРМАКОЛОГІЧНИМ  
БЛОКУВАННЯМ ПРОТОН-ЧУТЛИВИХ ІОННИХ КАНАЛІВ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студентки спеціальності 091 Біологія  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Вітик Орісі Дмитрівної**

Науковий керівник від кафедри:  
к.б.н., доцент **Самофалова Д. О.**

Робота виконана у Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України під керівництвом к.б.н., ст. досл. **Чернінського А. О.**

Оцінка захисту роботи  
\_\_\_\_\_

Київ – 2022 р.

## АНОТАЦІЯ

Вітик Оріся. Протон-чутливі іонні канали це порівняно нещодавно відкриті і мало досліджені структури. На даний час відома їхня участь у передачі синаптичного сигналу, модуляції глутаматергічних та ГАМК-ергічних синапсів, навчанні та поведінці, а також можлива роль у розвитку неврологічних розладів, таких як епілепсія або хвороба Альцгеймера. У цій роботі розглядається роль, яку відіграють ASICs у різних патологіях, та фармакологічні агенти, що діють на ASICs, та можуть бути перспективними ліками, їх вплив на структуру сну щурів. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія, ОП Біологія (високі технології).

У ході роботи було досліджено вплив блокади ASICs на структуру сну у щурів.

**Ключові слова:** ASICs, ЕЕГ, REM, повільнохвильовий сон, 5b, спектрограма.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....</b>	<b>4</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>7</b>
1.1 Фізіологічне значення протон-чутливих іонних каналів.....	7
1.1.1 Експресія ASICs в організмі .....	8
1.1.2 Фармакологічні модулятори активності ASICs.....	10
1.1.3 Фізіологічна роль ASICs в головному мозку ссавці .....	11
1.1.4 Роль ASICs у патофізіологічних станах .....	13
1.2 Сон як особливий функціональний стан нервової системи .....	14
1.2.1 Фізіологічна роль сну .....	15
1.2.2 Структура сну.....	16
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>18</b>
2.1. Лінії щурів та отримання електричної активності мозку .....	18
2.2 Класифікація функціонального стану тварин на основі EEG-записів.....	20
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....</b>	<b>23</b>
3.1 Аналіз спектральної потужності частот гіпокампу.....	23
3.2 Обговорення результатів.....	26
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>27</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>Помилка! Закладку не визначено.</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ASICs – протон чутливі іонні канали (acid-sensing ion channels)

DEG/ENaC – дегерин/епітеліальний натрієвий канал (epithelial sodium channel)

REM – фаза швидкого сну (rapid eye movement)

NREM – фаза нешвидкого сну (non-rapid eyes movement)

SWS – (slow wave sleep)

Wake – стан неспанья

HP – гіпокамп (hippocampus)

PFC – префронтальна кора (prefrontal cortex)

OB – нюхова цибулина (olfactory bulb)

AM – мигдалевидне тіло (amygdala)

GMQ – 2-гуанідин-4-метилхіназолін (2-Guanidine-4-methylquinazoline)

## ВСТУП

Acid-sensing ion channels (ASICs, Протон-чутливі іонні канали) це протонкеровані потенціалнезалежні іонні канали. ASICs належать до епітеліальних натрієвих каналів\дегеринів (ENaC/DEG) надродина амілорид-чутливих каналів [1]. Історія ASICs починається у 1980 році коли їхня активація зовнішньоклітинною ацидифікацією в нейрональній мембрані була вперше зафіксована [2] та існування специфічних протончутливих рецепторів було доведено. Концепція високоселективних натрієвих каналів, які регулюються специфічними рецепторами для протонів не була загальноприйнятою в той час. В 1997 протон-чутливий рецептор був клонований і названий «acid-sensing ion channel». Це ознаменувало нову еру в дослідженнях ASICs [3]. Поступово було виявлено існування щонайменше восьми ASICs субодиниць (включаючи ASIC1a, ASIC1b, ASIC1b2 ASIC2a, ASIC2b, ASIC3, ASIC4, і ASIC5) кодованими п'ятьма різними генами На відміну від ENaCs, ASICs формують гетеромерні протеїнові комплекси конструюючи канали з різними властивостями [4].

Дані канали широко експресуються у таких важливих для здійснення інтегративних функцій відділах нервової системи як гіпокамп, мигдалина, прилегле ядро та ін. Однією з важливих системних функцій нервової системи є підтримки циркадної ритміки, формування циклів сон — неспання. Нещодавно показано, що протон-чутливі канали нейронів блакитного місця, однієї з сомногенних структур мозку, беруть участь у здійсненні цієї функції. ASICs розглядаються як потенційні мішені фармакологічних засобів для корекції ряду патологій, таких як депресія та тривога [5], хвороба Альцгеймера [6] та епілепсія [7]. Відтак, вивчення системного блокування цих каналів за допомогою доступних речовин є важливим з точки зору виявлення потенційних побічних ефектів. Метою цієї роботи було виявлення ефекту блокування ASIC1a за

допомогою новітнього блокатора сполуки 5b на структуру сну та пов'язану електричну активність головного мозку щурів.

**Актуальність** роботи полягає у дослідженні впливу ASICs на фізіологічні процеси головного мозку для подальшого використання їх як фармакологічних мішеней у розробці препаратів для боротьби з можливими патологіями, які викликає їх дисфункція.

**Метою** роботи є визначення різниці між записами електрофізіологічної активності мозку щурів, які знаходяться під дією блокатора ASICs та порівняти їх з активністю щурів, які не піддалися фармакологічній блокаді.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні задачі:

1. Запис електрофізіологічної активності мозку щурів.
2. Класифікація станів (неспанья, REM та NREM).
3. Спектральний аналіз ЕЕГ та порівняння за умов дії блокаторі та без.
4. Порівняти отримані результати з результатами подібного експерименту поставленого в Інституті Фізіології імені О.О. Богомольця [5].

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### **1.1 Поширення та фізіологічне значення протон-чутливих іонних каналів**

У різних тканинах та органах нашого тіла рН підтримується у жорстких межах. Місцеві зміни рН відбуваються, однак, тимчасово у фізіологічних умовах, як, наприклад, у синапсах під час активної комунікації нейронів. В патологічних ситуаціях, таких як ішемія, запалення та ріст пухлини, розвивається тривале закислення. Протончутливі іонні канали (ASICs) - це активовані за низького рН  $\text{Na}^+$ -проникні іонні канали, які широко експресуються в центральній та периферичній нервовій системі. ASIC діють як сенсори рН, зниження якого може супроводжуватися загибеллю клітин [8]

Падіння рН у нервовій системі може бути наслідком ішемії та ацидозу, і ASICs є дуже хорошими детекторами, що розрізняють невеликі зміни кислотності [9]. ASICs є важливими фармакологічними мішенями, залученими до різних патофізіологічних процесів, що зачіпають як периферичну нервову систему (наприклад, периферичний біль, діабетична невропатія), так і центральну нервову систему (наприклад, інсульт, епілепсія, мігрень, тривога, страх, депресія, нейрогенерация і т.д.) [10].

### 1.1.1 Експресія ASICs в організмі.

ASICs широко експресуються як в периферійній так і в центральній нервових системах [11] [12], виконуючи декілька ролей в різних та важливих фізіологічних функціях і патологічних станах. Щонайменше відомо вісім натрієвих різних субодиниць кодується п'ятьма різними генами. Протеїни кодовані цими генами складають субодиниці що формують гомо- та гетеромери з різними біофізичними та фармакологічними властивостями. Сплайсові варіанти гену ASIC1 кодуєть ASIC1a, ASIC1b і ASIC1b2 субодиниці; ASIC2 – ASIC2a і ASIC2b субодиниці [13] [14]. Сплайсові варіанти для ASIC3, ASIC4, та ASIC5 на даний момент не були ідентифіковані. В нервовій системі ASIC1a, ASIC2a, і ASIC2b [15]–[17] в більшості експресуються в ЦНС, тоді як ASIC3, ASIC1b, і ASIC1b2 в сенсорних нейронах периферійної нервової системи [18], [19]. Експресія ASIC3 корелює з їх роллю в мультимодальному сенсорному сприйнятті, включаючи ноцицепцію, механочутливість і хемочутливість. Незважаючи на те що ASIC3 представлені в деяких спеціалізованих зонах мозку[20], [21], ASIC1a, 2a і 2b є найпоширенішими субодиницями, що визначено за експресією, імуногістохімією[22], [23] та у електрофізіологічних досліджах [23], [24]. Ці субодиниці формують функціональні (тобто можуть активуватися фізіологічними змінами рН середовища) гомо- та гетеротримерні комплекси [12]. ASIC1a гомомери особливо чутливі до рН. Інші субодиниці ASICs ( та гетеромери) менш чутливі до протонів, а ASIC4 та ASIC5 не активуються протонами взагалі[25]–[27]. Особливий інтерес представляє збіг експресії білків ASIC2 та ASIC1a з синаптично щільними областями в декількох структурах мозку [28], що підкреслює важливу роль ASICs у синаптичній функції.

Практично всі відомі субодиниці ASIC присутні в мозку ссавців, за винятком ASIC1b [22] та ASIC1b2 [29] субодиниць, які, мабуть, специфічні для периферичної нервової системи. ASICs переважно експресуються в нейронах

головного мозку, однак, кілька досліджень документально підтвердили присутність ASIC у гліальних клітинах. Зокрема, експресія ASICs була показана у клітинах-попередниках олігодендроцитів (також відомих як NG2-клітини) [30][31] мРНК ASIC1a, ASIC2a та ASIC4 були виявлені в клітинах олігодендроцитарної лінії, транскрипти ASICs також були виявлені у білій речовині мозку, зокрема експресія білка ASIC1a була виявлена в олігодендроцитній білій речовині [30]. Існування ASIC1, ASIC2a та ASIC3 було продемонстровано у мікроглії за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (qPCR), вестерн-блот та імунофлуоресценції [32]. Експресія мікрогліальних ASIC1 та ASIC2a була підвищена при стимуляції ліпополісахаридом (який посилює вироблення медіаторів запалення), і це може бути пригнічено блокаторами ASICs [32]. Присутність ASIC1, ASIC2a, ASIC3 також було зареєстровано у астроцитах [33].

У фізіологічних умовах більшість ASIC в астроцитах експресувалися в ядрі [7], [33]. З іншого боку, у реактивних астроцитах (в гіпокампі епілептичних мишей), приплив  $Ca^{2+}$ , індукований підкисленням, був чутливий до PcTx1 [7], що свідчить про наявність функціональних ASICs.

Лінії клітин гліобластоми експресують функціональні кислоточутливі іонні канали ASIC1a та ASIC3 [34]. Таким чином, видається, що значна експресія ASICs у гліальних клітинах в основному пов'язана з виникненням патології. ASICs також експресуються в судинних гладких м'язах [35] та імунних клітинах [36], [37]; проте рівень експресії ASICs у цих клітинах зазвичай нижчий.

У кількох недавніх оглядах було узагальнено інформацію про роль ASICs у периферичній нервовій системі, зокрема, ноцицепції та пропріоцепції [38], [39], а також зв'язок структури та функції ASICs [40], [41] та їх еволюцію [42]. Однак останні дані про роль ASICs у ноцицепції та їх еволюції мало висвітлені щодо ролі ASICs у мозку.

### 1.1.2 Фармакологічні модулятори активності ASICs

Добре відомий калій-запасаючий діуретик амілорід був першою описаною молекулою антагоністом ASICs [43]. Тим не менш амілорід це неселективний блокатор. Протягом багатьох років ніяких нових лігандів для ASICs не було відкрито, аж до відкриття псалмотоксину - сильнодіючого і високоселективного природнього антагоніста ASIC1a гомомерного каналу[44]. Це відкриття ініціювало інтенсивне вивчення фармакологічних властивостей ASICs та їх роль у функціонуванні мозку. Було встановлено, що кілька прозапальних ендогенних нейротрансмітерів впливають на функціонування ASIC мозку та посилюють їхню реакцію на закислення (арахідонова кислота та RF-amide білки[45], спермін[46], динорфіни[47], гістамін[48]. Через 12 років після винаходу псалмотоксину та сама група виділила нові токсини з отрути чорної мамби (*Dendroaspis polylepis*), названі мамбалгінами та здатні блокувати як гомомірний ASIC1a, так і його гетеромери [49]. Недавно, базуючись на зв'язуванні псалмотоксину з «кислотним карманом» (зв'язуючим сайтом для декількох токсинів), було відкрито сильнодіючу низькомолекулярну молекулу - інгібітор ASIC1a каналів, але, на відміну від псалмотоксину, вона демонструє сильну залежність блокуючої дії від рН [50]. За сучасними даними, це найбільш ефективний інгібітор ASIC1a на сьогоднішній день.

Протягом тривалого часу протони були єдиними відомими активаторами ASICs. Невелика молекула 2-гуанідин-4-метилхіназоліну (GMQ) та споріднені речовини, як нещодавно було показано, можуть відкривають ASIC3 і є першими відомими непротонними активаторами ASIC активаторами. При рН 7,4 GMQ відкриває лише ASIC3, але не інші ASIC [51]. Враховуючи високу гомологію послідовності нижнього palm домену між різними субодинацями ASIC, припускається, що GMQ може зв'язуватися з усіма ASIC та впливати на їхню функцію [52].

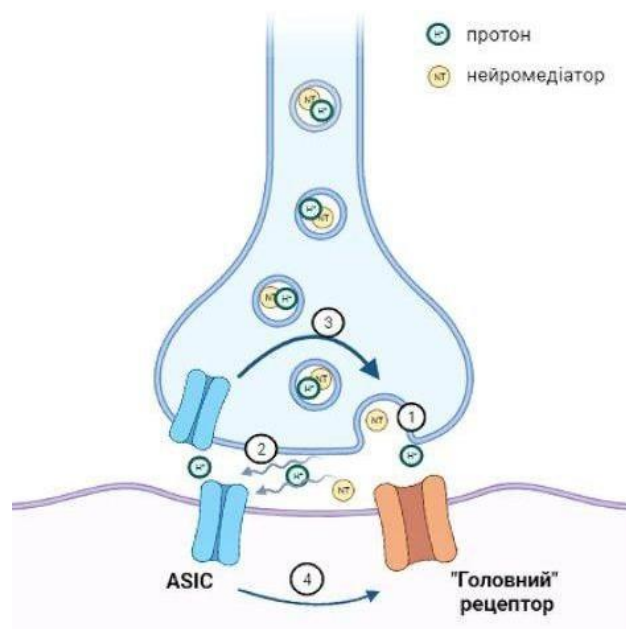
Також є дослідження, що демонструє чутливість ASIC до амонію в нейронах ЦНС[53]. Отримані результати дозволяють припустити, що основний ASIC дофамінових нейронів у мишей є амоній-чутливим каналом ASIC1-типу. Чутливість до амонію відкриває можливість впливу токсичності аміаку та ацидозу на дофамінові нейрони та передбачає загальний шлях пошкодження нейронів що виникають при гіперамоніємії.

### 1.1.3 Фізіологічна роль ASICs в головному мозку ссавців

**Роль ASICs в синапсах.** У фізіологічних умовах позаклітинний рН мозку є досить незмінним. Проте кілька механізмів можуть викликати перехідні та локалізовані коливання рН [54]. ASIC1a, 2a і 2b є основними субодиницями, що експресуються в мозку [12]. ASIC1a має особливе значення, оскільки він може активуватись при ацидозі у фізіологічному діапазоні. На відміну від інших ASICs, які проникні лише для іонів натрію, ASIC1a також пропускає іони кальцію; таким чином, його активація може запускати/регулювати безліч клітинних процесів. ASICs, особливо ті, що експресуються в мозку, зазвичай активуються при швидкому падінні рН, і вони швидко стають десенсибілізованими. Повільне підкислення призводить до сталого стану десенситизації, не викликаючи струмів, що виявляються [55], [56]. Таким чином, у мозку існує дуже мало областей де ASICs можуть бути активовані у фізіологічних умовах. Синаптична щілина є однією з таких областей [57]. Швидке закислення, що відбувається під час вивільнення синаптичних везикул (1), може активувати ASIC як на пре-, так і постсинаптичних нейронах (2). В останньому випадку частина постсинаптичного струму опосередковується ASICs, при цьому протони виступають як ко-трансмітери. Крім того, активація ASICs може модулювати синаптичну силу, впливаючи на вивільнення передавача (3) та/або чутливість до постсинаптичних

рецепторів (4) (Рис. 1). В останньому випадку частина постсинаптичного струму опосередковується ASICs, причому протони виступають як ко-трансмітери. Крім того, активація ASICs може модулювати синаптичну силу, впливаючи на вивільнення трансмітеру та/або чутливість до постсинаптичних рецепторів.

Звичайні стратегії для вивчення потенційної ролі ASICs в синаптичній передачі: а) вивчення впливу ASICs "глушіння" на синаптичну передачу за допомогою генетичних та фармакологічних інструментів; б) вивчення того, чи ці ефекти обумовлені ендогенно виникає закисленням. Що стосується останнього, то ефекти порівнюються у позаклітинних розчинах з різними концентраціями рН буфера [58]–[61].



**Рис. 1** - Потенційна роль ASICs у синаптичній передачі та її модуляції. НТ - нейротрансмітер (наприклад, глутамат або ГАМК); "Головний" рецептор - постсинаптичний рецептор (AMPA та NMDA-рецептори в глутаматергічному синапсі) [10]

**Роль ASICs у навчанні та поведінці.** ASICs експресуються в гіпокампі та мигдалині, структурах мозку, залучених до складної поведінки. Тому їхня активність може впливати на навчання, емоційну реактивність та інші форми поведінки. Декілька підходів використовуються для вивчення ролі ASICs у складній поведінці. Перший - це генетичні маніпуляції для створення тварин з або з глобально порушеним [62] або недокспресованим геном (генами), [63] або із зміненою експресією, обмеженою певними структурами мозку [58], [64]. Іншим підходом є гостре фармакологічне пригнічення або активація ASICs.

Участь ASICs у синаптичній пластичності лежить в основі їх регіонально-специфічного впливу на поведінкове навчання. ASICs (в основному ASIC1a) у нейронах стріатуму необхідні для моторного навчання [92]; у базолатеральній мигдалині – для умовного заморожування, пов'язаного зі страхом [65] ; у вентральному гіпокампі – для згасання такого страху [64] ; та в інсулі – для згасання огиди, пов'язаного зі смаком [66]. Крім того, ASIC1a бере участь у страху, пов'язаному з CO<sub>2</sub> (мигдалина) та інших формах вроджених реакцій страху (ліжкове ядро кінцевої смуги) [67]. В прилеглому ядрі ASICs змінюють адиктивну поведінку [68]. Наше розуміння ролі цих каналів у складній поведінці ще далеко від повноти та потребує подальших досліджень.

#### **1.1.4 Роль ASICs у патофізіологічних станах**

Ряд неврологічних захворювань супроводжується тривалим ацидозом, що виникає з кількох можливих причин, включаючи інсульт, ішемію, запалення та ін. [69]. Це призводить до ушкодження, спричинене ацидозом, яке зрештою може призвести до загибелі нейронів та погіршити перебіг хвороби. З'являється все більше доказів того, що ASICs опосередковують кислотно-індуковану токсичність у ЦНС та що інгібування ASICs надає захисну дію [69], [70].

Патологічна роль ASIC1a при інсульті добре відома та докладно розглянута [71]–[74]. Як уже згадувалося раніше, гомомірні канали ASIC1a проводять окрім  $\text{Na}^+$ , а ще й іони  $\text{Ca}^{2+}$ . Блокування каналів ASIC1a значно зменшує обсяг інфаркту, та потенційні нейропротекторні препарати, що ґрунтуються на цьому ефекті, матимуть тривале терапевтичне вікно.

Також ASICs сприяють виникненню патологічних станів, таких як епілепсія або психічні розлади, та корекцію цих станів [75]. ASIC1 є важливою мішенню для протисудомного фармакологічного втручання [76]. Експериментальні результати свідчать, що модулятори ASICs можуть покращити лікування пацієнтів із тривожними розладами та депресією [6]. Також з'являються дані, що вказують на те, що блокування ASICs може зменшити ризик розвитку хвороби Альцгеймера [77].

## **1.2 Сон як особливий функціональний стан нервової системи**

Визначення поняття "сон" досі викликає суперечки. Тим не менш, вважається, що це оборотний поведінковий стан, під час якого, сприйняття сенсорних стимулів, свідомість та активність добровільних м'язів залишаються приглушеними [78]. Електрофізіологічно цей стан загалом характеризується як дві стадії: сон без швидких рухів очей (NREM) та сон зі швидкими рухами очей (REM) [79]. Два різні стани сну були охарактеризовані тільки у наземних ссавців та птахів [80], і неясно, чому ці різні стани сну розвинулися лише у філогенетично просунутих тварин.

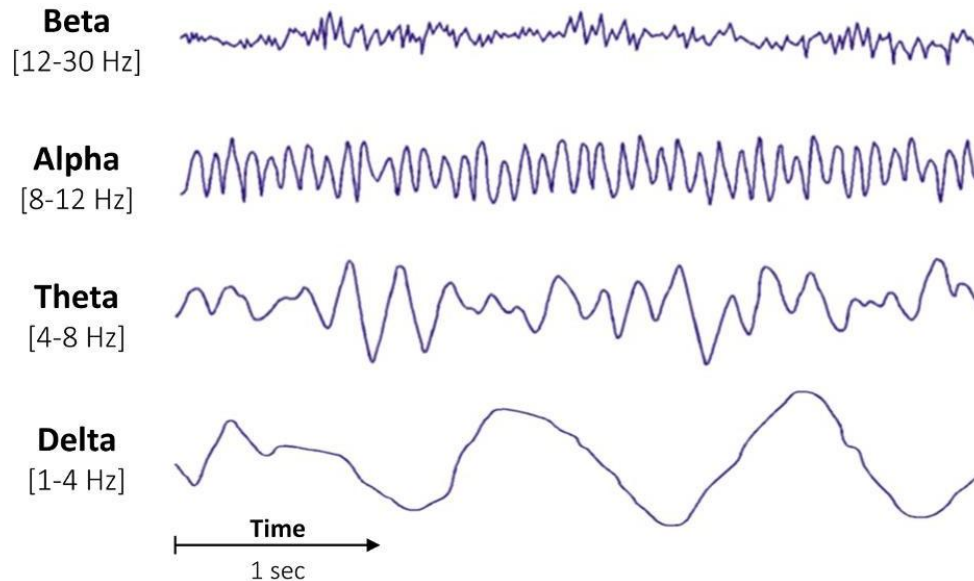
### 1.2.1 Фізіологічна роль сну

Хоча кілька досліджень показали, що з фізіологічного погляду сон є невід'ємною частиною системи, те, що сон робить із нашим мозком і тілом, досі не вивчено. Було висунуто кілька теорій щодо функцій сну – було запропоновано, що сон допомагає модулювати транскрипційні та трансляційні процеси на молекулярному рівні; синаптичну нейротрансмісію на субклітинному рівні; метаболічні процеси, детоксикацію, реституцію та проліферацію на клітинному рівні; терморегуляцію та нейро-імуно-ендокринну обробку інформації на фізіологічному рівні; стресові реакції та емоційні коливання на психологічному рівні; імунні та захисні реакції господаря на патологічному рівні; вагітність та лактація на репродуктивний рівень; зростання та хронометраж на рівні всього організму; та стратегія виживання на еволюційному рівні [80]–[85]. Наявні таким чином знання дозволяють вважати, що сон має багатовимірні функції.

Деякі сучасні дані свідчать про те, що сон може бути залучений до підтримки між- та внутрішньоклітинного мікросередовища. Сон може модулювати гомеостатичну регуляцію кислотно-основного балансу, біологічної буферної системи та іонного/електролітичного балансу. Раніше припускалося, що однією з основних функцій REM-сну може бути підтримання нормального рівня CO<sub>2</sub> в організмі під час сну [85]. Крім того, було виявлено, що помірне підвищення рівня CO<sub>2</sub> у навколишньому середовищі викликає NREM-сон [86]. Підвищений рівень CO<sub>2</sub> в організмі під час тривалої пильності може негативно змінювати клітинне іонне середовище. Тому необхідно, щоб рівень CO<sub>2</sub> залишався у фізіологічних межах, та сон може відігравати важливу роль у підтримці фізіологічного рівня CO<sub>2</sub> [85]. До того ж гіперкарбія супроводжується закисленням, яке може сприйматися ASICs. Була показана участь цих рецепторів блакитної плями у переключенні стадій сну [87].

## 1.2.2 Структура сну

Для докладнішого пояснення цих стадій корисно використовувати патерни мозкових хвиль, реєстровані апаратами ЕЕГ (Рис. 2). Під час неспання, у мозку спостерігаються альфа- та бета-активності. Альфа-активність складається із хвиль середньої частоти. Бета-активність складається з нерегулярних низькоамплітудних хвиль, які присутні, коли тварина дуже пильна і уважна. Коли тварина впадає в сонливість, мозок відчуває тета-активність. Це перехідна стадія між неспанням та сном. Наступна стадія сну містить нерегулярну тета-активність. Глибокий сон містить високоамплітудну дельта-активність від 20 до 50 відсотків часу. Через якийсь час після початку сну, коли тварина переходить у REM-сон, ЕЕГ-патерни стають дуже схожими на ті, що були отримані під час першої стадії сну.



**Рис. 2** - Мозкові хвилі зареєстровані ЕЕГ

Під час REM сну мозкові хвилі показують тета-активність, яка дуже десинхронізована (десинхронізована означає нерегульована, наприклад, спроба слухати кілька розмов одночасно). Цю стадію також називають парадоксальним сном, оскільки активність мозку під час REM можна порівняти з активністю під час неспанья. REM триває близько 20-30 хвилин у людей.

Хоча під час REM вся нервова система стає дуже активною, такі рухи, як ходьба та розмова відсутні, оскільки м'язи стають атонічними або паралізованими. Це пов'язано з функцією "локомоторного центру", що виробляє параліч у довільних м'язах. Якщо ця область зруйнована, тварина рухатиметься під час REM-сну [88]

Крім змін у структурі мозкових хвиль, хімічні речовини мозку також коливаються під час сну. Два основних нейромедіатори, що беруть участь у процесі сну, - це серотонін та норепінефрін. На початку сну виділяється серотонін, який збільшує NREM. Секреція норадреналіну відбувається під час REM, що призводить до збільшення REM. Вважається, що коливання між стадіями сну пов'язані із секрецією цих двох нейротрансмітерів [88]. Примітно, що успішне лікування депресії полягає у пробудженні пацієнта на початку REM-сну. Це регулює дисбаланс норадреналіну та серотоніну, полегшуючи симптоми депресії [89]. Однак додаткові дані про депривацію REM-сну свідчать про підвищення агресивності, яка зберігається після припинення депривації REM-сну [90]

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

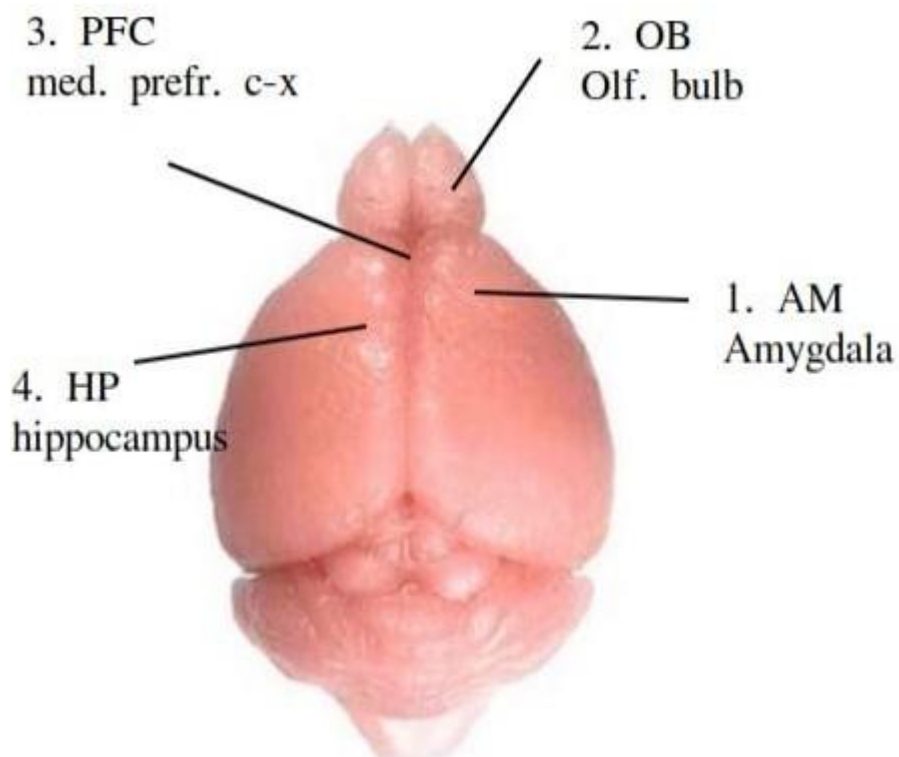
#### 2.1. Лінії щурів та отримання електричної активності мозку

Хірургічну операцію та запис електричної активності було здійснено к.б.н. Федорюком М. П. під керівництвом к.б.н. Чернінського А. О. Нашим завданням був аналіз отриманих записів.

Для експерименту були взяті щури лінії Wistar віком 6 місяців. Тварин утримували в приміщенні із контрольованими температурою та циклом освітлення (22°C, світла фаза починалася о 20:00 і тривала 12 год), їжа і вода були доступні *ad libitum*. Реєстрацію електричної активності здійснювали між 9:00 та 18:00. Досліди проводилися згідно з існуючими міжнародними та національними нормативними актами щодо використання піддослідних тварин, зокрема Конвенції Ради Європи від 18.03.1986 та Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV.

Хірургічну операцію здійснювали під загальним наркозом, який робили за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції анестетику (суміші кетаміну та ксилазину 80 та 8 мг/кг відповідно). Електроди імплантували через просвердлений отвір у лівий гіпокамп (А -3.5, L -1.8, Н -2.9 від брегми), область правої нюхової цибулини (А 6.7, L 1.5, Н -3), префронтальну кору (А 3, L -0.5, Н -4) та мигдалеподібне тіло (А -2.6, L 4.8, Н -8.5) (Рис.2.1). Референтний електрод розташовували у мозочку. Кінці електродів виводили приблизно на 10 мм від поверхні черепа та під'єднували до масиву контактів. Фіксацію електродів та контактів проводили спеціальним полімером (протакрилом-М, «СТОМА», Харків, Україна), який у стоматології використовується для виготовлення зубних

протезів. Краї розрізу шкіри голови зашивали шовковою ниткою або склеювали медичним клеєм Бф-6 (ВАТ «Лубнифарм», Лубни, Україна).



**Рис. 2.1** - Місця під'єднання електродів на поверхні мозку щура

Мозкова активність була за допомогою бездротового пристрою NeuroLogger («NewBehavior AG», Zurich, Switzerland). Даний прилад кріпиться на голові піддослідної тварини та дозволяє реєструвати дані за чотирма каналами одночасно. Він є автономним, тобто під час своєї роботи не потребує дротового підключення до додаткової апаратури, що дає можливість тваринам вільно рухатися на аренах для поведінкових тестів та в їхніх клітках. Частота реєстрації електричної активності для даного пристрою складає 489 вимірювань за секунду. Крім запису електричної активності мозку, апарат фіксував рухи миші за допомогою вбудованого акселерометра. Запис тривав 8 годин.

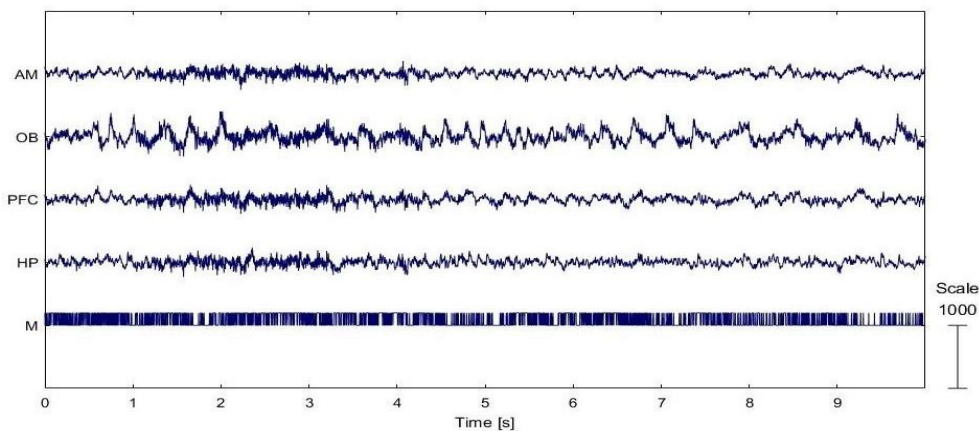
Тварин розділили на дві групи: контрольну та дослідну. Тварин останньої піддавали дії антагоніста ASIC1a каналів. Пригнічення активності цих каналів досягалося за допомогою внутрішньоочеревинного введення 10 мкмоль/кг сполуки 5b (2-окси-2H-хромен-3-карбоксимідин), високоселективного інгібітору ASIC1a, розробленого за допомогою методу молекулярного моделювання Інститутом Фізіології ім. О.О. Богомольця у співпраці з Інститутом органічної хімії НАН України [91]. На початку експерименту всі тварини знаходилися в домашній клітці. Після приєднання Neurologger дослідну тварину повертали назад у клітку. Через 2-3 години після цього вводили ін'єкцію або фізіологічного розчину або 5b, в залежності від групи, і знову їх поміщали до домашньої клітки.

Всього було протестовано 21 тварину, проте повноцінний тривалий запис виявився доступним лише для двох — однієї контрольної та однієї під дією блокатору.

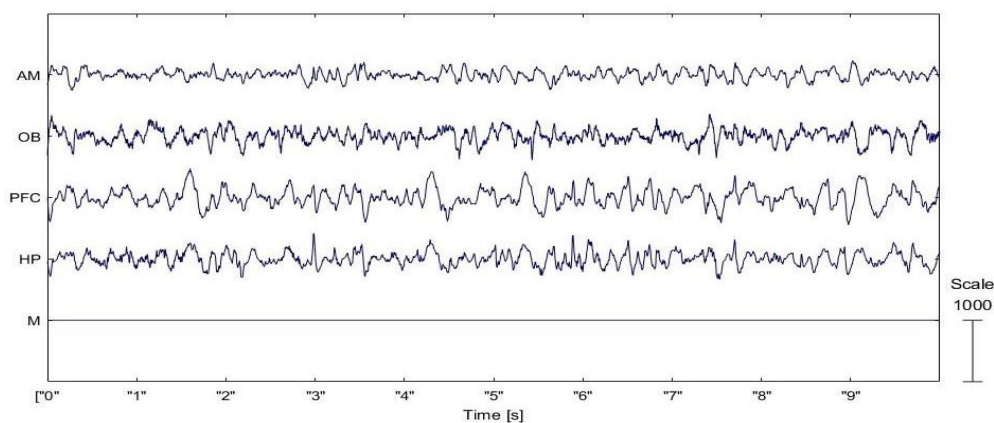
## **2.2 Класифікація функціонального стану тварин на основі ЕЕГ-записів**

Аналіз отриманих ЕЕГ-записів проводився в офлайн-режимі з використанням напівавтоматичної процедури відсіювання артефактів. Артефакти визначалися на підставі перевищення порогових значень амплітуди. Оскільки загальновідомо, що електрична активність головного мозку істотно різниться під час сну і неспанья, першим завданням аналізу була класифікація функціональних станів піддослідних тварин на етапи неспанья, повільного та швидкого сну (далі - Wake, SWS та REM відповідно). Критеріями для визначення етапу були частота та амплітуда хвиль, а також наявність чи відсутність рухової активності. Епохи з низькою потужністю дельта-хвиль (1-4 Гц), високою потужністю бета-хвиль (13-40 Гц) та високою руховою активністю були

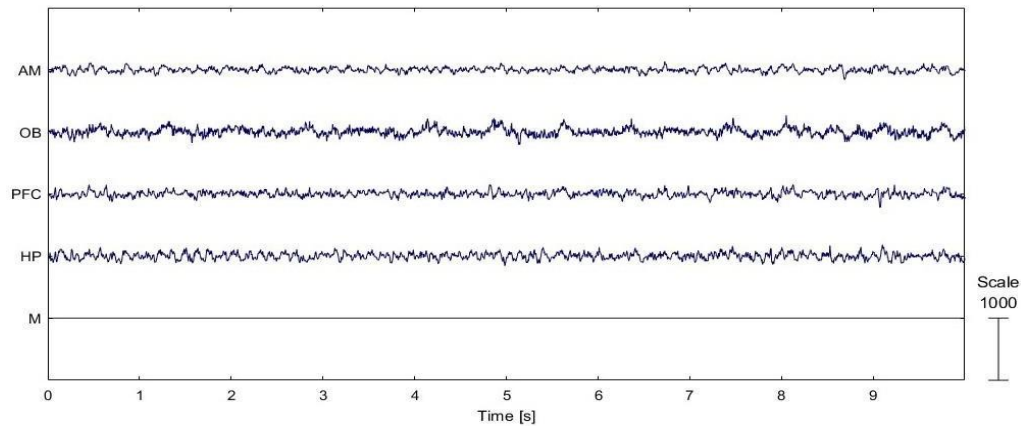
класифіковані як етапи неспання (Wake, рис. 2.2). Епохи, що характеризувалися високою потужністю дельта-хвиль (1 - 4 Гц) та низькою руховою активністю, були класифіковані як довгохвильовий сон (SWS, рис. 2.3). Епохи з низькою потужністю дельта-хвиль, вираженим тета-ритмом (4-10 Гц) та низькою руховою активністю були класифіковані як REM-сон (рис. 2.4)



**Рис. 2.2** - Типова для стану неспання ЕЕГ, добре виражені бета-хвилі, наявна рухова активність. Тут і далі: АМ – мигдалевидне тіло, ОВ – нюхова цибулина, PFC – префронтальна кора, HP – гіпокамп, М – рухова активність



**Рис. 2.3** - Типова для повільнохвильового сну ЕЕГ, виражені дельта-хвилі та відсутня рухова активність



**Рис. 2.4** - Типова для швидкого сну ЕЕГ, дельта-хвилі виражені слабо, домінує тета-ритм, рухова активність відсутня

Всього було опрацьовано 21 запис, але достатньої якості виявились тільки два записи. Зрозуміло що результати не можуть бути статистично опрацьованими, але, тим не менш, це цікаві попередні результати.

Визначення спектральної потужності у тварин було здійснено для частот в діапазоні від 1 до 245 Гц, підрахунок потужностей здійснювався в автоматичному режимі у програмі Matlab (MathWorks, Inc, v.R2022a) за алгоритмом швидкого перетворення Фур'є, реалізованого у функції `pwelch()`. Вікно аналізу становило 10 с. Для попередньої оцінки відмінностей між контрольними і дослідними тваринами було побудовано спектрограми. Сумарна спектральна потужність визначалась у таких частотних діапазонах: дельта ( $\delta$ , 0.5 – 4 Гц), тета ( $\theta$ , 4.5 – 7.5 Гц), альфа ( $\alpha$ , 8 – 13 Гц), бета ( $\beta$ , 13 – 30 Гц) і гамма ( $\gamma$ , 30 – 100 Гц).

## РОЗДІЛ 3

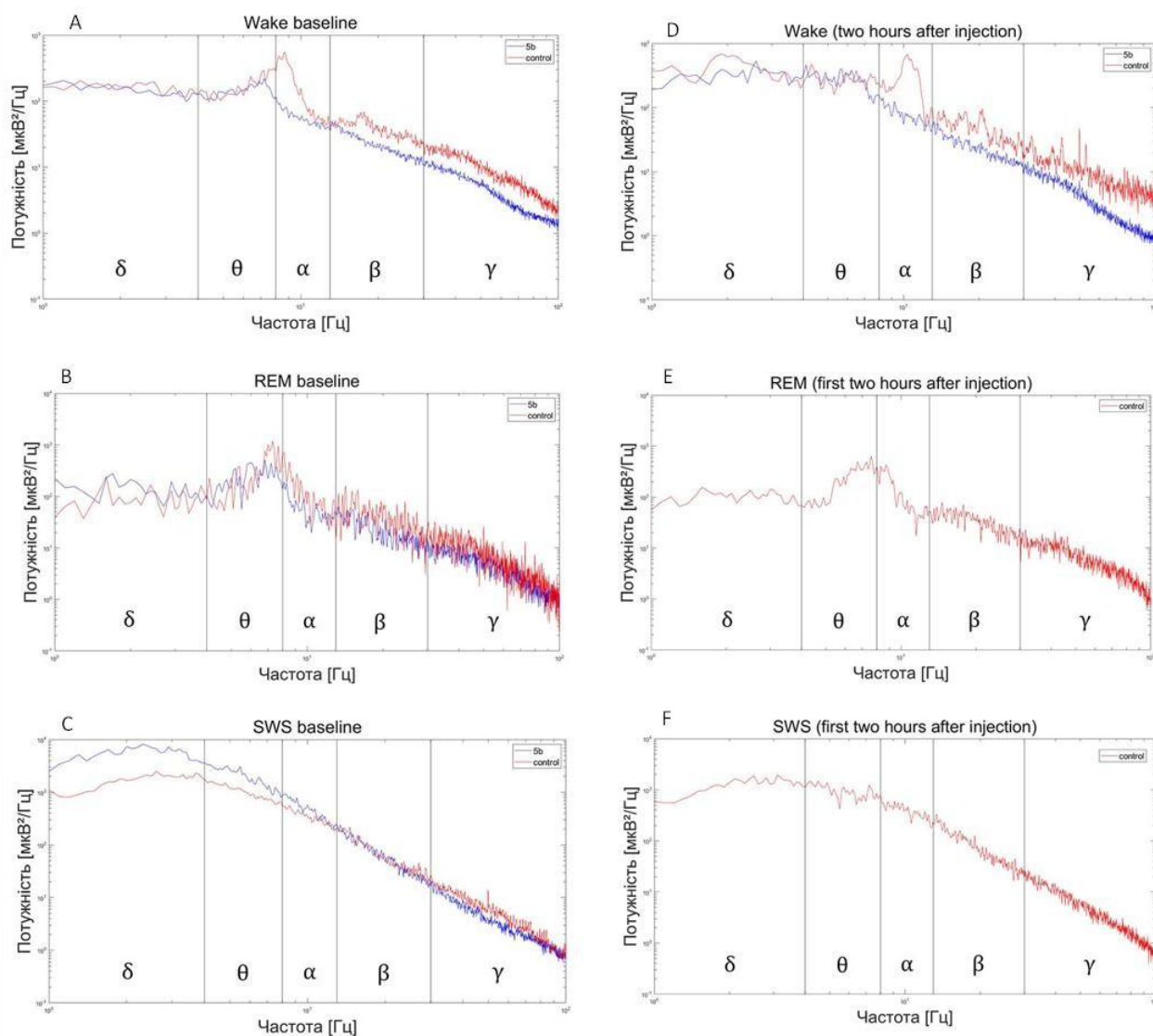
### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Аналіз спектральної потужності ЕЕГ

Було проаналізовано відмінності у спектральній потужності ЕЕГ щурів, які піддались фармакологічній блокаді ASICs порівняно з контрольними тваринами за описаними в методиці стандартними частотними діапазонами (на рисунках показані як  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ ). Всього було отримано 36 спектрограм: 9 з гіпокампального електроду (четвертей канал), 9 з електроду розташованого в нюховій цибулині (другий канал), 9 з префронтального електроду (третій канал) та 9 з електроду, який приймав сигнали з мигдалеподібного тіла (перший канал).

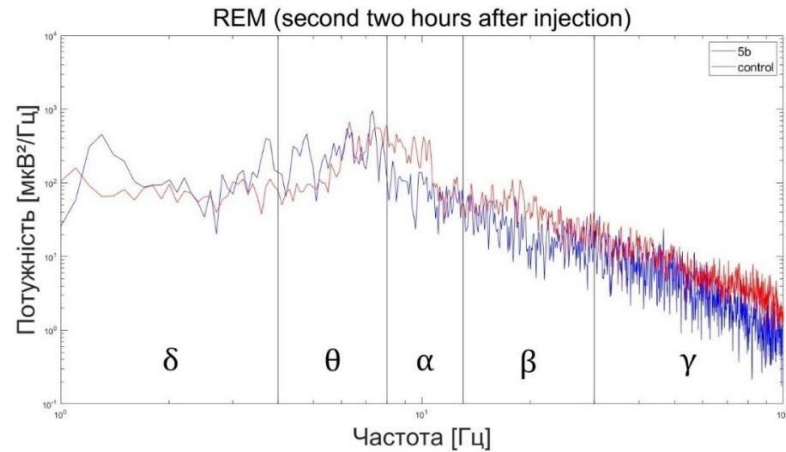
Відповідно до результатів аналізу найбільше відкриття полягало у повній відсутності сну у щурів в перші дві години після введення 5b (Рис.3.1), на відміну від контрольної групи, у якої за цей час зареєстровано як SWS-, так і REM-фази сну. Це спостереження видно на спектрограмах усіх чотирьох каналів (Додатки А, Б, В, Г).

Друге спостереження унікальне для гіпокампальній спектрограмі – продемонстровано що співвідношення між тета-ритмами та альфа-ритмами у контрольного щура приблизно 1:1 в той час як у дослідного щура спостерігається значна домінація тета-ритмів над альфа-ритмами (Рис.3.2). На трьох інших каналах зберігається однакова тенденція на спектрограмах «Wake (second two hours after injection)», а саме різкий спад на межі тета-ритму та альфа-ритму, який, втім, аналогічний «Wake baseline».



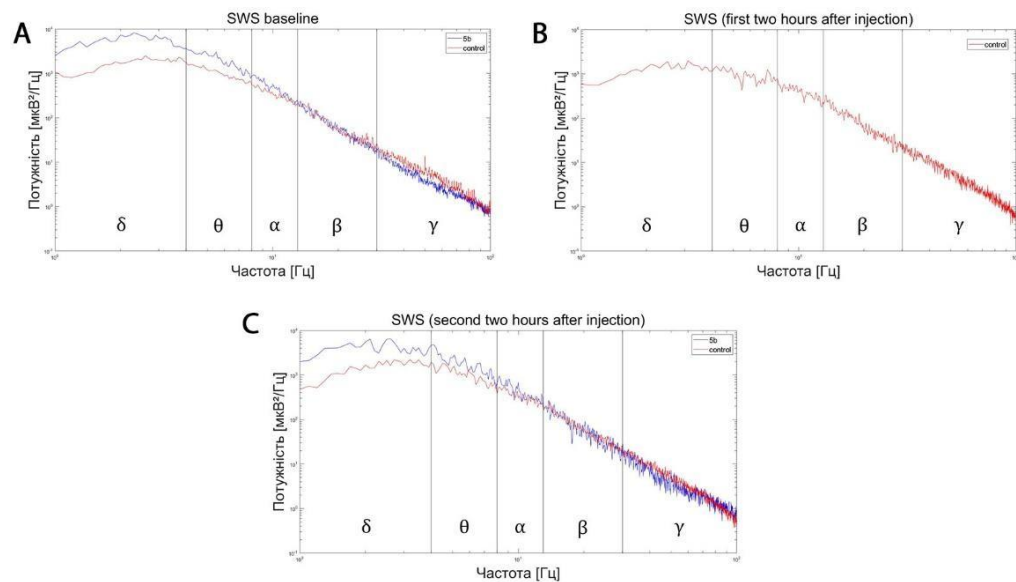
**Рис 3.1** — Спектрограми гіпокампальних ЕЕГ-сигналів у стану неспаня (Wake), швидкого (REM) та повільного (SWS) у baseline (A, B, C) протягом перших двох годин після ін'єкції (D, E, F) у контрольного (червона лінія) та дослідного (з 5b, синя лінія) щурів

Також видно збільшення потужності окремих частот і в дельта-діапазоні. В той час як домінантні частоти для дельта- та тета-хвиль в REM baseline мають потужність 278 мкВ<sup>2</sup> та 514 мкВ<sup>2</sup> відповідно, в REM (two second hours after injection) домінантні частоти досягають 465 мкВ<sup>2</sup> для дельта-ритму та 949 мкВ<sup>2</sup> для тета-ритму.



**Рис. 3.2** — Спектрограми гіпокампальних ЕЕГ-сигналів у стані швидкого сну (REM) протягом других двох годин після ін'єкції у контрольного (червона лінія) та дослідного (з 5b, синя лінія) щурів

Під час SWS ритми до ін'єкції та не третю-четверту годину після у обох групах суттєво не відрізняються (Рис 3.3).



**Рис 3.3** — Спектрограми гіпокампальних ЕЕГ-сигналів у стані повільного сну (SWS): (А) до ін'єкції, (Б) протягом перших двох годин після ін'єкції, (С) протягом других двох годин після ін'єкції у контрольного (червона лінія) та дослідного (з 5b, синя лінія) щурів.

## 4.2 Обговорення результатів

Перш за все – результати спектральних діаграм гіпокампальних частот не збігаються з результатами минулого дослідження впливу 5b на електрофізіологічну активність мозку щурів. У роботі Fedoriuk et al. була показана залежність коливань тета-ритмів від фармакологічної блокади ASICs, а саме зниження потужності тета-хвиль у дослідної групи [5]. Але такий результат вони спостерігали під час стадії неспання, тоді як в даному випадку збільшення потужності тета-ритму, а також дельта-ритму, ми спостерігаємо під час REM стадії в області гіпокампу. В усіх випадках для розуміння даного факту потрібно продовжувати дослідження з блокадою та активацією протон-чутливих іонних каналів.

По-друге пояснення відсутності сну у дослідної групи перші дві години теж представляється непротим. Підвищення потужності тета-ритму означає що тварина наближається до легкого сну, так як ці хвилі спостерігається у мозку в стані релаксації, дрімання [78].

## ВИСНОВКИ

1. Фармакологічна інактивація протончутливих іонних каналів супроводжується відсутністю сну протягом перших двох годин після ін'єкції.
2. Впродовж наступного часу спостерігається збільшення потужності тета-ритму під час REM, без відмін у спектрі під час повільного сну.
3. Отримані попередні дані вказують на перспективність дослідження впливу фармакологічної блокади протон-чутливих іонних каналів на структуру сну гризунів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] A. S. Hill and Y. Ben-Shahar, “The synaptic action of Degenerin/Epithelial sodium channels,” *Channels*, vol. 12, no. 1, pp. 262–275, Jan. 2018, doi: 10.1080/19336950.2018.1495006.
- [2] O. A. Krishtal and V. I. Pidoplichko, “A receptor for protons in the nerve cell membrane.,” *Neuroscience*, vol. 5, no. 12, pp. 2325–7, 1980, doi: 10.1016/0306-4522(80)90149-9.
- [3] O. Krishtal, “Receptor for protons: First observations on Acid Sensing Ion Channels.,” *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 4–8, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.014.
- [4] M. L. Rook, M. Musgaard, and D. M. MacLean, “Coupling structure with function in acid-sensing ion channels: challenges in pursuit of proton sensors,” *The Journal of Physiology*, vol. 599, no. 2, pp. 417–430, Jan. 2021, doi: 10.1113/JP278707.
- [5] M. P. Fedoriuk *et al.*, “INHIBITION OF BRAIN ASICs AFFECTS HIPPOCAMPAL THETA-RHYTHM AND OPENFIELD BEHAVIOR IN RATS,” *Fiziolohichnyi zhurnal*, vol. 65, no. 1, pp. 15–19, Feb. 2019, doi: 10.15407/fz65.01.015.
- [6] V. I. Pidoplichko *et al.*, “ASIC1a activation enhances inhibition in the basolateral amygdala and reduces anxiety.,” *J Neurosci*, vol. 34, no. 9, pp. 3130–41, Feb. 2014, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4009-13.2014.
- [7] F. Yang *et al.*, “Astrocytic Acid-Sensing Ion Channel 1a Contributes to the Development of Chronic Epileptogenesis.,” *Sci Rep*, vol. 6, p. 31581, 2016, doi: 10.1038/srep31581.
- [8] S. Vullo and S. Kellenberger, “A molecular view of the function and pharmacology of acid-sensing ion channels,” *Pharmacological Research*, vol. 154. Academic Press, Apr. 01, 2020. doi: 10.1016/j.phrs.2019.02.005.
- [9] O. D. Uchitel, C. González Inchauspe, and C. Weissmann, “Synaptic signals mediated by protons and acid-sensing ion channels,” *Synapse*, vol. 73, no. 10. John Wiley and Sons Inc, Oct. 01, 2019. doi: 10.1002/syn.22120.
- [10] M. Storozhuk, A. Cherninskyi, O. Maximyuk, D. Isaev, and O. Krishtal, “Acid-Sensing Ion Channels: Focus on Physiological and Some Pathological Roles in the Brain,” *Current Neuropharmacology*, vol. 19, no. 9, pp. 1570–1589, Sep. 2021, doi: 10.2174/1570159X19666210125151824.
- [11] R. Waldmann, G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux, and M. Lazdunski, “A proton-gated cation channel involved in acid-sensing.,” *Nature*, vol. 386, no. 6621, pp. 173–7, Mar. 1997, doi: 10.1038/386173a0.

- [12] X. Zha, “Acid-sensing ion channels: trafficking and synaptic function.,” *Mol Brain*, vol. 6, p. 1, Jan. 2013, doi: 10.1186/1756-6606-6-1.
- [13] S.-H. Lin, W.-H. Sun, and C.-C. Chen, “Genetic exploration of the role of acid-sensing ion channels.,” *Neuropharmacology*, vol. 94, pp. 99–118, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.011.
- [14] S. Kellenberger and L. Schild, “International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na<sup>+</sup> channel.,” *Pharmacol Rev*, vol. 67, no. 1, pp. 1–35, 2015, doi: 10.1124/pr.114.009225.
- [15] M. P. Price, P. M. Snyder, and M. J. Welsh, “Cloning and expression of a novel human brain Na<sup>+</sup> channel.,” *J Biol Chem*, vol. 271, no. 14, pp. 7879–82, Apr. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.14.7879.
- [16] J. García-Añoveros, B. Derfler, J. Neville-Golden, B. T. Hyman, and D. P. Corey, “BNC1 and BNC2 constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no. 4, pp. 1459–64, Feb. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.4.1459.
- [17] R. Waldmann, G. Champigny, N. Voilley, I. Lauritzen, and M. Lazdunski, “The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*.,” *J Biol Chem*, vol. 271, no. 18, pp. 10433–6, May 1996, doi: 10.1074/jbc.271.18.10433.
- [18] M. P. Price *et al.*, “The mammalian sodium channel BNC1 is required for normal touch sensation.,” *Nature*, vol. 407, no. 6807, pp. 1007–11, Oct. 2000, doi: 10.1038/35039512.
- [19] D. Alvarez de la Rosa, P. Zhang, D. Shao, F. White, and C. M. Canessa, “Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, no. 4, pp. 2326–31, Feb. 2002, doi: 10.1073/pnas.042688199.
- [20] X. Y. Wang, W. W. Yan, X. L. Zhang, H. Liu, and L. C. Zhang, “ASIC3 in the cerebrospinal fluid-contacting nucleus of brain parenchyma contributes to inflammatory pain in rats.,” *Neurol Res*, vol. 36, no. 3, pp. 270–5, Mar. 2014, doi: 10.1179/1743132813Y.0000000297.
- [21] Q.-Y. Meng, W. Wang, X.-N. Chen, T.-L. Xu, and J.-N. Zhou, “Distribution of acid-sensing ion channel 3 in the rat hypothalamus.,” *Neuroscience*, vol. 159, no. 3, pp. 1126–34, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.069.

- [22] J. A. Wemmie, C. C. Askwith, E. Lamani, M. D. Cassell, J. H. Freeman, and M. J. Welsh, "Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning.," *J Neurosci*, vol. 23, no. 13, pp. 5496–502, Jul. 2003.
- [23] D. Alvarez de la Rosa, S. R. Krueger, A. Kolar, D. Shao, R. M. Fitzsimonds, and C. M. Canessa, "Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system.," *J Physiol*, vol. 546, no. Pt 1, pp. 77–87, Jan. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2002.030692.
- [24] C. C. Askwith, J. A. Wemmie, M. P. Price, T. Rokhlina, and M. J. Welsh, "Acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) modulates ASIC1 H<sup>+</sup>-activated currents in hippocampal neurons.," *J Biol Chem*, vol. 279, no. 18, pp. 18296–305, Apr. 2004, doi: 10.1074/jbc.M312145200.
- [25] A. N. Akopian, C. C. Chen, Y. Ding, P. Cesare, and J. N. Wood, "A new member of the acid-sensing ion channel family.," *Neuroreport*, vol. 11, no. 10, pp. 2217–22, Jul. 2000, doi: 10.1097/00001756-200007140-00031.
- [26] H. Sakai, E. Lingueglia, G. Champigny, M. G. Mattei, and M. Lazdunski, "Cloning and functional expression of a novel degenerin-like Na<sup>+</sup> channel gene in mammals.," *J Physiol*, vol. 519 Pt 2, pp. 323–33, Sep. 1999, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0323m.x.
- [27] L. Schaefer, H. Sakai, M. Mattei, M. Lazdunski, and E. Lingueglia, "Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of an amiloride-sensitive Na<sup>(+)</sup> channel from human small intestine.," *FEBS Lett*, vol. 471, no. 2–3, pp. 205–10, Apr. 2000, doi: 10.1016/s0014-5793(00)01403-4.
- [28] M. P. Price *et al.*, "Localization and behaviors in null mice suggest that ASIC1 and ASIC2 modulate responses to aversive stimuli.," *Genes Brain Behav*, vol. 13, no. 2, pp. 179–94, Feb. 2014, doi: 10.1111/gbb.12108.
- [29] S. Ugawa *et al.*, "Cloning and functional expression of ASIC-beta2, a splice variant of ASIC-beta.," *Neuroreport*, vol. 12, no. 13, pp. 2865–9, Sep. 2001, doi: 10.1097/00001756-200109170-00022.
- [30] D. H. Feldman *et al.*, "Characterization of acid-sensing ion channel expression in oligodendrocyte-lineage cells.," *Glia*, vol. 56, no. 11, pp. 1238–49, Aug. 2008, doi: 10.1002/glia.20693.
- [31] Y.-C. Lin, Y.-C. Liu, Y.-Y. Huang, and C.-C. Lien, "High-density expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable ASIC1a channels in NG2 glia of rat hippocampus.," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, Sep. 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0012665.

- [32] X.-W. Yu *et al.*, “Acid-sensing ion channels promote the inflammation and migration of cultured rat microglia.,” *Glia*, vol. 63, no. 3, pp. 483–96, Mar. 2015, doi: 10.1002/glia.22766.
- [33] C. Huang *et al.*, “Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes.,” *Glia*, vol. 58, no. 12, pp. 1415–24, Sep. 2010, doi: 10.1002/glia.21017.
- [34] Y. Tian, P. Bresenitz, A. Reska, L. el Moussaoui, C. P. Beier, and S. Gründer, “Glioblastoma cancer stem cell lines express functional acid sensing ion channels ASIC1a and ASIC3.,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 13674, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13666-9.
- [35] S. C. Grifoni, N. L. Jernigan, G. Hamilton, and H. A. Drummond, “ASIC proteins regulate smooth muscle cell migration.,” *Microvasc Res*, vol. 75, no. 2, pp. 202–10, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.mvr.2007.08.003.
- [36] M. A. Friese *et al.*, “Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system.,” *Nat Med*, vol. 13, no. 12, pp. 1483–9, Dec. 2007, doi: 10.1038/nm1668.
- [37] L. Ni *et al.*, “Identification and Function of Acid-sensing Ion Channels in RAW 264.7 Macrophage Cells.,” *Curr Med Sci*, vol. 38, no. 3, pp. 436–442, Jun. 2018, doi: 10.1007/s11596-018-1897-y.
- [38] C.-H. Lee and C.-C. Chen, “Roles of ASICs in Nociception and Proprioception.,” *Adv Exp Med Biol*, vol. 1099, pp. 37–47, doi: 10.1007/978-981-13-1756-9\_4.
- [39] M. D. Carattino and N. Montalbetti, “Acid-sensing ion channels in sensory signaling.,” *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 318, no. 3, pp. F531–F543, 2020, doi: 10.1152/ajprenal.00546.2019.
- [40] A. S. Chauhan, G. C. Sahoo, M. R. Dikhit, and P. Das, “Acid-Sensing Ion Channels Structural Aspects, Pathophysiological Importance and Experimental Mutational Data Available Across Various Species to Target Human ASIC1.,” *Curr Drug Targets*, vol. 20, no. 1, pp. 111–121, 2019, doi: 10.2174/1389450119666180820103316.
- [41] M. L. Rook, M. Musgaard, and D. M. MacLean, “Coupling structure with function in acid-sensing ion channels: challenges in pursuit of proton sensors.,” *J Physiol*, vol. 599, no. 2, pp. 417–430, 2021, doi: 10.1113/JP278707.
- [42] L. A. Pattison, G. Callejo, and E. St John Smith, “Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid.,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 374, no. 1785, p. 20190291, 2019, doi: 10.1098/rstb.2019.0291.

- [43] A. O. Korkushko and O. A. Kryshchal', "[Blocking of proton-activated sodium permeability of the membranes of trigeminal ganglion neurons in the rat by organic cations].," *Neirofiziologiya = Neurophysiology*, vol. 16, no. 4, pp. 557–61, 1984.
- [44] P. Escoubas *et al.*, "Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na<sup>+</sup> channels.," *J Biol Chem*, vol. 275, no. 33, pp. 25116–21, Aug. 2000, doi: 10.1074/jbc.M003643200.
- [45] N. J. Allen and D. Attwell, "Modulation of ASIC channels in rat cerebellar Purkinje neurons by ischaemia-related signals.," *J Physiol*, vol. 543, no. Pt 2, pp. 521–9, Sep. 2002, doi: 10.1113/jphysiol.2002.020297.
- [46] B. Duan *et al.*, "Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis.," *J Neurosci*, vol. 31, no. 6, pp. 2101–12, Feb. 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4351-10.2011.
- [47] T. W. Sherwood and C. C. Askwith, "Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death.," *J Neurosci*, vol. 29, no. 45, pp. 14371–80, Nov. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2186-09.2009.
- [48] E. I. Nagaeva, T. B. Tikhonova, L. G. Magazanik, and D. B. Tikhonov, "Histamine selectively potentiates acid-sensing ion channel 1a," *Neuroscience Letters*, vol. 632, pp. 136–140, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.047.
- [49] S. Diochot *et al.*, "Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain.," *Nature*, vol. 490, no. 7421, pp. 552–5, Oct. 2012, doi: 10.1038/nature11494.
- [50] A. Buta *et al.*, "Novel Potent Orthosteric Antagonist of ASIC1a Prevents NMDAR-Dependent LTP Induction.," *J Med Chem*, vol. 58, no. 11, pp. 4449–61, Jun. 2015, doi: 10.1021/jm5017329.
- [51] Y. Yu *et al.*, "A nonproton ligand sensor in the acid-sensing ion channel," *Neuron*, vol. 68, no. 1, pp. 61–72, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.001.
- [52] O. Alijevic and S. Kellenberger, "Subtype-specific Modulation of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) Function by 2-Guanidine-4-methylquinazoline," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 43, pp. 36059–36070, Oct. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.360487.
- [53] V. I. Pidoplichko and J. A. Dani, "Acid-sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 30, pp. 11376–11380, Jul. 2006, doi: 10.1073/pnas.0600768103.

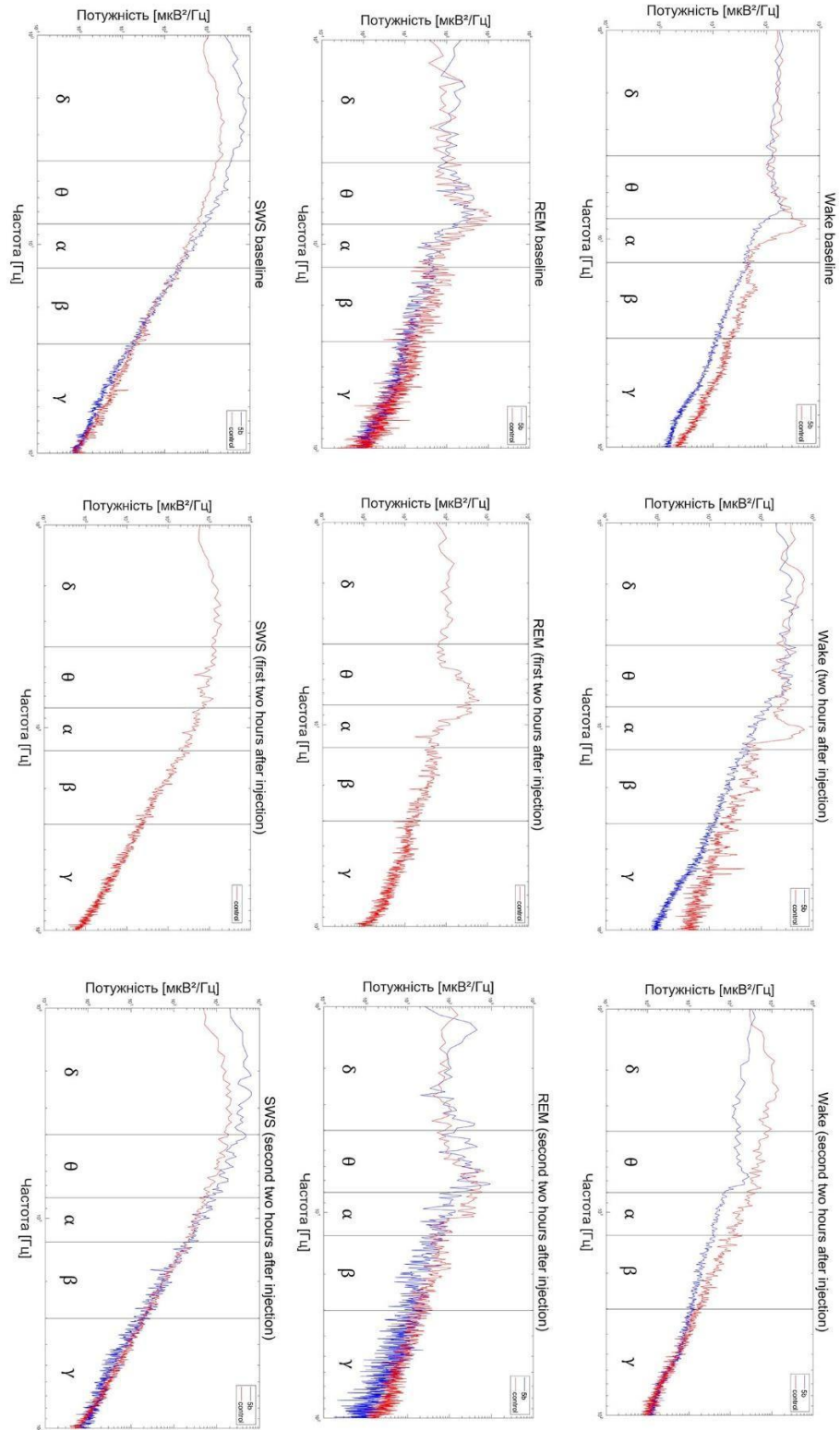
- [54] O. D. Uchitel, C. González Inchauspe, and C. Weissmann, “Synaptic signals mediated by protons and acid-sensing ion channels.,” *Synapse*, vol. 73, no. 10, p. e22120, 2019, doi: 10.1002/syn.22120.
- [55] K. v Bolshakov *et al.*, “Characterization of acid-sensitive ion channels in freshly isolated rat brain neurons.,” *Neuroscience*, vol. 110, no. 4, pp. 723–30, 2002, doi: 10.1016/s0306-4522(01)00582-6.
- [56] O. Alijevic, O. Bignucolo, E. Hichri, Z. Peng, J. P. Kucera, and S. Kellenberger, “Slowing of the Time Course of Acidification Decreases the Acid-Sensing Ion Channel 1a Current Amplitude and Modulates Action Potential Firing in Neurons.,” *Front Cell Neurosci*, vol. 14, p. 41, 2020, doi: 10.3389/fncel.2020.00041.
- [57] M. J. Palmer, C. Hull, J. Vigh, and H. von Gersdorff, “Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells.,” *J Neurosci*, vol. 23, no. 36, pp. 11332–41, Dec. 2003.
- [58] C. J. Kreple *et al.*, “Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity.,” *Nat Neurosci*, vol. 17, no. 8, pp. 1083–91, Aug. 2014, doi: 10.1038/nn.3750.
- [59] J. Du *et al.*, “Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 111, no. 24, pp. 8961–6, Jun. 2014, doi: 10.1073/pnas.1407018111.
- [60] C. González-Inchauspe, F. J. Urbano, M. N. di Guilmi, and O. D. Uchitel, “Acid-Sensing Ion Channels Activated by Evoked Released Protons Modulate Synaptic Transmission at the Mouse Calyx of Held Synapse.,” *J Neurosci*, vol. 37, no. 10, pp. 2589–2599, 2017, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2566-16.2017.
- [61] M. Storozhuk, E. Kondratskaya, L. Nikolaenko, and O. Krishtal, “A modulatory role of ASICs on GABAergic synapses in rat hippocampal cell cultures.,” *Mol Brain*, vol. 9, no. 1, p. 90, 2016, doi: 10.1186/s13041-016-0269-4.
- [62] J. A. Wemmie *et al.*, “The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory.,” *Neuron*, vol. 34, no. 3, pp. 463–77, Apr. 2002, doi: 10.1016/s0896-6273(02)00661-x.
- [63] J. A. Wemmie *et al.*, “Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no. 10, pp. 3621–6, Mar. 2004, doi: 10.1073/pnas.0308753101.

- [64] M. W. Coryell *et al.*, “Restoring Acid-sensing ion channel-1a in the amygdala of knock-out mice rescues fear memory but not unconditioned fear responses.,” *J Neurosci*, vol. 28, no. 51, pp. 13738–41, Dec. 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3907-08.2008.
- [65] M. W. Coryell *et al.*, “Targeting ASIC1a reduces innate fear and alters neuronal activity in the fear circuit.,” *Biol Psychiatry*, vol. 62, no. 10, pp. 1140–8, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.biopsych.2007.05.008.
- [66] H. Kayyal, A. Yiannakas, S. Kolatt Chandran, M. Khamaisy, V. Sharma, and K. Rosenblum, “Activity of Insula to Basolateral Amygdala Projecting Neurons is Necessary and Sufficient for Taste Valence Representation.,” *J Neurosci*, vol. 39, no. 47, pp. 9369–9382, 2019, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0752-19.2019.
- [67] A. E. Ziemann *et al.*, “The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior.,” *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 1012–21, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.10.029.
- [68] Q. Jiang, C. M. Wang, E. E. Fibuch, J. Q. Wang, and X.-P. Chu, “Differential regulation of locomotor activity to acute and chronic cocaine administration by acid-sensing ion channel 1a and 2 in adult mice.,” *Neuroscience*, vol. 246, pp. 170–8, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.059.
- [69] J. A. Wemmie, R. J. Taugher, and C. J. Kreple, “Acid-sensing ion channels in pain and disease.,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 14, no. 7, pp. 461–71, Jul. 2013, doi: 10.1038/nrn3529.
- [70] L. D. Rash, “Acid-Sensing Ion Channel Pharmacology, Past, Present, and Future . . . .,” *Adv Pharmacol*, vol. 79, pp. 35–66, 2017, doi: 10.1016/bs.apha.2017.02.001.
- [71] Z.-G. Xiong, X.-P. Chu, and R. P. Simon, “Ca<sup>2+</sup>-permeable acid-sensing ion channels and ischemic brain injury.,” *J Membr Biol*, vol. 209, no. 1, pp. 59–68, Jan. 2006, doi: 10.1007/s00232-005-0840-x.
- [72] Z.-G. Xiong, X.-P. Chu, and R. P. Simon, “Acid sensing ion channels--novel therapeutic targets for ischemic brain injury.,” *Front Biosci*, vol. 12, pp. 1376–86, Jan. 2007, doi: 10.2741/2154.
- [73] Z. O’Bryant, K. T. Vann, and Z.-G. Xiong, “Translational strategies for neuroprotection in ischemic stroke--focusing on acid-sensing ion channel 1a.,” *Transl Stroke Res*, vol. 5, no. 1, pp. 59–68, Feb. 2014, doi: 10.1007/s12975-013-0319-5.
- [74] W.-Z. Zeng, D.-S. Liu, and T.-L. Xu, “Acid-sensing ion channels: trafficking and pathophysiology.,” *Channels (Austin)*, vol. 8, no. 6, pp. 481–7, 2014, doi: 10.4161/19336950.2014.958382.

- [75] Z.-G. Xiong, G. Pignataro, M. Li, S. Chang, and R. P. Simon, "Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases.," *Curr Opin Pharmacol*, vol. 8, no. 1, pp. 25–32, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.coph.2007.09.001.
- [76] A. E. Ziemann *et al.*, "Seizure termination by acidosis depends on ASIC1a.," *Nat Neurosci*, vol. 11, no. 7, pp. 816–22, Jul. 2008, doi: 10.1038/nn.2132.
- [77] J.-Y. Weng, Y.-C. Lin, and C.-C. Lien, "Cell type-specific expression of acid-sensing ion channels in hippocampal interneurons.," *J Neurosci*, vol. 30, no. 19, pp. 6548–58, May 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0582-10.2010.
- [78] M. A. Carskadon and W. C. Dement, "Chapter 2-Normal Human Sleep : An Overview."
- [79] E. Aserinsky and N. Kleitman, "Regularly Occurring Periods of Eye Motility, and Concomitant Phenomena, During Sleep'," 1916.
- [80] A. Gonfalone and S. Jha, "The influence of gravity on REM sleep," *Open Access Animal Physiology*, p. 65, May 2015, doi: 10.2147/oaap.s80731.
- [81] M. Bellesi, M. Pfister-Genskow, S. Maret, S. Keles, G. Tononi, and C. Cirelli, "Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors," *Journal of Neuroscience*, vol. 33, no. 36, pp. 14288–14300, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5102-12.2013.
- [82] S. Inouf, K. Honda, and Y. Komoda, "Sleep as neuronal detoxification and restitution," 1995.
- [83] R. Havekes, C. G. Vecsey, and T. Abel, "The impact of sleep deprivation on neuronal and glial signaling pathways important for memory and synaptic plasticity," *Cellular Signalling*, vol. 24, no. 6, pp. 1251–1260, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.010.
- [84] R. Guzmán-Marín, N. Suntsova, D. R. Stewart, H. Gong, R. Szymusiak, and D. McGinty, "Sleep deprivation reduces proliferation of cells in the dentate gyrus of the hippocampus in rats.," *J Physiol*, vol. 549, no. Pt 2, pp. 563–71, Jun. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2003.041665.
- [85] V. Madan and S. K. Jha, "Sleep alterations in mammals: did aquatic conditions inhibit rapid eye movement sleep?," *Neurosci Bull*, vol. 28, no. 6, pp. 746–58, Dec. 2012, doi: 10.1007/s12264-012-1285-8.
- [86] "Effect of Hypercapnia on Sleep and Breathing in Unanesthetized Cats," *Sleep*, Jul. 2008, doi: 10.5665/sleep/31.7.1025.
- [87] F. A. Mir and S. K. Jha, "Locus Coeruleus Acid-Sensing Ion Channels Modulate Sleep-Wakefulness and State Transition from NREM to REM Sleep in the Rat.," *Neurosci Bull*, vol. 37, no. 5, pp. 684–700, May 2021, doi: 10.1007/s12264-020-00625-0.

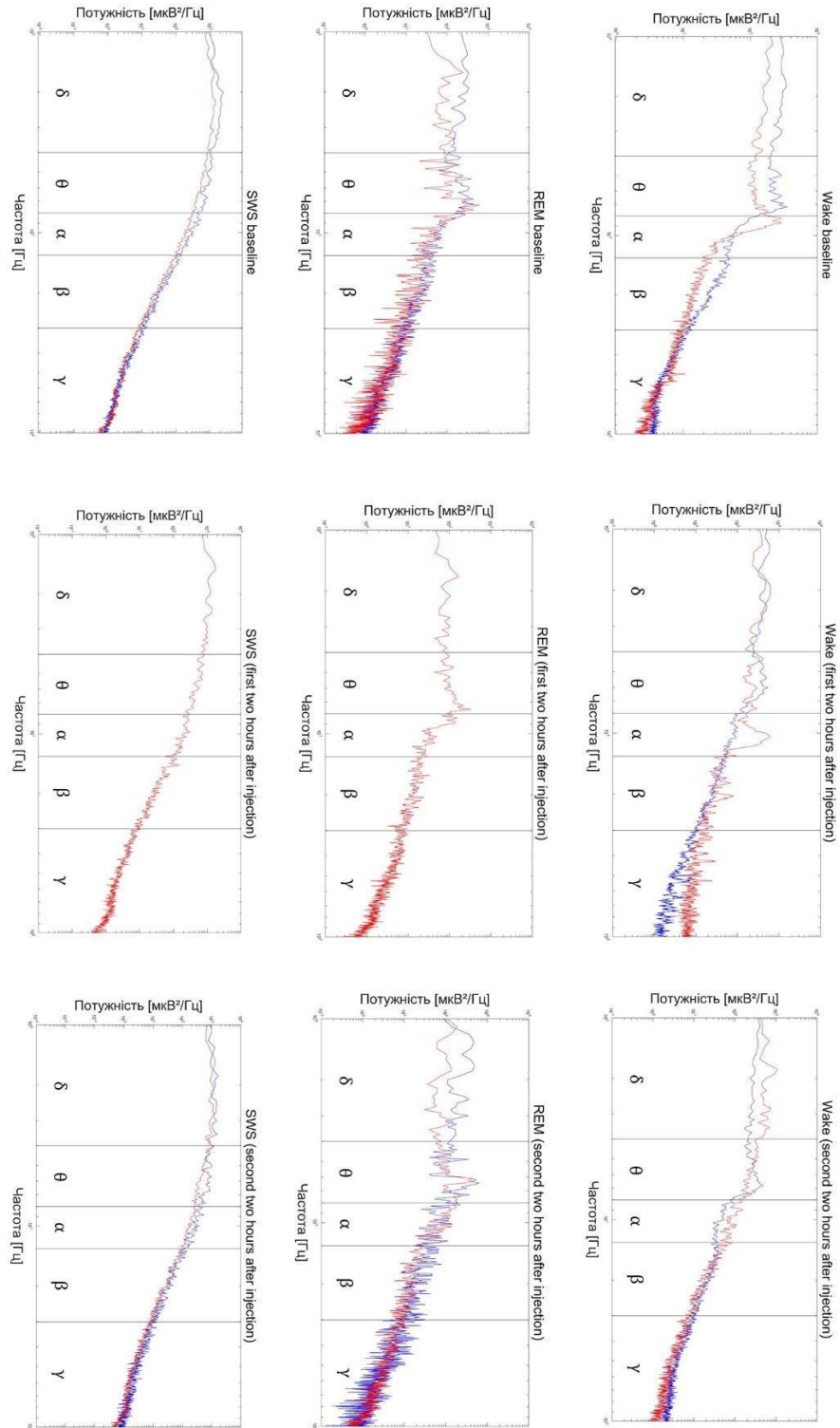
- [88] J. J. Fraigne, K. P. Grace, R. L. Horner, and J. Peever, "Mechanisms of REM sleep in health and disease," *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, vol. 20, no. 6, pp. 527–532, Nov. 2014, doi: 10.1097/MCP.0000000000000103.
- [89] N. R. Carlson, *Physiology of Behavior*, 4th ed. MA: Simon & Schuster, Inc. 1991.
- [90] R. M. Abrams, "Sleep Deprivation.," *Obstet Gynecol Clin North Am*, vol. 42, no. 3, pp. 493–506, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.ogc.2015.05.013.
- [91] A. Buta *et al.*, "Novel Potent Orthosteric Antagonist of ASIC1a Prevents NMDAR-Dependent LTP Induction," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 58, no. 11, pp. 4449–4461, Jun. 2015, doi: 10.1021/jm5017329.

**Спектрограма гіпокампальної активності мозку щурів дослідної (синя лінія) та контрольної (червона) груп.**

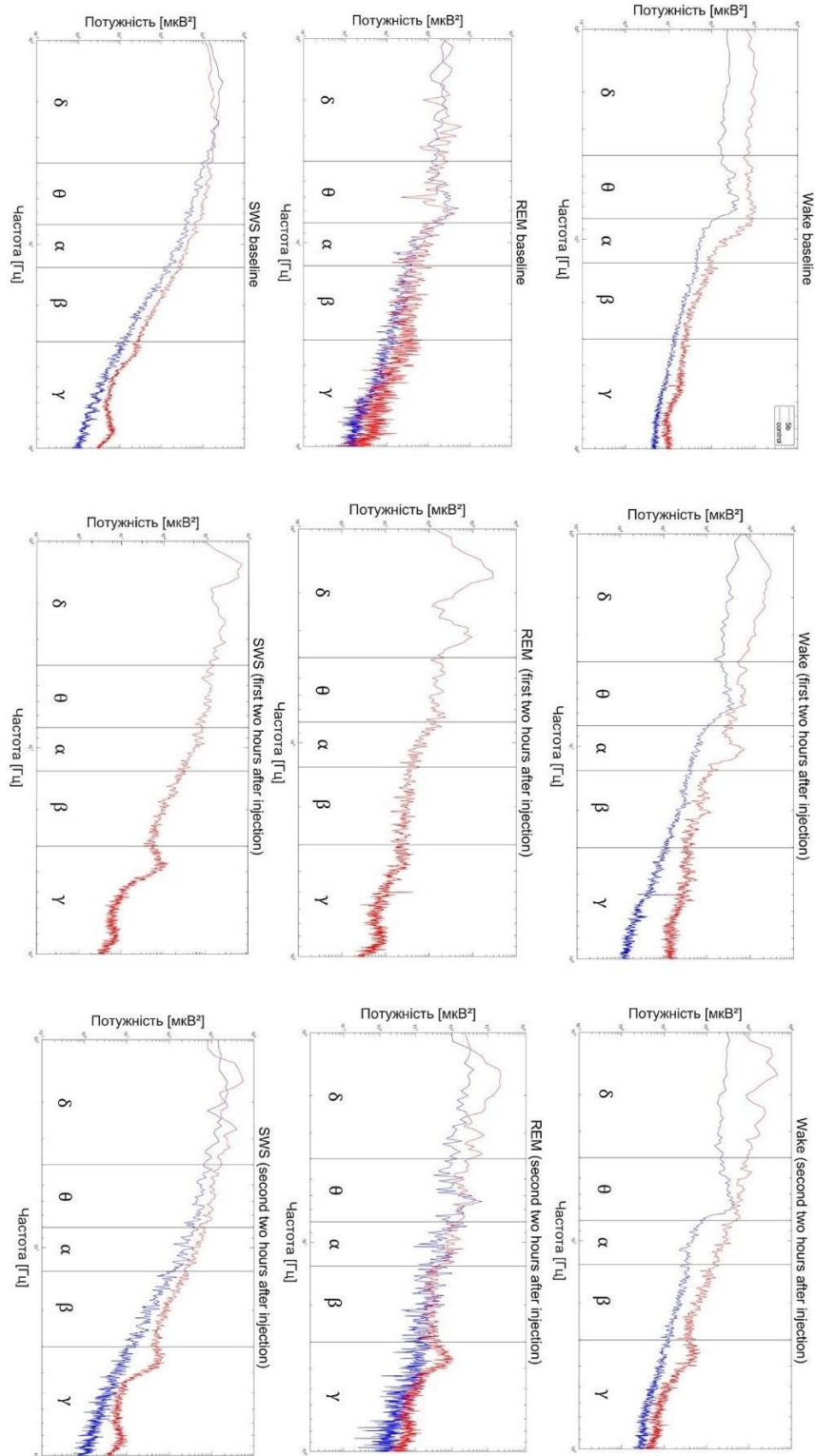


## Додаток Б

Спектрограма активності поверхні мигдалеподібного тіла щурів  
дослідної (синя лінія) та контрольної (червона) груп.



Спектрограма активності поверхні нюхової цибулин шурів дослідної (синя лінія) та контрольної (червона) груп.



## Додаток Г

Спектрограма активності поверхні префронтальної кори шурів дослідної (синя лінія) та контрольної (червона) груп.

