

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И  
НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ**

На правах рукописи

**ВИНОГРАДОВА Людмила Владиславовна**

**НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ  
РЕФЛЕКТОРНОЙ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

03.03.01 Физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант –  
доктор биологических наук, профессор Г. Д. Кузнецова

**Москва 2014**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	15
1.1. Сетевые механизмы эпилепсии	15
1.2. Экспериментальные модели эпилепсии	19
1.3. Аудиогенные судороги	23
<i>Линии животных с генетической аудиогенной эпилепсией</i>	24
<i>Феноменология аудиогенного припадка</i>	26
<i>Нейронная сеть аудиогенных судорог</i>	27
<i>Компоненты эпилептической сети аудиогенных судорог</i>	28
<i>Нейрохимические особенности крыс с генетической аудиогенной эпилепсией</i>	31
1.4. Аудиогенный киндлинг	32
<i>Поведенческий паттерн аудиогенного киндлинга</i>	32
<i>Электрографические проявления аудиогенного киндлинга</i>	34
<i>Модификация эпилептической сети аудиогенных судорог при киндлинге</i>	35
1.5. Распространяющаяся депрессия	37
1.6. Распространяющаяся депрессия и судорожная активность	43
<b>ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	46
2.1. Животные	46
2.2. Методы инициации аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга	46
2.3. Электрофизиологические методы	48
2.4. Нейрофармакологические методы	50
2.5. Статистическая обработка данных	51
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b>	52
3.1. Фенотипический анализ эпилептогенеза на модели аудиогенного киндлинга	52
3.1.1. Сравнительный анализ структуры аудиогенных судорог у крыс линий <i>KM, Wistar</i> и <i>WAG/Rij</i>	52
3.1.2. Сравнительный анализ чувствительности к аудиогенному киндлингу (хроническому эпилептогенезу) крыс линий <i>KM, Wistar</i> и <i>WAG/Rij</i>	58

Аудиогенный киндлинг у крыс КМ _____	59
Аудиогенный киндлинг у крыс Wistar и WAG/Rij. Субпопуляции с разной чувствительностью к эпилептогенезу _____	60
Киндлинг-чувствительные и киндлинг-резистентные крысы Wistar и WAG/Rij _____	61
Крысы Wistar и WAG/Rij с приобретенной устойчивостью к судорогам _____	63
Межлинейные различия в динамике АК у крыс Wistar и WAG/Rij _____	63
Аудиогенный киндлинг и неконвульсивные абсансные судороги _____	65
Аудиогенный киндлинг и судорожная реакция на продленный звук у крыс Wistar и WAG/Rij _____	65
<b>3.2. Нейрофармакологический анализ механизмов иктогенеза и эпилептогенеза на модели аудиогенного киндлинга _____</b>	<b>72</b>
<b>3.2.1. Участие эндоканнабиноидной системы в иктогенезе и эпилептогенезе при аудиогенной эпилепсии _____</b>	<b>72</b>
Прозепилептические эффекты антагониста эндоканнабиноидных СВ1 рецепторов SR141716 _____	74
Антиэпилептогенный эффект агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212(2) _____	78
<b>3.2.2. Участие гистаминергической системы в иктогенезе и эпилептогенезе при аудиогенной эпилепсии _____</b>	<b>85</b>
<b>3.2.3. Участие ГАМКергических механизмов в экспрессии аудиогенных судорог _____</b>	<b>90</b>
Влияние фармакологической стимуляции ГАМКергической передачи на аудиогенные судороги у крыс КМ _____	91
Влияние фармакологической стимуляции ГАМКергической передачи на аудиогенные судороги у крыс Wistar и WAG/Rij _____	94
<b>3.2.4. Антииктогенный и антиэпилептогенный эффекты леветирацетама при аудиогенной эпилепсии _____</b>	<b>100</b>
Антииктогенное влияние леветирацетама на аудиогенные судороги у крыс КМ _____	101

Антиэпилептогенное влияние леветирацетама на формирование аудиогенного киндлинга у крыс KM _____	103
Антииктогенное влияние леветирацетама на аудиогенные судороги у крыс Wistar _____	104
<b>3.3. Электрографический анализ аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij _____</b>	<b>110</b>
<i>3.3.1. Электрическая активность коры и нижнего двухолмия при минимальных аудиогенных судорогах и их повторном вызове у крыс Wistar _____</i>	<i>110</i>
<i>3.3.2. Волна распространяющейся депрессии – регулярная реакция коры на повторные аудиогенные судороги у крыс Wistar _____</i>	<i>114</i>
<i>3.3.3 Электрическая активность коры при повторном вызове минимальных аудиогенных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами (абсансной и аудиогенной) эпилепсии _____</i>	<i>123</i>
Электрографические реакции коры на повторные аудиогенные судороги у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии _____	124
Влияние минимальных аудиогенных судорог на абсансную судорожную активность у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии _____	127
<b>3.4. Асимметрия ранних проявлений аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij _____</b>	<b>135</b>
<i>3.4.1. Индивидуальная асимметрия аудиогенного бега и электрографических ответов коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij _____</i>	<i>136</i>
<i>3.4.2. Популяционная асимметрия поведенческих и электрографических проявлений аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij _____</i>	<i>141</i>
<i>3.4.3. Динамика аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij с разной направленностью аудиогенного бега _____</i>	<i>143</i>
<i>3.4.4. Латерализация аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij с приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам _____</i>	<i>144</i>
<b>ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ _____</b>	<b>155</b>

<b>ГЛАВА 5. ВЫВОДЫ</b>	160
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	163

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АК – аудиогенный киндлинг

АС – аудиогенные судороги

АЭП – антиэпилептический препарат

ГАМК –  $\gamma$ -аминомасляная кислота

ВГБ – вигабатрин

ВП – вызванные потенциалы

ЛВ – леветирацетам

ЛП – латентный период

МЭГ - магнитоэнцефалография

НД – нижнее двухолмие

РД – распространяющаяся депрессия

РФ – ретикулярная формация

фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография

ЦНС – центральная нервная система

AD – afterdischarge, послеразряд

GEPR – Genetically Epilepsy Prone Rat

GAERS – Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg

PAG – околотоводопроводное серое вещество

PTZ – пентилентетразол

SER – Serikawa epileptic rats

SWD – spike wave discharge

WAG/Rij - Wistar Albino Glaxo from Rijswijk

WAR – Wistar Audiogenic Rat

Wistar AS – Wistar Audiogenically Susceptible rats

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Исследование нейрофизиологических механизмов эпилепсии является одним из важных направлений нейробиологии, которое не только позволяет понять патогенез данного заболевания, но и вносит существенный вклад в изучение фундаментальных механизмов работы головного мозга. Эпилепсия - хроническое неврологическое заболевание, для которого характерно повторное возникновение спонтанных судорог (Shneker, Fountain, 2003; Engel, 2006). Считается, что в основе развития эпилепсии лежит нарушение баланса тормозных и возбуждающих процессов в ЦНС, ведущее к патологическому гиперсинхронному возбуждению больших нейронных популяций. Согласно современным представлениям, судороги являются сетевым феноменом, отражающим реверберацию патологического гипервозбуждения в нейронных сетях (Spenser, 2002; Engel, 2006; Faingold, 2004). Формирование и постепенное расширение эпилептической сети за счет рекрутирования в нее все новых структур лежит в основе эпилептогенеза - хронического процесса, ведущего к развитию и интенсификации судорог (Avanzini et al., 2012; Goldberg, Coulter, 2013).

В зависимости от степени вовлечения структур головного мозга в эпилептическую сеть, выделяют фокальную и генерализованную формы эпилепсии. При фокальной эпилепсии (например, височной) происходит формирование локальной эпилептической сети в одном из полушарий головного мозга, чаще всего в результате очаговой патологии. При генерализованной эпилепсии аномально возбужденные сети широко распределены в мозге, и такие судороги связаны с одновременной эпилептической активацией многих областей обоих полушарий (Spenser, 2002; Wolf, 2006; Engel, 2006). У большинства пациентов с первично генерализованной эпилепсией отсутствует выраженная структурная аномалия головного мозга, которая могла бы отвечать за инициацию судорог, и конкретные патогенетические механизмы этой формы заболевания остаются неясными. Считается, что в большинстве случаев генерализованная эпилепсия является результатом генетически детерминированных изменений нейронной возбудимости (Engel, 2006; Steriade, 2003).

Однако все более актуальной становится точка зрения об отсутствии четкой границы между фокальной и генерализованной формами эпилепсии (Berg et al., 2010). Фокально возникшая эпилептическая активность часто распространяется в экстрафокальные отделы (вторичная генерализация), что ведет к вторичной билатеральной синхронизации судорожных разрядов (Avoli et al., 2005; Bertram, 2003; Pitkanen, Lukasiuk, 2008). С другой стороны, электрографические и клинические проявления первично генерализованной эпилепсии у пациентов в ряде случаев характеризуются фокальными чертами.

Данные электрофизиологических исследований и нейровизуализации показывают, что развитие первично генерализованных судорог связано с аномальной активацией корково-подкорковых сетей – таламокортикальных при абсансной эпилепсии (*petit mal*) (Карлов, Гнездицкий, 2005; Steriade, 2003; Depaulis, van Luijckelaar, 2005) и корково-стволовых при генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами (*grand mal*) (Lado, Moshe, 2002; Norton, Blumenfeld, 2002). Если дисфункция таламокортикальных сетей, определяющая развитие неконвульсивных генерализованных судорог абсансного типа, изучена достаточно подробно, то крайне мало известно о механизмах генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами - одной из наиболее тяжелых форм заболевания, для которой характерно развитие повторных эпизодов сильной ригидности мышц (тонические судороги) и/или ритмических мышечных сокращений (клонические судороги).

Аудиогенные судороги (АС), развивающиеся у грызунов в ответ на звуковую стимуляцию, являются одной из наиболее популярных и адекватных экспериментальных моделей первично генерализованной конвульсивной эпилепсии (Крушинский, 1949; Семиохина и др., 2006; Faingold, 1999; Jobe, Browning, 2006). Они всегда начинаются с двигательного возбуждения (аудиогенного бега), за которым могут следовать клонические, тонические или клонико-тонические судороги, имеющие симметричный паттерн и отражающие билатеральную эпилептическую активацию ствола. Судорожное возбуждение при аудиогенной эпилепсии начинается в слуховом отделе ствола (нижнем двухолмии) и затем охватывает другие стволовые структуры - глубокие слои верхнего двухолмия, центральное серое вещество, ретикулярную формацию. Начальная фаза аудиогенных судорог - двигательное возбуждение - отражает раннюю активацию нижнего двухолмия, которое обеспечивает не только анализ



слуховой информации, но и сенсомоторную интеграцию у грызунов. Переход от двигательного возбуждения к клонико-тоническим судорогам отражает вовлечение в эпилептическую сеть других отделов ствола (Faingold, 2004; Jobe, Browning, 2006).

Передний мозг не участвует в экспрессии однократных аудиогенных судорог, но рекрутируется в эпилептическую сеть при их повторном возникновении (Marescaux et al., 1987; Simler et al., 1999). Поведенческим выражением такой вторичной эпилептической активации переднего мозга служит появление в составе приступа нового типа судорог – посттонического клонуса (после максимальных стволовых судорог) или клонуса лимбического типа (после субмаксимальных стволовых судорог). Процесс удлинения и усложнения повторных аудиогенных приступов в результате вторичной генерализации эпилептической активности из стволовых отделов в структуры переднего мозга, получил название аудиогенного киндлинга (АК) (Крушинский, 1960; Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Garcia-Cairasco et al., 1996).

Киндлинг (kindling, раскачка), то есть прогрессивное усиление судорожного ответа на повторную эпилептогенную стимуляцию, является адекватной экспериментальной моделью эпилептогенеза и вторичной генерализации судорог (Goddard et al., 1969; Racine, 1972). При формировании киндлинга эпилептическая активность распространяется в структуры, удаленные от первичного очага возбуждения, что ведет к постепенной интенсификации электрографических и моторных проявлений судорог (Racine, 1972; McIntyre et al., 2002).

При аудиогенном киндлинге активируется та же лимбическая эпилептическая сеть, что и в классической парадигме киндлинга, вызванного электрической стимуляцией миндаины (Wasterlain et al., 1982; Hirsch et al., 1997), что позволяет использовать модель аудиогенного киндлинга для исследования механизмов, как генерализованных конвульсивных судорог, так и лимбического эпилептогенеза. Подробно исследованный нейроанатомический субстрат и четкие поведенческие корреляты аудиогенного киндлинга делают данную модель крайне удобной для экспериментального исследования эпилептогенеза. А то, что для инициации судорог используется только сенсорная стимуляция, и эпилептогенез протекает в условиях ненарушенной

нейрохимической и структурной целостности головного мозга, делает эту модель наиболее приближенной к патологии человека. Однако использование аудиогенного киндлинга в качестве экспериментальной модели эпилептогенеза остается крайне ограниченным, и эта модель обычно не применяется при доклиническом скрининге новых антиэпилептических препаратов.

Одним из главных ограничений существующей модели аудиогенного киндлинга является используемая для его выработки парадигма стимуляции. Если в классической парадигме электрического киндлинга применяется слабая околопороговая стимуляция лимбических структур, исходно иницирующая минимальный судорожный ответ (Goddard et al., 1969; Racine, 1972), то при аудиогенном киндлинге традиционно используют интенсивное звуковое раздражение, вызывающее максимальные АС с тонико-клоническими судорогами. Первоочередной задачей нашего исследования была проверка применимости классической парадигмы к модели аудиогенного киндлинга, то есть изучение возможности формирования киндлинга при повторении звуковой стимуляции, вызывающей минимальный судорожный ответ.

Несмотря на длительную историю изучения эпилепсии и большое количество накопленных к настоящему времени данных о клеточно-молекулярных изменениях в эпилептическом мозге, остаются неясными причины развития данного заболевания, индивидуальных различий в течении эпилепсии, а также условия, ведущие к патологической реорганизации нейронных сетей в ходе эпилептогенеза. Одной из самых актуальных прикладных задач при изучении эпилепсии является поиск эффективных методов лечения заболевания. Существующие антиэпилептические препараты тормозят возникновение судорог, но не предотвращают длительные изменения нейронной возбудимости, лежащие в основе эпилептогенеза и интенсификации повторных судорог. Поэтому в настоящее время идет активный поиск *антиэпилептогенных* препаратов, задерживающих или предотвращающих развитие и прогрессирующее течение эпилепсии. В ходе данного исследования оценивалась возможность использования модели аудиогенного киндлинга для поиска и тестирования антиэпилептических и антиэпилептогенных препаратов.

Важной особенностью настоящего исследования было изучение участия феномена распространяющейся депрессии (РД) в механизмах рефлекторной

аудиогенной эпилепсии. Вопрос о роли РД в патогенезе эпилепсии у пациентов остается практически неисследованным, хотя известно, что волна РД регулярно возникает в коре больших полушарий у больных с мигренью, ишемией, субарахноидальной геморрагией (Hadjikhani et al., 2001; Fabricius et al., 2008; Dreier, 2011). У экспериментальных животных РД может сопровождать судорожную активность, вызванную электрической и фармакологической стимуляцией (Bures et al., 1974; Королева и др., 1993). В настоящей работе исследовали возможность возникновения РД в ответ на синаптическую активацию коры при рефлекторно вызванных аудиогенных судорогах.

### **Цель и задачи работы**

Целью работы было изучение нейрофизиологических механизмов иктогенеза (развития судорог) и эпилептогенеза (усиления повторных судорог) на экспериментальной модели аудиогенного киндлинга с применением методов электрофизиологического, нейрофармакологического и фенотипического анализа судорожной активности.

В соответствии с данной целью исследования были поставлены следующие задачи.

- (1) Сравнить динамику аудиогенного киндлинга, вызванного повторением минимальной звуковой стимуляции, у крыс разных генетических линий.
- (2) Исследовать роль эндоканнабиноидной, гистаминергической и ГАМКергической систем головного мозга в механизмах иктогенеза и эпилептогенеза, вызванного звуковой стимуляцией.
- (3) Оценить антиэпилептогенную активность противосудорожного препарата второго поколения леветирацетама (Кеппры) на модели аудиогенного киндлинга.
- (4) Провести электрографический анализ эпилептической активации коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij.
- (5) Изучить взаимодействие разных типов судорожной активности (конвульсивной и неконвульсивной) у крыс WAG/Rij с двумя формами генерализованной эпилепсии (абсансной и аудиогенной).

(6) Исследовать асимметрию моторных и электрографических проявлений минимальных аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что киндлинг может формироваться при повторении минимальных аудиогенных судорог (короткого эпизода двигательного возбуждения). Среди крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией описаны субпопуляции животных с разной чувствительностью к киндлинг-эпилептогенезу.

Обнаружено, что волна распространяющейся депрессии является самым ранним и самым регулярным ответом новой коры на повторные стволовые аудиогенные судороги, что свидетельствует о крайне низком пороге инициации РД при активации кортикопетальных связей. Впервые продемонстрировано, что возникновение корковой РД при аудиогенных судорогах определяет паттерн послесудорожной депрессии эпилептических разрядов абсансного типа у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии.

Впервые получены экспериментальные данные об асимметричном начале стволовых аудиогенных судорог и асимметричном паттерне вторичной генерализации эпилептической активности из ствола в кору при аудиогенном киндлинге. Описана стойкая индивидуальная моторная асимметрия самого раннего компонента повторных аудиогенных судорог (начального двигательного возбуждения) и первых электрографических признаков эпилептической активации коры (волны РД и эпилептиформной активности) при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij. Впервые получены данные о повышенной уязвимости левого полушария к хроническому эпилептогенезу у экспериментальных животных.

Впервые описаны длительные антиэпилептогенные эффекты кратковременной фармакологической стимуляции эндоканнабиноидной системы и однократного введения леветирацетама (Кеппры).

### **Теоретическое и научно-практическое значение работы**

В результате проведенного исследования предложена модифицированная модель аудиогенного киндлинга, которая может быть использована при

изучении фундаментальных механизмов эпилептогенеза и возможностей его фармакологической модуляции.

Проведенные эксперименты показали, что эндоканнабиноидная система является перспективной мишенью для фармакологического лечения прогрессирующих форм эпилепсии. Данные о длительном антиэпилептогенном эффекте леветирацетама, полученные на модели аудиогенного киндлинга, могут быть использованы для формирования наиболее продуктивной стратегии лечения некоторых форм эпилепсии.

Обнаруженное в данном исследовании регулярное возникновение при повторных аудиогенных судорогах корковой волны распространяющейся депрессии и ее мощное влияние на активность коры указывает на возможное участие феномена РД в постприступных нарушениях у больных эпилепсией. Поскольку корковая РД считается электрографическим коррелятом мигренозной ауры, полученные данные вносят вклад в понимание механизмов постиктальной головной боли и тесной связи между эпилепсией и мигренью.

Поскольку аудиогенные судороги являются экспериментальной моделью генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами, полученные в наших экспериментах данные о моторной асимметрии начальной фазы аудиогенных судорог могут быть важны для понимания природы ранних асимметричных проявлений первично генерализованных судорог у пациентов (Gastaut et al., 1986; Casaubon et al., 2003). Повышенная чувствительность левого полушария к эпилептогенезу, описанная нами у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией, согласуется с клиническими данными о более высокой эпилептогенности этого полушария у пациентов (Брагина, Доброхотова, 1988; Карлов и др., 1992; Болдырева и др., 2000) и предполагает различный характер включения в патологический процесс структур левого и правого полушарий, что может быть использовано для экспериментального изучения функциональной межполушарной асимметрии в условиях патологии головного мозга и эндогенных механизмов регуляции чувствительности мозга к эпилептическому возбуждению.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Повторная провокация стволовых аудиогенных судорог минимальной интенсивности может вызывать формирование киндлинга с развитием судорог лимбического типа и эпилептической активацией коры больших полушарий.

2. Волна распространяющейся депрессии является регулярной реакцией коры на повторные стволовые аудиогенные судороги и может развиваться в отсутствие выраженной эпилептической активации новой коры.

3. Стойкая индивидуальная асимметрия является характерной чертой самых ранних проявлений первичных стволовых и вторичных корковых судорог, вызванных повторной звуковой стимуляцией у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией. Эти данные указывают на фокальное начало аудиогенных судорог и латерализованный характер их вторичной генерализации в кору.

4. Формирование вторичных эпилептических очагов при аудиогенном киндлинге находится под тормозным контролем эндоканнабиноидной системы.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации докладывались на международных симпозиумах и конференциях: Европейских Конгрессах по эпилепсии (6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup> и 9<sup>th</sup> European Congresses on Epilepsy; Vienna, 2004; Helsinki, 2006; Rhodos, 2010), международном Конгрессе по эпилепсии (26<sup>th</sup> International Congress on Epilepsy, Paris, 2005), европейских конгрессах по нейронаукам (FENS) (Vienna 2006; Amsterdam, 2010), конференции «IACM, Cannabinoids in Medicine» (Kohln, 2013).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Сетевые механизмы эпилепсии

Исследование нейрофизиологических механизмов эпилептогенеза является одним из важных направлений нейробиологии, которое не только позволяет понять процессы, ведущие к развитию эпилепсии, но и вносит существенный вклад в изучение фундаментальных механизмов работы головного мозга. Эпилепсия представляет собой хроническое неврологическое заболевание, для которого характерно развитие повторных спонтанных судорог, отражающих аномальную гиперсинхронную активацию больших популяций нейронов (Shneker, Fountain, 2003; Engel, 2006). Считается, что в основе этой патологии ЦНС лежит нарушение баланса тормозных и возбуждающих процессов, развивающееся в результате врожденной или приобретенной дисфункции рецепторов, каналов, структурных изменений нервной ткани и т.д. (Steriade, 2003; Avoli et al., 2005; Engel, 2006; Velazques, Carlen, 2000).

Согласно современным представлениям, судороги являются сетевым феноменом и отражают реверберацию патологического гипервозбуждения в нейронных сетях (Spenser, 2002; Engel, 2006; Faingold, 2004; Avanzini et al., 2012). В зависимости от степени вовлечения структур головного мозга в эпилептическую сеть, различают фокальную и генерализованную формы эпилепсии: при фокальных судорогах аномально возбужденные сети локализованы в ограниченной области, при генерализованных - широко распределены в мозге (Spenser, 2002; Wolf, 2006; Engel, 2006).

Височная эпилепсия, самый распространенный и резистентный к медикаментозному лечению вид эпилепсии, относится к фокальной или парциальной форме эпилепсии. Развитие височной эпилепсии связано с формированием локальной эпилептической сети в височных областях коры в результате фокальной структурной патологии нервной ткани (симптоматическая эпилепсия) или в отсутствие каких-либо морфологических нарушений (идиопатическая эпилепсия) (Spenser, 2002; Wolf, 2006). Клинические и электрографические проявления судорог при височной эпилепсии обычно позволяют достаточно точно локализовать область инициации судорожной активности, и хирургическое удаление этой зоны устраняет или смягчает симптомы заболевания. Главную роль в инициации судорог при височной эпилепсии играют структуры лимбической системы, прежде всего гиппокамп и

миндалины: именно здесь чаще всего начинается патологическое возбуждение и описаны наиболее выраженные структурные изменения нервной ткани, включающие нейродегенерацию, реорганизацию синаптических связей, нейрогенез и др. (Avoli et al., 2005; Bertram, 2003; Pitkanen, Lukasiuk, 2008). Поэтому при описании данного типа судорожной активности часто используется термин лимбические судороги (Bertram, 2003; Engel, 2006). Фокальная судорожная активность при височной эпилепсии часто распространяется из лимбической системы в другие отделы головного мозга, и в этом случае говорят о вторичной генерализации судорог. Патогенетические механизмы височной эпилепсии и пути вторичной генерализации лимбических судорог исследованы наиболее подробно (Spenser, 2002; Engel, 2006).

Для первично генерализованной эпилепсии характерно диффузное начало судорог с одновременной эпилептической активацией многих областей коры и билатерально-синхронными, симметричными пароксизмальными разрядами на ЭЭГ (Wolf, 2006; Engel, 2006; Blume, 2006b). Считается, что эта форма судорожной активности отражает патологическое возбуждение широко распространенных в мозге эпилептических сетей (Steriade, 2003; Avanzini et al., 2012). У большинства пациентов с первично генерализованной эпилепсией отсутствует выраженная структурная аномалия, которая могла бы отвечать за инициацию судорог (идиопатическая эпилепсия). Считается, что развитие первично генерализованной эпилепсии в большинстве случаев является результатом генетически детерминированных изменений активности нейромедиаторных систем и нейронной возбудимости (Engel, 2006; Steriade, 2003). Исследования пациентов с идиопатической генерализованной эпилепсией методами нейровизуализации показали критическую роль в патогенезе этой формы эпилепсии аномальных корково-подкорковых взаимодействий – таламокортикальных при абсансных судорогах и корково-стволовых при тонико-клонических судорогах (Lado, Moshe, 2002; Norton, Blumenfeld, 2002).

Типичная абсансная эпилепсия характеризуется спонтанным возникновением генерализованных пик-волновых разрядов (*spike-wave discharge, SWD*), во время которых снижается реактивность на внешние стимулы, но выраженные моторные судороги отсутствуют (Карлов, Гнездицкий, 2005; Holmes et al., 1987; Coenen et al., 1992; Vergnes, Marescaux, 1992). Сетевые и клеточные механизмы этого типа судорожной активности



изучены достаточно подробно на экспериментальных моделях (Coenen et al., 1992; Vergnes, Marescaux, 1992; Steriade, 2003). Показано, что абсансные судороги отражают осцилляции патологического возбуждения в таламокортикальных сетях (Gloor, Fariello, 1988; van Luijtelaar, Coenen, 1989; Coenen, van Luijtelaar, 2003). Эти нейронные сети вовлечены в генерацию нормальной осцилляторной активности (например, сонных веретен) и образованы глутаматергическими кортикоталамическими и таламокортикальными нейронами, а также ГАМКергическими нейронами ретикулярного ядра таламуса (Steriade, 2003; Depaulis, van Luijtelaar, 2005). Согласно современным представлениям, гипервозбуждение возникает в ограниченной области коры, затем распространяется в другие корковые области, ретикулярное и вентробазальное ядра таламуса, инициируя реверберацию патологического возбуждения в таламокортикальной сети (Meegen et al., 2002).

Значительно меньше известно о патогенетических механизмах генерализованной конвульсивной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами, для которых характерна сильная и достаточно продолжительная ригидность мышц (тонические судороги) с последующим ритмическим чередованием мышечных сокращений и расслаблений (клонические судороги). Тонико-клонические судороги развиваются как у пациентов с первично генерализованной эпилепсией, так и при вторичной генерализации фокальных судорог (Wolf, 2006; Engel, 2006; Blume, 2006b). Клинические исследования с помощью методов нейровизуализации показали, что во время тонико-клонических судорог у пациентов наблюдается патологическое возбуждение не только корковых, но и корково-стволовых сетей (Hayashi, 2001; Siniatchkin et al., 2011; Norden, Blumenfeld, 2002; Moeller et al., 2009). Считается, что распространение эпилептической активности в стволые структуры и активация ретикулоспинальных трактов определяют развитие тонических судорог (Blume, 2006b; Norden, Blumenfeld, 2002). Изучение слуховых ВП у пациентов с первично генерализованной эпилепсией показало, что гиперактивация стволых отделов мозга предшествует началу тонико-клонических судорог (Kohsaka et al., 2002). Поэтому высказываются предположения, что аномальная активность стволых сетей может участвовать

в инициации тонико-клонических судорог при идиопатической генерализованной эпилепсии у человека (Lado, Moshe, 2002; Kohsaka et al., 2002).

Для большинства генерализованных эпилепсий, за исключением абсансных судорог, конкретные патогенетические механизмы развития судорожной активности остаются неясными. Непонятны сетевые, клеточные и молекулярные изменения, участвующие в генерации судорог и эпилептогенезе при данных формах эпилепсии. Нередко идиопатические генерализованные судороги имеют фокальные клинические и электрографические черты (Карлов, Гнездицкий, 2005; Gastaut et al., 1986; Casaubon et al., 2003; Blume, 1998). Предполагается, что судороги, которые по своим внешним проявлениям относятся к первично генерализованным, могут иметь фокальный генез, то есть являться результатом вторичной билатеральной генерализации и диффузного распространения эпилептической активности из первичного очага патологического возбуждения (Blume, 1998). Поэтому в настоящее время в отчетах Международной Лиги по Борьбе с Эпилепсией (International League Against Epilepsy, ILAE) подчеркивается спорность жесткого дихотомического деления эпилепсий на фокальные и генерализованные формы (Engel, 2006; Blume, 2010).

Несмотря на длительную историю изучения эпилепсии, причины развития данного заболевания и индивидуальных различий в его течении остаются неясными. Непонятны механизмы эпилептогенеза, то есть хронического процесса, ведущего к эпилептизации мозга, появлению и интенсификации спонтанных судорог. В исследованиях на экспериментальных моделях показано, что превращение исходно здорового мозга в эпилептический связано с многочисленными молекулярно-клеточными изменениями, включающими нейродегенерацию, глиоз, нейрогенез, изменения клеточной морфологии, нейровоспалительные процессы и др. (Avoli et al., 2005; Pitkanen, Lukasiuk, 2008; Vezzani, Granata, 2005). Но какие из этих изменений определяют развитие судорог, а какие являются их следствием, остается неясным. Непонятны и причины высокой variability в развитии эпилепсии у пациентов. Клинические и эпидемиологические исследования демонстрируют резкие различия в динамике патологического процесса при разных эпилептических синдромах - от быстрой ремиссии до интенсификации и учащения повторных

судорог (Blume, 2006a), а также значительные индивидуальные различия в интенсивности судорог и течении заболевания даже при одной форме эпилепсии (Shneker, Fountain, 2003; Blume, 2006a).

## **1.2. Экспериментальные модели эпилепсии**

Моделирование заболевания на животных является основным путем исследования его патофизиологических механизмов и поиска методов лечения. Хотя проявления эпилептической активности у пациентов более разнообразны, чем у грызунов, физиологическая основа судорог и их влияние на функционирование ЦНС достаточно консервативны в филогенезе. Поэтому, несмотря на отсутствие строгого параллелизма с многочисленными формами эпилепсии человека, экспериментальные модели позволяют исследовать фундаментальные механизмы развития судорожной активности и искать возможности ее фармакологической модуляции.

Поиск и разработка антиэпилептических препаратов (АЭП) основаны на доклинических исследованиях с использованием экспериментальных моделей. На этих моделях проверяются активность АЭП в отношении судорог разного типа, возможность их использования для предотвращения эпилептогенеза и терапии фармакорезистентной эпилепсии, их эффективности при хроническом введении и т.д. (White et al., 2006; Loscher, 2002). В последнее время отмечается замедление прогресса в поиске новых АЭП, что связывают, прежде всего, с методологическими проблемами, точнее с недостатками используемых при доклиническом скрининге экспериментальных моделей (Loscher, 2011). Одной из главных проблем является использование для поиска новых АЭП стандартного набора экспериментальных моделей, не воспроизводящих хроническую дисфункцию ЦНС, характерную для пациентов с эпилепсией. Основная часть доклинических исследований АЭП проводится на так называемых «острых» моделях заболевания, в которых судороги вызывают у исходно здоровых животных путем однократной интенсивной электрической или химической стимуляции (White et al., 2006). Наиболее популярными моделями этого типа являются тонико-клонические судороги, вызванные максимальным электрошоком или введением высоких доз пентилентетразола (PTZ). Именно с помощью этих двух моделей было обнаружено большинство современных АЭП, которые действуют на ограниченный круг молекулярных мишеней (вольт-управляемые натриевые и кальциевые каналы,

ГАМКергические и глутаматергические рецепторы) для снижения возбудимости нейронов (Rogawski, Loscher, 2004). Вещества с другими механизмами действия, например леветирацетам (Кеппра), связывающийся с белком синаптических везикул SV2A, не проявляют антиэпилептической активности в этих «острых» моделях, но высоко активны в так называемых «хронических» моделях эпилепсии, где развитие судорог определяется длительной дисфункцией ЦНС (Klitgaard et al., 1998).

Среди хронических моделей выделяют модели симптоматической (приобретенной) и идиопатической (генетической) эпилепсии. В моделях первого типа у исходно здоровых животных судороги вызываются повторением слабой эпилептогенной стимуляции («раскачка» или киндлинг), или они развиваются спонтанно после мощного однократного эпилептогенного воздействия, например эпилептического статуса (пост-статусные модели). В генетических моделях судороги являются результатом целенаправленных (трансгенные или нокаутированные животные), спонтанных или селекционированных генетических мутаций. У животных с такими мутациями судороги возникают спонтанно или в ответ на специфическую сенсорную стимуляцию (рефлекторная эпилепсия).

*Киндлинг* – одна из наиболее известных моделей парциальной (височной) эпилепсии, эпилептогенеза и патологической пластичности (Goddard et al., 1969; Racine, 1972; Ben-Ari, 2005). Киндлинг представляет собой процесс прогрессивного усиления электрографических и моторных судорог при их повторной инициации. В классической парадигме киндлинг вызываются повторением локальной электрической стимуляции (1-10 сек, 10-150 Гц) лимбических структур (чаще всего миндалины и гиппокампа) у исходно неэпилептических животных (Goddard et al., 1969). Первый стимул вызывает очень короткий локальный эпилептиформный разряд (послеразряд, afterdischarge, AD), который сопровождается минимальными поведенческими проявлениями (Racine, 1972). При повторении такой субконвульсивной стимуляции с интервалом от десятков минут до нескольких суток наблюдается прогрессирующее развитие судорожной активности: нарастают длительность и амплитуда эпилептиформного разряда, снижается порог его развития, эпилептическая активность появляется в других структурах головного мозга, развиваются и прогрессивно усиливаются моторные судороги (Racine, 1972;

Morimoto et al., 2004). Сопоставление динамики электрографических и поведенческих проявлений киндлинга показало их тесную взаимосвязь (Racine, 1972). Локальная эпилептиформная активность (afterdischarge) на ранних стадиях киндлинга вызывает очень слабые поведенческие нарушения (замирание, автоматизмы, миоклонические подергивания лицевой мускулатуры). В ходе киндлинга эпилептическая активность появляется сначала в других структурах переднего мозга ипсилатерального полушария, а затем вовлекается структуры противоположного полушария. Рекрутирование новых областей мозга в эпилептическую сеть сопровождается появлением и интенсификацией моторных судорог (Engel et al., 1978; Morimoto et al., 2004). На основе поведенческих проявлений выделяют пять основных стадий киндлинга лимбических структур: от миоклонуса мышц головы (стадии 1-2) и клонуса передних лап (стадия 3) до генерализованных клонических/тонико-клонических судорог (стадии 4-5) (Racine, 1972). У животных со сформированным киндлингом состояние повышенной судорожной чувствительности не исчезает при прекращении эпилептогенной стимуляции и сохраняется в течение почти всей жизни. Киндлинг можно вызвать электрическим раздражением большинства структур переднего мозга, хотя наиболее чувствительны к киндлингу структуры лимбической системы (миндалины, гиппокамп, периринальная и пириформная кора) (Goddard, 1983; Morimoto et al., 2004). Сходная динамика поведенческих и электрографических проявлений судорог наблюдается при фармакологическом киндлинге, вызванном повторными (локальными или системными) инъекциями конвульсивных агентов (PTZ и др.) (Шандра и др., 1983; Королева и др., 1993; Mason, Cooper, 1972). Киндлинг также можно вызвать повторной звуковой стимуляцией грызунов с врожденной аудиогенной эпилепсией (Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992). Такой аудиогенный киндлинг сочетает в себе черты генетических и приобретенных моделей эпилепсии, так как он развивается у животных с генетической предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии, повторная звуковая стимуляция которых ведет к развитию лимбических судорог, исходно отсутствовавших в составе аудиогенного припадка. Этой модели эпилептогенеза посвящено данное исследование.

Сходство паттернов судорог, развивающихся в ходе электрического, фармакологического и аудиогенного типов киндлинга, а также возможность

«переноса» повышенной судорожной чувствительности при вызове электрического и фармакологического/аудиогенного киндлинга у одного животного (Wasterlain et al., 1982; Hirsch et al., 1997) указывают на общий анатомический субстрат эпилептогенеза в этих моделях. Это эпилептическая сеть, которая формируется в лимбических структурах переднего мозга при повторной эпилептогенной стимуляции, независимо от ее природы (электрическом раздражении, введении фармакологического агента или звуковой стимуляции).

Считается, что киндлинг является адекватной экспериментальной моделью эпилептогенеза, которая воспроизводит прогрессирующее развитие височной эпилепсии у пациентов, повышенную возбудимость нейронов в эпилептическом фокусе, способность к быстрой генерализации судорожного активности в экстрафокальные отделы с появлением вторичных очагов патологического возбуждения, интенсификацию повторных клинических судорог. Характерными чертами модели киндлинга являются использование повторной стимуляции ЦНС, распространение эпи-активности в области мозга, синаптически связанные с первичным очагом гипервозбуждения (фокусом), и длительное сохранение повышенной судорожной чувствительности.

Наиболее известными *генетическими моделями* эпилепсии являются грызуны со спонтанными абсансными и рефлекторными аудиогенными судорогами.

Инбредные линии крыс GAERS (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg) и WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo from Rijswijk) были селекционированы на основе аутбредной линии Wistar и считаются адекватными моделями *абсансной эпилепсии* (Depaulis, van Luijtelaar, 2005). Для крыс этих линий характерно спонтанное возникновение на ЭЭГ эпилептиформных пик-волновых разрядов (spike-wave discharges, SWD). Во время этих электрографических судорог моторные судорожные проявления отсутствуют, крысы остаются неподвижными, иногда демонстрируя ритмические миоклонические подергивания вибрисс, отмечается сниженная реактивность на внешние стимулы (Coenen et al., 1992; van Luijtelaar, Coenen, 1989; Depaulis, van Luijtelaar, 2005). За более чем двадцать лет исследований на крысах GAERS и WAG/Rij была доказана адекватность этих генетических моделей типичной абсансной эпилепсии человека, в частности, сходство

сетевых (таламокортикальных) механизмов и реактивности на фармакологические препараты (Steriade, 2003; Depaulis, van Luijtelaaar, 2005). В экспериментальных исследованиях на крысах этих линий были выяснены многие детали патогенеза генерализованных абсансных судорог. Так было показано, что разряды абсансной эпилепсии возникают в ограниченной (периоральной) области соматосенсорной коры, функциональные особенности которой предрасполагают ее к генерации осцилляторной активности (Meeren et al., 2002; Manning et al., 2004; van Luijtelaaar, Sitnikova, 2008). Благодаря многочисленным возбуждающим внутрикорковым и кортикоталамическим связям, эпилептическая активность быстро распространяется из этой области в другие отделы коры, а также в ретикулярное и таламокортикальные ядра таламуса, что ведет к инициации патологических осцилляций в этой кортико-таламо-кортикальной сети (Meeren et al., 2002; van Luijtelaaar, Sitnikova, 2008).

Другой генетической моделью генерализованной эпилепсии являются *рефлекторные аудиогенные судороги*, возникающие у грызунов в ответ на звуковую стимуляцию. Они представляют собой уникальную модель для исследования сетевых кортико-стволовых механизмов конвульсивных тонико-клонических судорог.

### **1.3. Аудиогенные судороги**

Аудиогенные судороги (АС), развивающиеся рефлекторно у грызунов в ответ на звуковую стимуляцию, являются одной из наиболее популярных и адекватных экспериментальных моделей генерализованной конвульсивной эпилепсии (*grand mal*) человека (Крушинский, 1949; Faingold, 1999; Семиохина и др., 2006; Jobe, Browning, 2006a). Впервые АС у крыс наблюдали в Вистаровском Институте в США, а у мышей – в лаборатории И.П.Павлова в 1924 году. Использование грызунов в качестве экспериментальной модели для исследования физиологических механизмов эпилепсии было начато Л.В. Крушинским и его коллегами в 1948 году на кафедре биологии развития биологического факультета МГУ (Крушинский, 1949; см. Семиохина и др. 2006).

Предрасположенность к АС у грызунов может быть генетически наследуемым признаком или возникать в результате ранней неонатальной сенситизации (акустического прайминга) (Henry, 1967; Faingold, 1999; Ross, Colemann, 2000). У взрослых животных временная чувствительность к АС

развивается после длительного приема антидепрессантов (алкоголь, барбитураты, бензодиазепины), при системном введении препаратов, усиливающих глутаматергическую передачу, например метафита (Debler et al., 1989), при фармакологической стимуляции стволовых структур, прежде всего нижнего двухолмия (Bagri et al., 1989; Ishimoto et al., 2000; Yang et al., 2001). Аудиогенные судороги являются компонентом абстинентного и постишемического синдромов у крыс (Reid et al., 1996; Faingold et al., 1998), причем ряд данных указывает на сходство механизмов абстинентных тонико-клонических судорог у человека и грызунов (Hunter et al., 1973). Высокая чувствительность к АС описана у крыс в экспериментальной модели шизофрении (Macedo et al., 2010), а также у мышей с мутациями, моделирующими болезнь Альцгеймера (Tg2576) и синдром Дауна (Ts65Dn) (Westmark et al., 2010).

Как и другие рефлекторные судороги, АС являются латентной формой эпилепсии, т.е. в отсутствии специфической стимуляции животное не демонстрирует неврологической патологии, а эпилептический припадок развивается только при действии соответствующего сенсорного стимула.

#### *Линии животных с генетической аудиогенной эпилепсией*

Впервые селекция высокочувствительных к звуковому раздражителю крыс была начата в Л.В. Крушинским и его коллегами (Крушинский, 1949). Результатом этой селекционной работы было создание первой линии крыс с генетической предрасположенностью к АС - линии Крушинского-Молодкиной (КМ), которая в 1980-е годы была переведена в инбредное состояние (Семиохина и др., 1996). Крысы этой линии характеризуются стабильным и высоким уровнем чувствительности к звуку, о чем свидетельствуют короткий латентный период припадка и его максимальная интенсивность (Семиохина и др., 2006).

Среди крыс аутбредных (Wistar, Sprague-Dawley) и некоторых инбредных (WAG/Rij) линий также встречаются особи, предрасположенные к АС (Reigel et al., 1986; Кузнецова, 1998). Они составляют от 10 до 50 % в общей популяции, и обычно демонстрируют АС минимальной интенсивности в виде двигательного возбуждения. На основе линии Wistar были получены три линии крыс с высокой генетической чувствительностью к аудиогенной эпилепсии - Wistar AS (Wistar audiogenic susceptible rats) во Франции (Marescaux et al., 1987),



WAR (Wistar Audiogenic Rat) в Бразилии (Garcia-Cairasco et al., 1993), P77PMС в Китае (Zhao et al., 1985). В США на основе линии Sprague-Dawley была создана линия крыс с генетической аудиогенной эпилепсией GEPR (genetically epilepsy-prone rat) (Jobe et al., 1973). К настоящему времени выделены сублинии с высокой и средней судорожной чувствительностью - GEPR-9 и GEPR-3, соответственно (Reigel et al., 1986). Существуют несколько инбредных линий мышей, чувствительных к АС (DBA/2J, Frings и др.), а также линия эпилептических цыплят (Fayoumi strain), у которых рефлекторные судороги развиваются как при акустической, так и при зрительной стимуляции (Batini et al., 1996).

Крысы ряда линий с высокой чувствительностью к АС также демонстрируют повышенную чувствительность к другим эпилептогенным воздействиям: электроконвульсивной стимуляции, действию конвульсантов (PTZ, пилокарпин), киндлингу, высокой температуре (Savage et al., 1986; Scarlatelli-Lima et al., 2003; Hanaya et al., 2008; Garcia-Cairasco et al., 2004; Ким и др. 2012). Однако спонтанные судороги крайне редки у крыс с генетической аудиогенной эпилепсией (Coffey et al., 1996; Семиохина и др., 2006).

Еще Л.В. Крушинский предположил, что в основе предрасположенности к АС у крыс КМ лежит генетически детерминированное нарушение соотношения возбуждения и торможения в ЦНС (Крушинский, 1960). Генетический анализ показал полигенное наследование чувствительности к АС у крыс КМ и GEPR-9 (Семиохина и др., 2006; Kurtz et al., 2001). Однако у крыс КМ оно происходит по аутосомно-рецессивному типу, а у крыс GEPR-9 - по аутосомно-доминантному. У цыплят с двумя формами (аудиогенной и фотогенной) эпилепсии эпилептический фенотип определяется аутосомно-рецессивной мутацией (Batini et al., 1996). Пока крайне мало информации о конкретных генах, определяющих развитие аудиогенной эпилепсии. У мышей линии DBA/2J чувствительность к АС связана с тремя генами (Neumann, Collins, 1991), а у мышей линии Frings - с одним локусом (MASS1, monogenic AS susceptible) (Skradski et al., 2001). Чувствительность к АС также характерна для мышей, нокаутированных по рецептору серотонина 5-HT<sub>2C</sub> (Tecott et al., 1995; Brennan et al., 1997). Группа В.Г. Колпакова нашла корреляцию между

чувствительностью к АС, врожденной каталепсией и маятникообразными движениями головы (Барыкина и др., 2007).

### ***Феноменология аудиогенного припадка***

Развернутые аудиогенные судороги состоят из нескольких фаз, последовательно сменяющих друг друга и отражающих распространение эпилептической активности в мозге - начального двигательного возбуждения (пароксизмального бега), клонических и тонических судорог. Двигательное возбуждение является характерным и самым регулярным компонентом АС у грызунов, всегда присутствующим в составе припадка. Остальные компоненты АС (клонические и тонические судороги) могут отсутствовать. Двигательное возбуждение может состоять из одного или двух эпизодов, разделенных периодом неподвижности («тормозной паузой»).

Интенсивность АС определяется, прежде всего, исходным уровнем судорожной чувствительности животного и варьирует от минимальной судорожной реакции на звук в виде двигательного возбуждения (балл 1) до развернутого припадка с тонико-клоническими судорогами максимальной интенсивности (балл 4 по шкале Крушинского или балл 9 по шкале Jobe) (Крушинский, 1960; Jobe et al., 1973). Крысы инбредных линий КМ и GEPR-9 в ответ на звуковую стимуляцию всегда демонстрируют судороги максимальной интенсивности (Семиохина и др., 2006; Reigel et al., 1986). Они начинаются интенсивным беспорядочным бегом с высокими прыжками, после чего животное теряет равновесие, и развиваются сильные тонические или клонико-тонические судороги, заканчивающиеся полным вытягиванием всех конечностей. После таких приступов наблюдается поведенческая депрессия с нарушением дыхания, утратой позных и болевых рефлексов, развитием каталепсии (Прокопец, 1958; Galvis-Alonso et al., 2004; Федотова и др., 2008). У крыс со средней интенсивностью АС (сублиния GEPR-3) начальный бег заканчивается генерализованными клоническими судорогами с потерей равновесия (Reigel et al., 1986; Naritoku et al., 1992). У крыс с низкой судорожной готовностью (аудиогенных крыс линий Wistar и WAG/Rij) звук обычно вызывает припадок минимальной интенсивности, состоящий из двухфазного двигательного возбуждения (двух эпизодов бега, разделенных

«тормозной паузой»), редко переходящего в генерализованные клонические судороги (Кузнецова, 1998).

### ***Нейронная сеть аудиогенных судорог***

Для аудиогенных судорог характерна четкая иерархическая организация эпилептической сети. Разные компоненты этой сети играют ведущую роль на каждой из стадий развития припадка, и высоко стереотипная последовательность развития моторных судорог разного типа во время аудиогенного приступа отражает этот сдвиг доминирования структур внутри эпилептической сети АС (Faingold, 2004). Нижнее двухолмие (НД) считается критической структурой в генезе АС, которая инициирует судорожный ответ и развитие начального двигательного возбуждения в разных моделях аудиогенной эпилепсии (генетической, абстинентной, при прайминге). Переход от бега к клонико-тоническим судорогам связывают с распространением патологического возбуждения на моторные центры ствола (нижние слои верхнего двухолмия и околоводопроводное серое вещество) и переключением доминирующей роли к ретикулярной формации (РФ) среднего мозга и моста (Faingold, Randall, 1995; Ishimoto et al., 2000). Структуры переднего мозга не вовлечены в экспрессию однократных аудиогенных судорог, но при повторном вызове судорог эпилептическая сеть расширяется, и в нее вовлекаются лимбические структуры переднего мозга и кора больших полушарий (Семиохина, Федотова, 2002; Garcia-Cairasco et al., 1996; Naritoku et al., 1992).

Информация об организации эпилептической сети АС была получена при изучении электрической активности структур головного мозга во время АС у крыс разных генетических линий. Уже в самых первых электрофизиологических исследованиях на крысах КМ было показано, что первичный очаг АС находится в стволовых отделах головного мозга (Васильева, 1957; Гусельникова, 1959; Семиохина, Цурита, 1974). Картирование структур мозга по экспрессии белка гена немедленного действия *c-fos* подтвердило, что самая ранняя реакция на действие звука у крыс КМ наблюдается в продолговатом мозге (Акуличев и др., 1990). Удаление или временная инактивация моторной и слуховой коры, медиального коленчатого тела не препятствуют развитию АС у этих крыс (Котляр, 1959; Семиохина, 1969).

В работах группы К. Файнголда с регистрацией нейронной активности в различных структурах мозга крыс GEPR было показано, что судорожное

возбуждение начинается с развития гиперактивности нейронов нижнего двухолмия. Активность нейронов НД резко усиливается во время начальной фазы бега и тормозится при развитии тонико-клонических судорог (Raisinghani, Faingold, 2003). Во время тонической фазы АС усиливается импульсная активность нейронов ретикулярной формации и околотоводопроводного серого вещества (N'Gouermo, Faingold, 1998). После окончания АС активность нейронов всех структур эпилептической сети, за исключением стволовой РФ, подавлена (Raisinghani, Faingold, 2003). Таким образом, во время двигательного возбуждения максимально активно НД, во время генерализованных клонических и тонических судорог – нейроны РФ и околотоводопроводного серого вещества.

Сходные результаты были получены при иммуногистохимическом картировании структур головного мозга во время АС разной интенсивности у крыс Wistar-AS (Simler et al., 1999). Во время начального двигательного возбуждения наблюдали активацию главным образом слуховых ядер ствола, а во время развернутого припадка с тоническими судорогами - также глубоких слоев верхнего двухолмия, околотоводопроводного серого вещества и некоторых другие ствольных ядер (Simler et al., 1999).

#### ***Компоненты эпилептической сети аудиогенных судорог***

*Нижнее двухолмие* (НД) является одной из самых чувствительных к эпилептическому возбуждению ствольных структур головного мозга. Электрическая стимуляция НД у «аудиогенных» и нормальных крыс Wistar вызывает локальный судорожный разряд, который сопровождается двигательным возбуждением (McCown et al., 1984, 1987). Причем при раздражении дорсального НД двигательное возбуждение продолжается в течение 2-10 секунд после прекращения стимуляции (Bagri et al., 2005). Инъекция производных цАМФ в НД нормальных крыс (Wistar и Sprague-Dowley) вызывает двигательное возбуждение, идентичное по паттерну начальной фазе АС, хотя такие же инъекции в другие структуры (черную субстанцию, первичную слуховую кору, гиппокамп и др.) не сопровождаются судорожными проявлениями (Ludvig, Moshe, 1987, 1989). У крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией (Bagri et al., 2005), грызунов после прайминга (Ross, Colemann, 2000; Iida et al., 1998) и крыс линии GEPR (Chakravarty, Faingold, 1986) описана хроническая гипервозбудимость НД. Предполагается, что это

может быть связано со сниженной активностью ГАМКергических нейронов (Faingold, 2002), повышенным уровнем глутамата (Ribak et al., 1998) или дисфункцией кальциевых каналов (N'Gouemto et al., 2009). Двустороннее разрушение НД устраняет чувствительность АС у крыс с генетической аудиогенной эпилепсией (Browning 1986). Фокальные инъекции в НД агонистов ГАМК (А) рецепторов тормозят АС у GEPR-9, а введение сюда антагониста этих рецепторов бикикулина уже в минимальной дозе вызывает двигательное возбуждение (Millan et al., 1986; Frye et al., 1986). Предполагается, что повышенная активность нейронов НД на фоне сниженного ГАМК торможения может действовать как механизм запуска АС (Faingold, 2002).

*Глубокие слои верхнего двухолмия* получают проекции из НД и обеспечивают движение глаз на звук. По данным группы К. Файнголда, спонтанная активность нейронов глубоких слоев верхнего двухолмия у крыс GEPR-9 усиливается за 1-2 секунды до начала бега и ослабляется с развитием тонических судорог (Faingold, Randall, 1999). Однако другие группы не нашли признаков вовлечения этой структуры в АС у крыс GEPR (Eels et al., 2004) и AS-Wistar (Simler et al., 1994). У сенситизированных звуком крыс Wistar активация глубоких слоев верхнего двухолмия наблюдается только при развитии генерализованных судорог (Ishida et al., 2002). Перерезки ствола на уровне между нижним и верхним двухолмием, а также разрушение верхнего двухолмия ослабляют клонико-тоническую часть АС у крыс GEPR-9, Wistar, GERP-3, WAR (Doretto et al., 2009; Merrill et al., 2003). Предполагается, что активация глубоких слоев верхнего двухолмия важна для перехода от начального двигательного возбуждения к генерализованным клонико-тоническим судорогам.

*Околотоводопроводное серое вещество (PAG)* входит в состав локомоторного центра среднего мозга (мезэнцефалической локомоторной области) и вовлечено в контроль координированной локомоции (Skinner, Garcia-Rill, 1984). Нейроны PAG демонстрируют тоническую активность во время начального двигательного возбуждения и резко усиливают ее перед началом тонических судорог (N'Gouermo, Faingold, 1998). Фармакологический блок активности нейронов этой структуры тормозит тонический компонент АС у GEPR-9 (N'Gouermo, Faingold, 1999).

*Стволовая ретикулярная формация (РФ)* считается общим субстратом тонических судорог разного генеза у грызунов (Browning, 1994) и человека (Blume, 2006b). Слуховая афферентация РФ участвует в модуляции уровня активации ЦНС (arousal), акустическом стартл-рефлексе и локомоции (Reese et al., 1995), входит в состав дорсальной антиконвульсивной зоны (Merrill et al., 2003). Нейроны РФ особенно активны во время тонуса и постиктальной депрессии у крыс с генетической и приобретенной формами аудиогенной эпилепсии (Faingold, Randall, 1995; Ishimoto et al., 2000). Критическая роль РФ в генезе тонических судорог подтверждена в работах с ее фармакологическим блокированием (N'Gouermo, Faingold, 2000), разрушением (Browning et al., 1985), введением NMDA-антагонистов (Millan et al., 1988), иммуногистохимическим картированием по экспрессии гена *c-fos* (Clough et al., 1997). Предполагается, что гиперреактивность нейронов стволовой РФ на сенсорную стимуляцию в значительной степени определяет чувствительность к АС (Faingold, 2004). Стимуляция стволовой РФ вызывает двигательное возбуждение у нормальных крыс и снижение порога АС у крыс с аудиогенной эпилепсией (Ishimoto et al., 2000). Как и АС, моторные судороги, вызванные стимуляцией стволовой РФ, не сопровождаются эпилептиформной активностью в коре.

В *черной субстанции* крыс AS-Wistar описан конститутивный дефицит ГАМК (А) передачи, но фармакологический блок этой структуры не влияет на паттерн однократных АС у этих крыс (Deransart et al., 2001).

Исследования возбудимости *гинпокампа* – структуры, играющей ключевую роль в патогенезе эпилепсии, - у крыс с аудиогенной эпилепсией дали противоречивые результаты. У крыс линий GEPR и WAR описана

гипервозбудимость гиппокампа (Evans et al., 1994; Verma-Ahuja et al., 1998). Облегченное развитие гиппокампального киндлинга у крыс GEPR (Savage et al., 1986) и долговременной потенциации в гиппокампе мышей DBA/2 и B6 (Wieraszko, Seyfried, 1993) предполагает повышенную возбудимость данной структуры у грызунов с аудиогенной эпилепсией. Однако в гиппокампе аудиогенных крыс Wistar и KM, а также крыс линии Long-Evans, ставших чувствительными к АС в результате прайминга, напротив, описаны повышенные пороги вызова судорожной активности и ослабление долговременной потенциации (Semyanov et al., 1997; Семьянов и др., 1998; Ross et al., 2001). Это указывает на сниженную возбудимость гиппокампа, и, по мнению авторов, отражает действие адаптивных защитных механизмов, предотвращающих распространение судорожной активности, вызванной звуком у этих крыс, в лимбические структуры.

#### ***Нейрохимические особенности крыс с генетической аудиогенной эпилепсией***

У крыс с генетически детерминированной аудиогенной эпилепсией описаны аномалии ряда медиаторных и модуляторных систем. В нижнем двухолмии этих крыс повышено содержание глутамата (Раевский и др., 1995; Ribak et al., 1988) и снижено ГАМК торможение (Faingold, 2002). Фокальные инъекции агонистов ГАМК рецепторов в НД блокируют развитие АС, а такие же инъекции антагонистов ГАМК рецепторов вызывают появление чувствительности к АС у здоровых крыс (Millan et al., 1986; Faingold, 2002). Введение в НД гистамина снижает интенсивности АС у крыс GERP-9 (Feng, Faingold, 2000).

Для крыс с генетической аудиогенной эпилепсией характерно снижение активности моноаминергических систем мозга - дофаминергической (Раевский и др., 1995), норадренергической (Jobe, Dailey, 2000), серотонинергической (Косачева и др., 1998) и гистаминергической (Раевский и др., 1995). Предполагается, что в формировании чувствительности к АС у крыс GEPR важную роль играют не только недостаточность ГАМК торможения в нижнем двухолмии (Faingold, 2002), но и ослабление норадренергической передачи в верхнем двухолмии (Jobe, Dailey, 2000).

Таким образом, подробно исследованный нейроанатомический субстрат и четкие поведенческие корреляты аудиогенного приступа у грызунов, а также использование сенсорной стимуляции для инициации судорог делают АС крайне удобной моделью для экспериментального исследования фундаментальных механизмов эпилепсии. В отличие от большинства других моделей, интенсивность судорожного ответа аудиогенных крыс определяется не столько силой внешнего эпилептогенного воздействия, сколько эндогенными механизмами (врожденной судорожной готовностью, сохранностью внутренних адаптивных механизмов и т.д.), которые могут иметь как патологическую, так и компенсаторную направленность. Это позволяет исследовать на данной модели не только нейрофизиологические механизмы патологического гипервозбуждения головного мозга, но и тормозные процессы, направленные на ослабление эпилептического возбуждения.

#### **1.4. Аудиогенный киндлинг**

##### ***Поведенческий паттерн аудиогенного киндлинга***

Развитие однократных аудиогенных судорог определяется активацией стволовых сетей, и происходит вне зависимости от сохранности структур переднего мозга (Котляр, 1959; Browning, 1986; Marescaux et al., 1987). Однако при повторном вызове АС переднемозговые отделы также рекрутируются в эпилептическую сеть, что ведет к усилению и усложнению судорожного ответа на звук: появлению в коре эпилептиформной активности, а в составе АС - нового типа моторных судорог.

Впервые этот феномен был описан в лаборатории Л.В. Крушинского (Молодкина, 1956; Семюхина, 1958; Крушинский, 1960). При систематическом действии звукового раздражителя у крыс КМ наблюдали появление миоклонических подергиваний, которые начинались с мускулатуры головы, затем охватывали передние лапы, усиливаясь от опыта к опыту и превращаясь в стойкую патологию. Обычно этот миоклонус или, по терминологии Крушинского, тикообразный гиперкинез развивался в конце первой волны двигательного возбуждения или во время тормозной паузы. У взрослых крыс КМ этот новый миоклонический компонент АС появлялся после 10-20 применений звука и сохранялся в течение нескольких месяцев после прекращения систематического звукового воздействия (Молодкина 1956; Семюхина, Федотова, 2002). Крушинский предполагал, что гиперкинез



развивается в результате «функционального ослабления тормозного процесса при наличии очага патологического возбуждения в подкорковой части слухового анализатора» (Крушинский, 1960). Опыты с декортикацией показали, что основная роль в развитии этих миоклонических судорог принадлежит новой коре. Экстирпация или обратимая инактивация коры ослабляла интенсивность миоклонуса, но не меняла характер основной части АС (Котляр, 1959; Семиохина, 1969).

Сходный процесс, получивший название аудиогенного киндлинга (АК), был позже описан у крыс Wistar-AS (Marescaux et al., 1987; Vegnes et al., 1987). После 10-20 повторных аудиогенных припадков в их составе появлялся миоклонус, нараставший по интенсивности и длительности, а в коре при этом регистрировали эпилептиформную активность (Kiesmann et al., 1988). Наблюдали два типа клонических судорог – генерализованный клонус всех конечностей, развивавшийся после тонических судорог, и миоклонус головы и передних лап (клонус «лимбического» типа), появлявшийся после первой локомоторной фазы АС. Авторы рассматривали лимбический клонус как результат трансформации фазы бега.

У крыс линии WAR после 8-10 повторных АС также в составе приступа появляются лимбические судороги (миоклонус головы, клонус передних лап). Как у крыс КМ и Wistar-AS, лимбические судороги у крыс WAR развиваются обычно во время паузы между двумя эпизодами двигательного возбуждения (Garcia-Cairasco et al., 1996; Romcy-Pereira, Garcia-Cairasco, 2003). Появление и интенсификация лимбических судорог в ходе АК у крыс этой линии сопровождаются ослаблением стволового компонента АС: ростом латентности судорог, снижением частоты развития АС при звуковой стимуляции (5 % до АК и 40 % в конце АК) и числа приступов с тоническими судорогами (до 30%) (Garcia-Cairasco et al., 1996; Galvis-Alonso et al., 2004).

Исследования на крысах линии GEPR также показали существование двух фенотипов клонических судорог, развивающихся при повторных АС (Naritoku et al., 1992; Merrill et al., 2005). У крыс GEPR-9 повторение АС максимальной интенсивности с тоническим компонентом вызывало развитие генерализованного клонуса всех лап, так называемого пост-тонического клонуса (ПТК), а у крыс GEPR-3 повторный вызов более мягких АС без тонических

судорог приводил к появлению клонуса лимбического типа. Оба вида клонуса сопровождалась сходной эпилептиформной активностью в коре (Merrill et al., 2005). В специальной серии экспериментов было показано, что поведенческий паттерн клонических судорог, развивающихся при АК, определяется интенсивностью предшествующего им стволового компонента АС (Merrill et al., 2005).

Как уже упоминалось, повторная звуковая стимуляция крыс с генетической аудиогенной эпилепсией может вызывать не только развитие киндлинга, но и обратный процесс - ослабление и даже полное подавление судорожного ответа у крыс линии WAR (Garcia-Cairasco et al., 1996; Galvis-Alonso et al., 2004). Исчезновение АС в повторных тестах также описано у крыс линии GEPR-3 (Naritoku et al., 1992). Такой же тип реагирования на систематическое действие звукового раздражителя наблюдал Л.В. Крушинский у части особей в исходной популяции крыс перед началом селекции линии КМ (Крушинский, 1960). Феномен снижения уровня судорожной готовности при многократных звуковых воздействиях был подробно исследован в лаборатории А.С. Батуева (Батуев и др., 1997) и в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова (Ватаев, 2007). Было показано, что повторение звуковой стимуляции уменьшает вероятность возникновения АС и может вести к длительному снижению реактивности на звуковой стимул у крыс, которые вели происхождение от крыс КМ (Батуев и др., 1997). При ежедневном повторении АС уже с третьего опыта у большинства этих крыс исчезали тонические судороги, а при более частой стимуляции (через 30 мин) к 12-му тесту наблюдалось полное торможение АС (Рябинская, Коротун, 1982). Предполагается, что в основе этого феномена лежит процесс адаптации к систематическому действию эпилептогенного стимула (Батуев и др., 1997, Ватаев, 2005).

### ***Электрографические проявления аудиогенного киндлинга***

Миоклонус, развивающийся при повторном звуковом раздражении крыс КМ (аудиогенном киндлинге), сопровождается генерализованными высокоамплитудными разрядами в коре (Васильева, 1957), внутреннем коленчатом теле (Семиохина, 1958) и стволе (Гусельникова, 1959). У крыс Wistar-AS лимбический клонус также сопровождается высокоамплитудными

спайками или пик-волновыми разрядами на ЭЭГ (Marescaux et al., 1987; Kiesmann et al., 1988). У крыс GEPR-3 и GEPR -9 во время ПТК и лимбического клонуса в коре регистрируется эпилептиформная активность в форме послеразряда (Merrill et al., 2005). У крыс линии WAR при повторных АС эпилептиформный разряд появляется сначала в миндалине и только затем в коре (Moraes et al., 2000) и гиппокампе (Romcy-Pereira, Garcia-Cairasco 2003).

### ***Модификация эпилептической сети аудиогенных судорог при киндлинге***

Первые аудиогенные судороги с тоническим компонентом у крыс Wistar-AS вызывают средне-выраженную c-fos активацию стволовых структур (коры НД, глубоких слоев верхнего двухолмия, PAG), после повторных АС также активируются структуры переднего мозга - латеральные ядра миндалины, периринальная и пириформная кора (после 5 АС), височная кора (после 10 АС), фронто-париетальная и затылочная кора (после 18 АС) и гиппокамп (после 40 АС) (Simler et al., 1999). Картирование локального мозгового кровотока при повторных АС показало его снижение в некоторых областях ствола (слуховые ядра, РФ) и усиление в базолатеральной миндалине (Nehlig et al., 1995).

Миндалина – критическая структура для развития аудиогенного киндлинга. Ее инактивация блокирует ПТК и лимбический клонус, развившиеся в ходе АК у крыс GEPR-9 и Wistar-AS (Naritoku et al., 1992; Hirsch et al., 1997), а химическая стимуляция этой структуры у «нераскачанных» крыс GEPR-9 вызывает развитие ПТК (Rainsighani et al., 2003). Билатеральная инъекция NMDA в амигдалу крыс GEPR-3, не вызывая судорог сама по себе, облегчает возникновение лимбического клонуса после АС (Rainsighani et al., 2003). Активация аденилатциклазы в латеральной миндалине также облегчает развитие аудиогенного киндлинга (Tupal, Faingold, 2010a), а введение сюда ингибитора аденилатциклазы блокирует ПТК у GEPR-9 с уже выработанным киндлингом (Tupal, Faingold, 2010b). Во время ПТК нейроны миндалины переходят к пачечной форме активности (Feng, Faingold, 2002a; Raisinghani et al., 2003). После АК у крыс GEPR усиливается спонтанная активность нейронов миндалины, их реактивность на звук и стимуляцию медиального коленчатого тела (Feng, Faingold, 2002a, b), что отражает повышение возбудимости и усиление эффективности таламо-амигдалярных связей, обеспечивающих акустико-лимбическое взаимодействие (LeDoux et al., 1985). После

аудиогенного киндлинга у крыс WAR описана нейродегенерация нейронов миндалины (Galvis-Alonso et al., 2004), а также усиление нейрогенеза в зубчатой фации гиппокампа (Garcia-Cairasco et al., 1996; Romcy-Pereira, Garcia-Cairasco, 2003).

Таким образом, повторная активация восходящих путей из ствола в передний мозг в ходе АК повышает возбудимость миндалины, облегчая распространение судорог в кору и активируя те же нейронные сети, что и электрический киндлинг миндалины (см. раздел 1.2).

Хотя еще Л.В. Крушинский (1960) считал, что развитие миоклонических судорог при повторных АС «может служить моделью для изучения хронических функциональных нарушений нервной деятельности», до сих пор использование аудиогенного киндлинга в качестве экспериментальной модели эпилептогенеза остается крайне ограниченным. Модель АК не применяется при поиске АЭП и исследовании антиэпилептического действия фармакологических препаратов. Изучение роли медиаторных систем в эпилептогенезе на модели АК в основном ограничивалось экспериментами с фокальным введением фармакологических агентов в миндалину (Naritoku et al., 1992; Hirsch et al., 1997; Tupal, Faingold, 2010 a,b) или черную субстанцию (Deransart et al., 2001).

Между тем поиск антиэпилептогенных препаратов, влияющих на развитие и прогрессивное течение заболевания (замедление прогрессирования, ослабление судорог, предотвращение когнитивных нарушений и развития фармакорезистентности) является одной из самых актуальных задач клинической и экспериментальной эпилептологии. До сих пор не найдены методы лечения, которые могли бы предотвращать или ослаблять эпилептогенез. Наши эксперименты показали, что АК может быть ценным инструментом при изучении как фундаментальных механизмов эпилептогенеза, так и возможностей его фармакологической модуляции. То, что для инициации судорог в этой модели используется только сенсорная стимуляция, а иктогенез и эпилептогенез являются результатом эндогенных процессов, развивающихся в условиях ненарушенной нейрохимической и структурной целостности головного мозга, делает эту модель наиболее приближенной к человеческой патологии.

Традиционно аудиогенный киндлинг вызывают повторением звуковой стимуляции, провоцирующей судороги *максимальной* интенсивности, хотя в классической парадигме киндлинга эпилептизация мозга достигается повторением *минимальной* эпилептогенной стимуляции, исходно вызывающей как можно более слабый и локальный судорожный ответ (Goddard et al., 1969; Racine, 1972). В нашем исследовании мы проверили применимость этой классической парадигмы к модели аудиогенного киндлинга и исследовали возможность формирования киндлинга при повторении минимальных аудиогенных судорог, то есть самого раннего эпизода двигательного возбуждения. Зачастую эта фаза рассматривается как предсудорожное состояние, и при инициации АС и АК звуковая стимуляция продолжается до тех пор, пока полностью не разовьются клонические или клонико-тонические судороги. Для выяснения природы самой ранней фазы АС был проведен электрографический анализ активности коры и НД во время первой фазы двигательного возбуждения у крыс Wistar.

Особенностью нашего исследования было изучение электрической активности коры в широком диапазоне частот, включающем сверхмедленные сдвиги потенциала, для выяснения возможного участия в эпилептогенезе при АК феномена распространяющейся депрессии (РД). Кора является одной из наиболее предрасположенных в генерации РД структур головного мозга, но возможность ее вовлечения в патологические процессы, развивающиеся в коре, как правило, не учитывается из-за методических сложностей ее регистрации. Исследования последних лет на пациентах с различными формами нейропатологии показали, что РД возникает в коре при мигрени, ишемии, субарахноидальной геморрагии (Hadjikhani et al., 2001; Fabricius et al., 2008; Dreier, 2011). Однако вопрос об участии РД в патогенезе эпилепсии человека остается неисследованным, несмотря на большое количество данных о тесной связи РД и судорожной активности, вызванной электрической или фармакологической стимуляцией экспериментальных животных.

### **1.5. Распространяющаяся депрессия**

Распространяющаяся депрессия (РД) представляет собой стереотипную реакцию нервной ткани в виде кратковременной самораспространяющейся интенсивной клеточной деполяризации (Королева и др., 1993; Bures et al., 1974;

Somjen, 2001). Феномен РД был впервые описан в 1944 году бразильским нейрофизиологом А. Леао (Leao, 1944). В его экспериментах электрическая стимуляция коры кролика вызывала временную локальную депрессию ЭЭГ, которая медленно (со скоростью около 3 мм/мин) распространялась по коре от области стимуляции. С тех пор феномен РД был подробно исследован и всесторонне описан. Было показано, что развитие РД связано с множеством обратимых изменений состояния нервной ткани, которые включают локальную деполяризацию клеток, нарушение ионного гомеостаза, падение мембранного сопротивления, депрессию спонтанной и вызванной активности нейронов и др. (Королева и др., 1993; Bures et al., 1974; Somjen, 2001). Внеклеточная концентрация калия во время РД быстро и многократно повышается (с 3 до 30-50 мМ), одновременно падают внеклеточные концентрации натрия, хлора и кальция (Futamachi et al., 1974; Bures et al., 1974; Hablitz, Heinemann, 1979). При этом вода из внеклеточного пространства начинает активно проникать в клетки, вызывая их набухание и сокращение объема внеклеточного пространства. Сильнее всего происходит набухание дендритов и сомы нейронов (Takano et al., 2007). Считается, что во время РД происходит почти полная деполяризация клеточных мембран (Bures et al., 1974). Однако недавно было показано, что деполяризация пирамидных нейронов гиппокампа во время РД остается неполной с сохранением активности дистальных участков дендритов (Cannals et al., 2005). Кортикальная РД вызывает депрессию ЭЭГ, а также спонтанной и вызванной активности нейронов, которая продолжается несколько минут (Bures et al., 1974; Akcali et al., 2010). Во время волны РД локальный кровоток увеличивается вдвое (распространяющаяся гиперемия), а после РД наблюдается его длительное (в течение 1-2 часов) снижение (распространяющаяся олигемия) (Lauritzen, 1987). Хотя входное сопротивление мембраны нейронов во время РД падает (Bures et al., 1974; Cannals et al., 2005), общее электрическое сопротивление ткани нарастает из-за набухания клеток и уменьшения объема межклеточного пространства (Bures et al., 1974; Somjen, 2001).

Считается, что для возникновения РД необходимо локальное повышение концентрации ионов калия во внеклеточной среде, ведущее к деполяризации нейронов и их терминалей. Вызванный этим выброс глутамата и других медиаторов еще больше деполяризует нейроны и запускает авторегенеративный

процесс РД. На срезах гиппокампа показано, что деполяризация всегда начинается в области апикальных дендритов и позже распространяется к soma нейронов (Somjen et al., 1992; Somjen, 2001). NMDA рецепторы играют критическую роль в генерации волны РД (Marranes et al., 1988; Somjen, 2001). Перед началом массивной нейронной деполяризации и развития негативного сдвига постоянного потенциала наблюдается кратковременное возбуждение пирамидных нейронов гиппокампа и новой коры (Herrerias, Somjen, 1993; Herrerias et al., 1994). Оно регистрируется в виде пачки популяционных спайков и предположительно отражает активацию механизмов электротонического взаимодействия пирамидных нейронов на переднем фронте волны РД (Herrerias, Somjen, 1993; Herrerias et al., 1994).

Внеклеточно волна РД регистрируется как высокоамплитудный негативный сдвиг постоянного потенциала, который является наиболее надежным индикатором ее развития в нервной ткани. Амплитуда РД отражает число нейронов, участвующих в деполяризации, а длительность волны РД – скорость реполяризации клеточных мембран. Так как восстановление ионных градиентов после волны РД является энергозависимым процессом, требующим активной работы натрий-калиевой-АТФазы (Bures et al., 1974), длительность деполяризации (волны РД) определяется главным образом энергетическим статусом нервной ткани. При сильной гипоксии, гипогликемии, остановке сердца не происходит реполяризации, и в этом случае говорят о терминальной деполяризации (Somjen, 2001).

Метод вызова РД с помощью поверхностной аппликации или микроинъекции хлористого калия получил наиболее широкое распространение в экспериментальных исследованиях. Однако РД также возникает при многих патологических и экспериментальных ситуациях, ведущих к деполяризации нейронов, таких как прямое механическое воздействие на нервную ткань, тетаническая стимуляция, аппликация ряда химических агентов, гипертермия, повышение внеклеточного уровня калия, ацетилхолина или глутамата, судорожная активность, гипогликемия, гипоксия, локальная ишемия, микроэмболия каротидной артерии (Bures et al., 1974; Drier et al., 2006, 2011; Somjen, 2001; Nozari et al., 2010). Сначала считали, что способность к генерации РД характерна только для мозга, находящегося в патологических условиях (Marshall, 1959). Однако позже было показано, что РД может возникать в

здоровом мозге с хорошим снабжением и оксигенацией, у анестезированных и неанестезированных животных (Van Harreveld et al., 1956; Bures et al., 1974; Королева и др., 1993).

Волна РД возникает и распространяется в сером веществе мозга. Показано, что РД можно вызвать почти во всех отделах ЦНС, хотя одни области мозга более чувствительны к РД, чем другие. Наиболее высокой предрасположенностью к генерации РД обладают поле СА1 гиппокампа и кора больших полушарий (Somjen et al., 1992). Труднее всего РД возникает в стволе и спинном мозге (Somjen, Czeh, 1989; Richter et al., 2008).

Медленная скорость распространения (2-6 мм/мин) и большая длительность (0.5-1 мин) волны РД, ее устойчивость к анестезии и аноксии говорят о том, что основной вклад в распространение РД вносят внесинаптические процессы. Считается, что распространение волны РД в нервной ткани представляет собой диффузионный процесс, опосредуемый неким гуморальным агентом (калием, глутаматом, каким-то другим возбуждающим агентом, их комбинацией), который диффундирует по внеклеточному пространству (Grafstein, 1956; Bures et al., 1974) или внутриклеточно через щелевые контакты между нейронами (Herrerias et al., 1994; Somjen, 2001). РД распространяется по серому веществу в виде волны, останавливаясь в области рубцов и миелиновых прослоек, где снижена плотность нервных мембран (Bures et al., 1974). Скорость движения волны РД зависит от объема внеклеточного пространства, степени миелинизации и плотности нейронов. Она увеличивается при демиелинизации, но не меняется при астроглиозе и воспалении (Merkler et al., 2009). В лизэнцефалическом мозге крыс волна РД, вызванная в одной области коры, легко распространяется несинаптически к другим корковым областям, но не проникает в кору другого полушария. В гирэнцефалическом мозге борозды затрудняют и ограничивают движение волны РД по коре (Marshall, 1959; Bowyer et al., 2001).

РД - очень консервативная реакция в филогенезе позвоночных и может быть вызвана в зрелом мозге практически всех видов млекопитающих (Bures et al., 1974). РД-подобная реакция описана даже у беспозвоночных: в *metothoracic* ганглии саранчи стрессор (аноксия, гипертермия или инъекция калия) вызывает локальное обратимое повышение внеклеточного калия, которое



распространяется по нейропиллю и сопровождается временным подавлением моторной активности (Armstrong et al., 2009). Предполагается, что эта РД-подобная реакция является адаптивным механизмом, временно прекращающим работу нейронных сетей и сохраняющим энергию во время стресса (Rodgers-Garlick et al., 2011).

Поскольку медленный сдвиг потенциала при РД не регистрируется на скальпе из-за емкостного сопротивления мозговых оболочек и черепа, долго существовало ложное представление о том, что в мозге человека РД не развивается. Однако регистрация электрической активности коры с помощью субдуральных электродов дала несомненные доказательства того, что РД регулярно возникает у людей при различных формах патологии головного мозга: субарахноидальных кровоизлияниях, ишемическом повреждении и травме мозга (Fabricius et al., 2008; Dreier, 2011).

Волна РД вызывает быстро развивающиеся и достаточно кратковременные изменения электрической активности нейронов, ионного гомеостаза, сопротивления нервной ткани и кровотока, которые возвращаются к исходному уровню за период от 30-60 сек (ионный гомеостаз) до 1-2 часов (мозговой кровоток). Вместе с тем РД может оказывать очень длительное влияние (до нескольких дней и недель) на активность медиаторных и модуляторных систем, уровень нейротрофических факторов, а также может вызывать эпигенетические модификации хроматина и менять экспрессию генов (Arabia et al., 1998; Kokaia et al., 1993; Shen et al., 2003; Yavich, Ylinen, 2005; Passaro et al., 2010; van Bree et al., 1995).

В нормальном мозге взрослых крыс РД не вызывает нейродегенерации, (Nedergaard, Hansen, 1988), хотя у молодых особей после повторных волн РД может наблюдаться гибель нейронов (Pomper et al., 2006). У взрослых крыс РД стимулирует клеточную пролиферацию (Tamura et al., 2004) и экспрессию нестина (Obrenovich et al., 2002) в коре, а также нейрогенез в гиппокампе (Urbach et al., 2008). Фокальное ишемическое повреждение мозга является генератором повторных волн РД (так называемых периинфарктных деполяризаций), которые могут углублять ишемизацию нервной ткани (Somjen, 2001). Однако в здоровом мозге с нормальной оксигенацией и кровоснабжением РД может возникать многократно, не провоцируя повреждения нейронов и морфологических изменений нервной ткани

(Nedergaard, Hansen, 1988). Более того, предполагается, что РД может играть адаптивную роль, в частности за счет вызываемой ею мощной вазодилатации, улучшающей кровоснабжение нервной ткани.

В настоящее время признано, что РД является патофизиологическим механизмом ауры, а возможно и головной боли, при мигрени (Moscowitz et al., 1993; Lauritzen, 1994). Зрительная аура, предшествующая приступам головной боли у трети пациентов с мигренью, представляет собой зрительные неврологические нарушения в виде мерцаний и «слепых» пятен, которые медленно распространяются по зрительному полю. На основании сходства клинических проявлений мигренозной ауры и нейрофизиологических характеристик корковой волны РД была высказана гипотеза о том, что основой ауры является волна РД (Leao, Morrison, 1945). Исследования пациентов во время приступа мигрени с помощью методов МЭГ и фМРТ подтвердили эту гипотезу (Nadjikhan et al., 2001, Bower et al., 2001). Во время зрительной ауры наблюдали характерное изменение фМРТсигнала распространяющееся по экстрастриарной коре (V3A). Основные характеристики этого сигнала (длительность, скорость и границы распространения по коре) совпадали с характеристиками волны РД. Убедительное подтверждение участия феномена РД в патогенезе мигрени было также получено в ходе генетических исследований одной из форм этого заболевания – семейной гемиплегической мигрени (van den Maagdenberg et al., 2004). У этих больных описаны мутации потенциал-зависимых кальциевых и натриевых каналов, а также натрий-калиевой-АТФазы, у мышей с этими мутациями был описан сниженный порог возникновения в коре волны РД (van den Maagdenberg et al., 2004).

Если участие РД в патогенезе мигренозной ауры является общепризнанным, то по-прежнему дискуссионным остается вопрос о роли РД в развитии головной боли при мигрени. Многие исследователи полагают, что РД может быть стимулом, инициирующим нейrogenное воспаление болевых окончаний. Впервые эта точка зрения была высказана Московичем (Moscowitz, 1984), который предположил, что РД может активировать тригеминальные афференты мозговых сосудов и оболочек, связанные с восприятием ноцицептивной информации. Позже было показано, что корковая волна РД, вызванная эпидуральной аппликацией калия, активирует каудальное ядро тройничного нерва и его сосудистые афференты (Moscowitz et al., 1993).

Несмотря на широкое признание роли РД в патогенезе мигрени, механизмы возникновения РД в коре пациентов с мигренью при отсутствии у них выраженной органической патологии головного мозга остаются непонятными. Предполагается, что РД возникает в результате аномальной активации корковых нейронов (Moscowitz et al., 1993). Действительно, у пациентов, страдающих мигренью, описана гипервозбудимость коры и повышенная чувствительность к различным сенсорным стимулам (Welch et al., 1990; Sorpola et al., 2007), что может облегчать генерацию РД. Однако до сих пор не описано ситуаций, при которых РД возникает спонтанно без какой-либо провоцирующей стимуляции коры.

### **1.6. Распространяющаяся депрессия и судорожная активность**

Тесная связь феномена РД и эпилепсии была очевидна уже в первых наблюдениях Лео (Leao, 1944). Оба феномена связаны с гипервозбудимостью ЦНС, активацией NMDA рецепторов и деполяризационными изменениями мембранного потенциала (Bures et al., 1974; Somjen, 2001).

#### *Возникновение РД при судорожной активности*

Согласно традиционной точке зрения, РД может возникать при интенсивных судорогах как результат недостаточности механизмов удаления избыточного калия - прежде всего, активности натрий-калиевой-АТФазы (Bures et al., 1974; Mody et al., 1987; Somjen et al., 1992). Максимальная концентрация ионов калия во внеклеточной среде во время судорожной активности не превышает 9-12 мМ и отражает динамическое равновесие между выбросом и удалением калия из внеклеточной среды во время интенсивной нейронной активности. При превышении этого так называемого «потолкового» уровня запускается каскад событий с положительной обратной связью, которые ведут к резкому повышению внеклеточной концентрации ионов калия, клеточной деполяризации и развитию РД (Futamashi et al., 1974; Somjen et al., 1992). Однако показано, что РД может легко возникать при коротких и достаточно слабых судорогах, например в ответ на один интериктальный спайк (Koroleva, Bures, 1983; Королева и др., 1993) и даже в отсутствие судорожной активности (Kohling et al. 2003, Van Harreveld, Stamm, 1955). Так, локальный фокус эпилептической активности, созданный в коре крыс эпидуральной аппликацией пенициллина, может быть генератором периодических волн РД, которые тормозят эпилептическую активность пенициллинового фокуса (Koroleva,

Bures, 1983). Регулярное возникновение корковой РД также наблюдали при появлении первых эпилептиформных спайков после системного введения РТЗ (Koroleva et al., 1993). В срезах коры здоровых крыс волны РД легко возникают спонтанно уже при небольшом ослаблении ГАМК торможения, вызванном добавлением в среду небольшого количества бикикулина, подпорогового для инициации судорожной активности (Kohling et al. 2003). Механизмы возникновения РД в условиях слабого и кратковременного эпилептического возбуждения нервной ткани остаются неясными.

#### *Влияние РД на судорожную активность*

Еще Ван Харревельд и Стамм (van Harreveld, Stamm; 1955) предположили, что волны РД, возникающие при судорожной активности, могут быть механизмом постиктальной депрессии ЭЭГ. В их экспериментах было показано, что, если судороги заканчиваются волной РД, то наблюдается длительная постиктальная депрессия ЭЭГ, тогда как в отсутствие РД судорожная активность вызывает только кратковременное подавление корковой активности (Van Harreveld et al., 1956; Koroleva et al., 1993; Королева и др., 1993). Волна РД, вызванная прямой стимуляцией коры, временно тормозит судороги абсансного типа у экспериментальных животных (Avoli, Gloor, 1981; Gloor et al., 1979) и спонтанную ритмическую активность в срезах эпилептической ткани человека (Gorji, Speckmann, 2004). Интересно, что в последнем случае после периода торможения ритмической активности эпилептических срезов происходит ее экзальтация. Это согласуется с данными о двухфазных изменениях эффективности синаптической передачи после волны РД с начальной кратковременной (3-5 мин) депрессией и последующей долговременной потенциацией (Berger et al., 2008).

Несмотря на множество доказательств тесной взаимосвязи волны РД и эпилептической активности, механизмы и закономерности этой связи до сих пор остаются неясными. Судорожная активность может, как облегчать, так и тормозить возникновение РД. Волна РД, в свою очередь может и тормозить, и провоцировать судорожную активность. По мнению одного из наиболее авторитетных исследователей феномена РД Джорджа Сомьена, возникновение того или другого типа ответа (РД или судорожной активности) в ответ на стимуляцию нервной ткани происходит непредсказуемым образом, и это каким-

то (пока непонятным) образом связано с состоянием самой ткани (Somjen et al., 1992). Наше предыдущее исследование взаимоотношений РД и эпилептической активности на модели фармакологического (PTZ) киндлинга показало, что РД регулярно возникает в коре уже после первых системных введений PTZ и участвует в формировании постиктального торможения судорожной активности (Королева и др., 1993; Koroleva et al., 1993). В этой модели волна РД возникала в коре обоих полушарий уже при появлении первых эпилептических спайков, предшествующих развитию тонико-клонических судорог, что указывало на чрезвычайно низкие пороги инициации РД в коре больших полушарий бодрствующих животных.

В нашем исследовании проверялась гипотеза об участии волны РД в эпилептогенезе и постиктальных изменениях корковой активности в ходе аудиогенного киндлинга, при котором эпилептическое возбуждение коры является результатом синаптической активации кортикопетальных связей в отсутствие дополнительных фармакологических воздействий.

## ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Животные

В работе использовали половозрелых крыс линий Крушинского-Молодкиной (КМ), WAG/Rij и Wistar весом 250-500 г. Крысы линии КМ были получены из вивария биологического факультета МГУ, крысы Wistar – из питомника «Столбовая» (Московская область), крысы WAG/Rij - из вивария Института ВНД и НФ РАН. Крыс содержали по 5 особей в клетке (интактные животные) или в индивидуальных клетках (крысы с вживленными электродами). Все животные находились в контролируемых условиях (12-часовой световой день с 7 часов утра, 20-23° С) при свободном доступе к пище и воде.

Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС) и одобренных Комитетом по медицинской этике в соответствии с положением Института ВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Чувствительность к АС у крыс линий Wistar и WAG/Rij определяли в ходе предварительного скрининга (по крайней мере, за 2 недели до начала эксперимента). К аудиогенным относили особей, у которых звуковой раздражитель вызывал судорожную реакцию (по крайней мере, двигательное возбуждение). Крысы, у которых звук не вызывал судорожного ответа, включали в контрольную группу неэпилептических животных.

### 2.2. Методы инициации аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга

Для инициации аудиогенных судорог использовали широкополосный акустический сигнал (13-85 кГц, 50-60 дБ), создаваемым электромеханическим виброустройством с закрепленными на нем металлическими ключами. Данное устройство обеспечивало стабильные характеристики звукового сигнала, что было подтверждено повторными измерениями на кафедре гидроакустики физического факультета МГУ. Анализ параметров этого звукового сигнала показал, что интенсивность звука составляет 50-60 дБ, а основная часть его спектра лежит в диапазоне от 13 до 85 кГц (с максимумом в ультразвуковой области 20-40 кГц) (Кузнецова, 1998). Известно, что грызуны, в том числе крысы, обладают высокой чувствительностью к ультразвуку (Kelly, Masterton,

1977), и максимальная чувствительность к звуковому раздражителю крыс с аудиогенной эпилепсией лежит в диапазоне высоких частот - 14-16 кГц (Крушинский, 1960). Показано, что ультразвуковая стимуляция наиболее эффективна для инициации АС (Frings, Frings, 1952), а звуковой стимул «звон ключей» более эффективен в этом отношении, чем электрический звонок (Ishimoto et al., 2000).

Звуковые стимулы, используемые для вызова АС, длились 60 секунд или прерывались сразу после начала двигательного возбуждения. Звуковую стимуляцию проводили в экспериментальной камере (60 x 60 x 60 см) при непрерывной видеорегистрации поведения. В каждом опыте измеряли латентность, общую длительность и интенсивность АС, а также длительность каждой фазы припадка. Латентный период (ЛП) судорог определяли как интервал времени между включением звуковой стимуляции и началом двигательного возбуждения. Общая длительность припадка определялась как время, занятое моторными судорогами. Длительность каждой фазы АС (двигательного возбуждения, тонических и клонических судорог) определялась как время, занятое определенным типом моторных судорог.

Интенсивность аудиогенных судорог оценивали по 4-балльной шкале Крушинского (Крушинский, 1960) или 9-балльной шкале Jobe (Jobe et al., 1973). Согласно шкале Крушинского: балл 1 – двигательное возбуждение, балл 2 – клонус всего тела (на животе), балл 3 – клонико-тонические судороги (на боку), балл 4 – максимальные тонические судороги с вытягиванием всех конечностей. В 9-балльной шкале Jobe'а минимальный и максимальный баллы те же, что в шкале Крушинского, но разделены припадки с одним или двумя эпизодами двигательного возбуждения, а также проведена более подробная градация тонических судорог (Reigel et al., 1986). Согласно шкале Jobe: балл 1 – бег (двигательное возбуждение) без клонических и тонических судорог; балл 2 – двухфазный бег с клонусом; балл 3 – однофазный бег с клонусом; балл 4 – двухфазный бег с тонусом шеи, тела и передних лап и клонусом задних лап; балл 5 – то же самое, но после однофазного бега; баллы 6, 7 – двух- и однофазный бег с тонусом тела без вытягивания задних лап; баллы 8,9 – двух- и однофазный бег с полным тоническим вытягиванием всех лап. Мы использовали главным образом 9-балльную шкалу Jobe, поскольку она

позволяет более точно оценить интенсивность клонико-тонической части аудиогенного припадка, что важно при анализе влияния фармакологических препаратов на интенсивность АС.

Интенсивность лимбических судорог определяли по 5-балльной шкале Racine (1972). Согласно этой шкале, балл 1 – миоклонус лицевой мускулатуры, балл 2 – клонус головы, балл 3 – клонус головы и передних лап, балл 4 – клонус головы и передних лап в позе кенгуру, балл 5 – клонус в позе кенгуру с потерей равновесия.

При формировании аудиогенного киндлинга крыс подвергали повторной звуковой стимуляции. Крысам КМ предъявляли 15 звуковых стимулов с интервалом 1-2 дня, крысам Wistar и WAG/Rij – до 50 стимулов с интервалом 2-3 дня. Поведенческим критерием развития АК было появление после окончания припадка дополнительной фазы клонических судорог – клонуса лимбического типа (миоклонуса головы и/или клонуса передних лап) у крыс Wistar и WAG/Rij или посттонического клонуса (ПТК, генерализованного клонуса всех конечностей и головы в положении в положении лежа) у крыс КМ.

### **2.3. Электрофизиологические методы**

Исследование электрографической активности во время АС и АК проводили в условиях хронического эксперимента на бодрствующим свободно подвижным крысам линий Wistar и WAG/Rij. Регистрацию электрической активности головного мозга проводили в широком диапазоне частот, включая сверхмедленные сдвиги потенциала.

#### *Имплантация регистрирующих электродов*

Вживление регистрирующих электродов проводили под наркозом (chloral hydrate, 300 мг/кг, внутривенно) с анестезированием мягких тканей головы 2% раствором новокаина.

Для записи ЭЭГ использовали стальные винты, помещенные на кость над фронтальной и/или париетальной корой обоих полушарий. Для регистрации волны РД (высокоамплитудного медленного сдвига потенциала) в хроническом эксперименте применяли специально сконструированные стеклянные электроды с внутренним карбоновым волокном (диаметр кончика 50-100 мкм). Электроды изготавливались из стеклянного капилляра, внутрь которого помещали пучок



карбоновых волокон (Королева и др., 1993). При входном сопротивлении усилителя постоянного тока 1 ГОм, используемого в наших экспериментах, эти электроды были практически неполяризуемыми. Ранее в специальной серии опытов с одновременной регистрацией электрической активности коры карбоновым и классическим неполяризуемым каломельным электродами была продемонстрирована идентичность формы и амплитуды сдвигов постоянного потенциала, зарегистрированных этими типами электродов во время волны РД (Королева и др., 1993). Таким образом, карбоновые электроды позволяют без искажений регистрировать волну РД у свободно подвижных животных. Для оценки пространственных характеристик волны РД электроды вживляли во фронтальную, париетальную и затылочную области коры обоих полушарий.

В серии экспериментов с регистрацией электрической активности нижнего двухолмия использовали электроды, изготовленные из нихромовой проволоки в заводской изоляции, которые имплантировали билатерально в центральное ядро нижнего двухолмия (AP 8.8; L 1.5; V 2.5) (Paxinos, Watson, 1986).

Стальной винт над мозжечком использовали в качестве индифферентного электрода. Электроды фиксировали на черепе животного с помощью быстроотвердевающей пластмассы (акрилоксид). Опыты начинали через две недели после операции. По окончании эксперимента контроль локализации кончиков электродов проводился на фронтальных срезах мозга, окрашенных по методу Ниссля.

#### *Регистрация электрической активности головного мозга в хроническом эксперименте*

В экспериментах с регистрацией электрической активности головного мозга крысу помещали в экспериментальную камеру (60x40x40 см) и вживленные электроды соединяли с кабелем. Сигнал с электродов подавали на вход 6-канального усилителя постоянного тока с входным усилением 1 ГОм, а затем на АЦП (E14-440, L-Card, Россия). После 30-минутного периода габитуации и 20-минутного периода фоновой записи ЭЭГ крыс Wistar подвергали звуковой стимуляции. У крыс WAG/Rij фоновую ЭЭГ записывали в течение одного часа и определяли среднюю длительность абсансных судорог за

20-мин период для каждой крысы. Поведение крыс до, во время и после стимуляции регистрировали на видеокамеру.

Регистрация, визуализация и обработка электрографических данных осуществляли с помощью программного обеспечения PowerGraph (ООО «Интероптика-С», Россия). Данные оцифровывали с частотой 2 кГц, электрическую активность в диапазоне от 0 до 45 Гц анализировали off-line. В некоторых опытах сверхмедленные сдвиги потенциала (волну РД) регистрировали на быстродействующем самописце Н-3030 (Россия).

Проводили визуальную оценку полученных ЭЭГ сигналов при разной скорости развертки, сопоставление с данными видеорегистрации поведения и спектральный анализ ЭЭГ сигнала с помощью быстрого преобразования Фурье (для 2-сек безартефактных отрезков записи).

#### **2.4. Нейрофармакологические методы**

Фармакологические исследования проводили с использованием следующих препаратов: антагониста эндоканнабиноидных рецепторов CB1 SR 141716 (Solvay Pharmaceuticals Weesp, the Netherland), неселективного агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212-2 (Tocris Cookson Ltd., Bristol, UK), блокатора ГАМК-трансаминазы вигабатрина (Sabril; Yamanuchi Pharma BV, Leiderdorp, The Netherland), блокатора гистамин-N-метилтрансферазы метоприна (GlaxoSmithKline, Stevenage, UK) и антиэпилептического препарата второго поколения леветирацетама (USB Pharma, Braine-l'Alleud, Belgium).

SR 141716 и WIN55212 растворяли в оливковом масле, метоприн – в 1 % растворе молочной кислоты, вигабатрин и леветирацетам – в физиологическом растворе.

SR 141716 вводили интрагастрально, WIN55212 подкожно, остальные препараты внутривенно.

Крысы получали повторные ежедневные инъекции SR 141716 (30 мг/кг) в течение 5 дней, однократную инъекцию WIN55212 (4 мг/кг) за 1 час до четвертой звуковой стимуляции, однократную инъекцию вигабатрина (100 или 200 мг/кг) за 2, 4 или 24 часа до тестирования звуком, однократную инъекцию метоприна (10 мг/кг) за 4 или 24 часа до тестирования звуком, однократную

инъекцию леветирацетама (3, 6 или 50 мг/кг) за один час до тестирования звуком.

Контрольным животным по той же схеме вводили физиологический раствор или соответствующий растворитель.

## **2.5. Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6 (StatSoft Inc., USA). Для сравнения выборок по частоте встречаемости события (АС, РД, АД) использовали тест Фишера. Влияние фармакологических препаратов и различных факторов на характеристики АС определяли с помощью непараметрических (Wilcoxon, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis) и параметрических (t-критерий Стьюдента) критериев. Статистический анализ параметров повторных АС и влияния на них фармакологических препаратов проводили с использованием методов дисперсионного анализа (ANOVA for repeated measures). Данные выражали как среднее  $\pm$  SEM.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Фенотипический анализ эпиленптогенеза на модели аудиогенного киндлинга

Работы с использованием методов перерезки и разрушения мозговых структур показали тесную связь фенотипа моторных судорог грызунов с их анатомическим субстратом (Browning et al., 1985; Browning, 1986). Разрушение связей между стволом и передним мозгом блокирует клонус лимбического типа, но не влияет на паттерн основных компонентов АС - двигательного возбуждения, генерализованных тонических и клонических судорог (Browning et al., 1999). Независимость анатомических субстратов переднемозговых и стволовых судорог подтверждена при картировании c-fos-иммунореактивности во время судорог разного генеза, в том числе вызванных звуком, электрошоком, PTZ, электрической стимуляцией (Eels et al., 2004). Показано, что именно вовлечение структур переднего мозга и ствола в эпилептическую сеть, а не интенсивность и характер эпилептогенной стимуляции, определяет фенотип судорог. При этом стволовые и переднемозговые судорожные сети опосредуют разные типы конвульсивного поведения: лимбический клонус связан с преимущественной активацией структур переднего мозга, а генерализованные тонические и клонические судороги – с возбуждением стволовых отделов.

Тесная связь поведенческого паттерна аудиогенных судорог с их анатомическим субстратом и использование сенсорной стимуляции для инициации этих судорог позволяют проводить фенотипический анализ иктогенеза и эпилептогенеза на интактных животных.

#### *3.1.1. Сравнительный анализ структуры аудиогенных судорог у крыс линий КМ, Wistar и WAG/Rij*

Подробный анализ структуры и особенностей АС у крыс линии КМ с высокой судорожной чувствительностью был проведен в лаборатории Л.В.Крушинского на биологическом факультете МГУ (Крушинский. 1960; Семиохина и др., 2006). Характеристики аудиогенных приступов у крыс линий Wistar и WAG/Rij подробно описаны Г.Д. Кузнецовой (Кузнецова, 1998). При этом для инициации АС всегда использовалась длительная звуковая стимуляция, которая продолжалась до начала тонических/клонических судорог или до момента их максимального развития. Если звук вызывал только

двигательное возбуждение, то он длился не менее 60-90 секунд. В наших экспериментах исследовали реакцию крыс KM, Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией на максимально короткую акустическую стимуляцию (прекращающуюся сразу после начала двигательного возбуждения), и сравнивали эту реакцию с судорожным ответом на длительное (60-сек) звуковое раздражение той же интенсивности (50-60 дБ).

## Результаты

У крыс KM с высокой чувствительностью к АС приступ начинался коротким и интенсивным бегом с высокими и частыми прыжками, после чего крыса теряла равновесие, и развивались генерализованные клонико-тонические судороги максимальной интенсивности (балл 4 по шкале Крушинского или балл 9 по шкале Jobe). Параметры и интенсивность АС у крыс KM не зависели от продолжительности звуковой стимуляции: и длительный, и короткий звук вызывали у большинства этих крыс (88% и 87%, соответственно) одинаковые припадки с максимальными клонико-тоническими судорогами ( $8.7 \pm 0.2$  и  $8.5 \pm 0.4$  балла, соответственно).

У крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией продленная звуковая стимуляция (60 сек) чаще всего вызывала судороги, состоящие только из двигательного возбуждения - двухфазного бега (балл 1). Первая фаза представляла собой короткий (4-7 сек) медленный бег без прыжков, который внезапно обрывался, и животное замирало. После 20-25-секундного периода неподвижности (паузы) начиналась вторая фаза более продолжительного (около 20 сек) и интенсивного бега с высокими прыжками. Иногда вторая волна двигательного возбуждения завершалась потерей равновесия и клоническими судорогами всех конечностей в положении на животе или на боку (у 30 % крыс Wistar и 41 % крыс WAG/Rij). Сокращение длительности звуковой стимуляции приводило к резкому снижению интенсивности АС крыс Wistar и WAG/Rij: при прекращении раздражения сразу после начала первой фазы бега вторая волна двигательного возбуждения не развивалась, и реакция на звук ограничивалась одним эпизодом короткого мягкого бега. Этот бег не отличался по своему паттерну и длительности от первой фазы двигательного возбуждения, вызванного продленной звуковой стимуляцией:  $5.6 \pm 0.5$  и  $5.3 \pm 0.4$  сек, соответственно, для крыс Wistar и  $5.8 \pm 0.3$  и  $6.3 \pm 0.3$  сек для крыс WAG/Rij. То

есть, короткой звуковой стимуляции было достаточно для полного развития первой фазы бега (то есть минимального судорожного ответа на звук) у крыс Wistar и WAG/Rij.

Параметры судорожных приступов, вызванных длительным (60 сек) и коротким звуковым стимулом у крыс линий Wistar, WAG/Rij и КМ, приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Параметры аудиогенных судорожных приступов у крыс линий Wistar, WAG/Rij и КМ.

	ЛП (сек)	1-я фаза бега (сек)	Пауза (сек)	2-я фаза бега (сек)	Клонико-тонические судороги (сек)	Интенсивность АС (балл по шкале Jobe) <sup>3</sup>
<i>Длительный стимул<sup>1</sup></i>						
КМ (n=30)	6.2±0.6	4.3±0.2	-	-	18.5±0.6	8.7±0.2
Wistar (n=27)	12.3±1.6 *	5.6±0.5 *	24.7±1.1	21.3±2.2	9.7±0.8 **	1.4±0.1 **
WAG/Rij (n=42)	13.6±1.1 *	5.8±0.3 *	22.8±0.9	19.8±2.7	9.7±1.2 **	1.6±0.1 **
<i>Короткий стимул<sup>2</sup></i>						
КМ (n=25)	6.3±0.9	4.3±0.3	-	-	19.4±0.5	8.5±0.4
Wistar (n=21)	13.8±0.7 *	5.3±0.4 *	-	-	-	1.0±0.1 ## **
WAG/Rij (n=31)	14.5±1.4 *	6.3±0.3 *	-	-	-	1.0±0.1 ## **

<sup>1</sup> – звук длительностью 60 сек; <sup>2</sup> - звук, обрывающийся сразу после начала бега; <sup>3</sup> - 9-балльная шкала Jobe (Jobe et al., 1973).

\* - p<0.05, \*\* - p<0.005 - достоверные межлинейные отличия (критерий Mann-Whitney), ## - p<0.005 - достоверное отличие от судорог, вызванных длительным стимулом (критерий Mann-Whitney).

Межлинейное сравнение параметров АС показало идентичность судорожных реакций на звук у крыс Wistar и WAG/Rij при их существенном отличии от паттерна АС у крыс КМ. При любой длительности звуковой стимуляции у крыс Wistar и WAG/Rij латентность и длительность начального бега была достоверно выше, а тонико-клонические судороги короче и слабее, чем у крыс КМ (таблица 1).

Исследование внутрилинейных различий (сравнение припадков разной интенсивности у крыс одной и той же линии) показало, что развитие тонических и клонических судорог значительно влияет на длительность предшествующей им локомоторной фазы АС. У крыс КМ длительность бега, прекратившегося самостоятельно (без клонико-тонических судорог), была вдвое больше (10.7±0.6 сек), чем продолжительность бега, закончившегося тоническими судорогами (4.1±0.1 сек) (таблицы 1, 2, p<0.0005, Mann-Whitney тест). У крыс Wistar длительность второго эпизода бега была вдвое короче в том случае, если за ним следовали генерализованные клонические судороги, (12.7±1.4 сек) по

сравнению с эпизодами двигательного возбуждения, не закончившимися клонусом ( $23.0 \pm 2.4$  сек) ( $p < 0.0005$ , Mann-Whitney тест). Таким образом, развитие генерализованных клонических и клонико-тонических судорог значительно сокращает длительность предшествующего им двигательного возбуждения.

**Таблица 2.** Латентность и длительность двигательного возбуждения (бега) во время аудиогенных судорог (АС) разной интенсивности у крыс КМ.

	Максимальные АС (балл 9)	Минимальные АС (балл 1)
ЛП (с)	$5.4 \pm 0.3$	$6.8 \pm 0.9$
Длительность бега (с)	$4.1 \pm 0.1$	$10.7 \pm 0.6$ ***

\*\*\* -  $p < 0.0005$  относительно длительности бега при максимальных АС (Mann-Whitney test);  $n=84$  для максимальных АС и  $n=22$  для минимальных АС.

### Обсуждение

Поведенные эксперименты показали, что у крыс КМ звук любой длительности вызывает развернутые стволовые судороги максимальной интенсивности, тогда как у крыс Wistar и WAG/Rij интенсивность и паттерн АС зависят длительности звукового стимула.

Как известно, у крыс КМ судорожная реакция на звук очень стабильна, развивается быстро и почти всегда завершается клонико-тоническими судорогами максимальной интенсивности с полным вытягиванием всех конечностей (Крушинский, 1960; Семиохина и др., 2006). Наши эксперименты показали, что выраженность припадков у крыс КМ не зависит от длительности звуковой стимуляции, и даже короткий звук, обрывающийся с началом бега, вызывает у них припадок максимальной интенсивности (4 балла по шкале Крушинского или 9 баллов по шкале Jobe). Короткий латентный период АС с быстрым переходом от начального локомоторного возбуждения к интенсивным тонико-клоническим судорогам свидетельствует о высокой судорожной чувствительности этих крыс (Крушинский, 1960; Семиохина и др., 2006). Слабость тормозных процессов, характерная для этих крыс (Крушинский, 1960), видимо, определяет быструю иррадиацию эпилептического возбуждения (в пределах ствола) и развитие тонико-клонических судорог даже при прекращении эпилептогенной звуковой стимуляции.

Характеристики АС у крыс Wistar и WAG/Rij (длительный ЛП, низкая интенсивность судорог, двухфазный паттерн двигательного возбуждения) указывают на относительно низкую возбудимость стволовых субстратов АС и

сохранность эндогенных тормозных механизмов у этих животных. Удлинение латентности и снижение тяжести АС, как известно, являются индикатором ослабления процесса патологического возбуждения, вызванного звуком, и/или усиления тормозных процессов. Как показано в исследованиях лаборатории В.Л. Крушинского, пауза в составе АС отражает процесс активного торможения, который развивается в ответ на начавшееся возбуждение ЦНС и направлен на прекращение патологической активации мозга (Крушинский, 1960). Эти тормозные механизмы могут полностью прекратить первую волну двигательного возбуждения, определив, таким образом, длительность его первой фазы. При продолжении эпилептогенной стимуляции происходит «истощение» активного тормозного процесса, что ведет к возобновлению двигательного возбуждения после паузы. Окончание этой второй волны двигательного возбуждения и связанных с ней клонических судорог происходит уже в результате развития запредельного торможения (Крушинский, 1960). Опыты с фармакологической модуляцией АС у крыс КМ подтвердили критическую роль тормозных механизмов в поведенческом паттерне этих судорог (Крушинский, 1960; Зорина, Флесс, 1968).

Таким образом, характер судорожного ответа на звук у крыс с аудиогенной эпилепсией определяется взаимодействием патологических (проэпилептических) и компенсаторных (антиэпилептических) механизмов. Быстрая генерализация возбуждения во время АС у крыс КМ, происходящая даже при короткой звуковой стимуляции, отражает недостаточность тормозных механизмов. Медленное развитие аудиогенных судорог с большим латентным периодом и длительной паузой в составе припадка у крыс Wistar и WAG/Rij свидетельствуют об относительной сохранности адаптивных механизмов, активно тормозящих эпилептическое возбуждение при звуковой стимуляции.

Окончание начальной локомоторной фазы может быть не только результатом активного внутреннего торможения, но и дальнейшего развития припадка с переходом к более интенсивному эпилептическому возбуждению. Если в первом случае длительность аудиогенного бега определяется силой внутренних тормозных процессов, ограничивающих патологическую активацию ствола (Крушинский, 1960), то во втором случае длительность начального двигательного возбуждения определяется скоростью развития клонико-тонических судорог. Наши опыты показали, что развитие клонико-тонических



судорог в ходе аудиогенного приступа сокращает длительность начального бега, и короткая длительность двигательного возбуждения при интенсивных АС у крыс КМ связана со стремительным развитием клонико-тонических судорог, обрывающих бег.

Двигательное возбуждение является самым постоянным компонентом аудиогенного припадка, и первая локомоторная фаза двухволнового АС представляет собой минимальную судорожную реакцию на звук у животных с аудиогенной эпилепсией.

Считается, что начальное двигательное возбуждение отражает эпилептическую активацию нижнего двуххолмия (НД) и представляет собой форму координированного клонуса. У крыс КМ во время двигательного возбуждения в слуховых отделах ствола были записаны эпилептиформные разряды типа пик-волна (Гусельникова, 1959). Иммуногистохимическое картирование аудиогенных судорог у крыс Wistar показало, что двигательное возбуждение без клонико-тонических судорог сопровождается более слабой и локальной активацией стволовых отделов мозга, чем при развернутом аудиогенном припадке максимальной интенсивности (Simler et al., 1999; Ishida et al., 2002).

Нижнее двуххолмие характеризуется высокой внутренней эпилептогенностью, то есть склонностью к гиперсинхронному патологическому возбуждению (Faingold, 2002). Локальная электрическая стимуляция этой стволовой структуры у неэпилептических крыс легко вызывает фокальный эпилептиформный разряд, который сопровождается двигательным возбуждением, сходным с тем, что развивается при звуковой стимуляции крыс с аудиогенной эпилепсией (McCown et al., 1984, 1987). Еще Крушинский предполагал, что начальная локомоторная фаза АС является результатом иррадиации возбуждения из слуховых отделов ствола в его двигательные центры (Крушинский, 1960). Действительно, НД является не только центральным стволовым отделом слуховой системы, но и входит в состав мезэнцефалической локомоторной области (Шик и др., 1967; Орловский, 1969). Электрическая стимуляция структур, входящих в эту область, вызывает контролируемую локомоцию (Skinner, Garcia-Rill, 1984; Garcia-Rill, 1986). Интенсивная активация структур мезэнцефальной локомоторной области во время АС была описана у крыс GEPR (Clough et al., 1997).

Длительность эпизода аудиогенного бега, прекратившегося самостоятельно, а не в результате развития более интенсивных клонико-тонических судорог, отражает «истинную» продолжительность самоподдерживающегося эпилептического возбуждения НД, инициированного звуковой стимуляцией. У крыс Wistar и WAG/Rij длительность такого одиночного эпизода аудиогенного бега составляет 5-6 сек, у крыс КМ – 10-11 сек. Это различие видимо, связано с разной возбудимостью стволовых субстратов АС и/или сохранностью эндогенных тормозных механизмов у крыс этих линий.

Таким образом, короткий звук, используемый в наших экспериментах, выступает только как триггер аудиогенных судорог, тогда как их выраженность и окончание полностью определяются эндогенными процессами (врожденной предрасположенностью к судорогам и активностью компенсаторных механизмов). Полученные данные показали, что такая стимуляция вызывает развернутые АС максимальной интенсивности у крыс КМ (балл 9) и минимальные АС у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией (балл 1).

### ***3.1.2. Сравнительный анализ чувствительности к аудиогенному киндлингу (хроническому эпилептогенезу) крыс линий КМ, Wistar и WAG/Rij***

Аудиогенный киндлинг (АК) является удобной экспериментальной моделью эпилептогенеза, в которой прогрессивная эпилептизация мозга достигается повторной звуковой стимуляцией животных с рефлекторной аудиогенной эпилепсией. При повторном вызове аудиогенных судорог и формировании АК происходит распространение судорожной активности из ствола в передний мозг, что на поведенческом уровне выражается в появлении после окончания стволовой части припадка (тонических судорог или бега) дополнительной фазы клонических судорог. При повторении максимальных АС у крыс КМ и GEPR-9 с высокой судорожной чувствительностью после окончания тонических судорог начинают развиваться клонические подергивания всех конечностей в положении лежа (пост-тонический клонус), ранее отсутствовавшие в составе припадка. Повторный вызов субмаксимальных АС без тонических судорог (крысы Wistar, GEPR-3) ведет к развитию после окончания основной стволовой части припадка судорожной активности нового типа - лимбического клонуса, то есть клонических подергиваний головы и передних лап без потери равновесия. Аудиогенный киндлинг описан у крыс

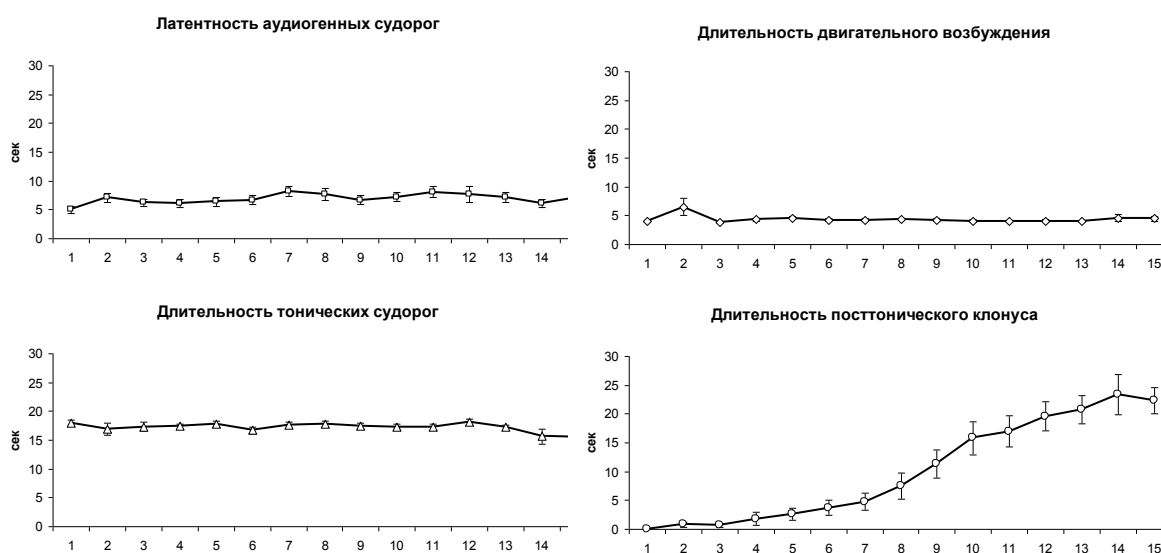
разных генетических линий с высокой и средней чувствительностью к АС: крыс КМ (Крушинский, 1960; Romanova et al., 1993; Федотова, Семиохина, 2002), GEPRs (Naritoku et al., 1992), Wistar AS (Marescaux et al., 1987; Hirsch et al., 1997) и WAR (Garcia-Cairasco et al., 1996; Moraes et al., 2000).

Традиционно аудиогенный киндлинг вызывают повторением развернутых аудиогенных судорог максимальной возможной интенсивности. Мы впервые исследовали возможность формирования киндлинга при повторении минимальных АС (короткого эпизода аудиогенного бега) у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией и сравнили этот мягкий вариант аудиогенного киндлинга с его традиционной парадигмой (при повторении максимальных АС).

## Результаты

### Аудиогенный киндлинг у крыс КМ

У крыс КМ повторная звуковая стимуляция регулярно вызывала развернутые припадки максимальной интенсивности. В повторных тестах латентность аудиогенных судорог, длительность их локомоторной и тонической фаз не менялись, но после 5-11 (в среднем  $7.3 \pm 0.6$ ) повторных тестов в составе приступа появился новый компонент – посттонический клонус (ПТК), длительность которого постепенно нарастала (Рис.1).



**Рис. 1.** Латентность (Latency) повторных аудиогенных судорог, а также длительность их основных фаз - двигательного возбуждения (Run), тонических судорог (tonus) и посттонического клонуса (ПТК) - у крыс КМ. По оси абсцисс – номер звуковой стимуляции, по оси ординат – соответствующий показатель в секундах.

К концу тестирования эти вторично генерализованные клонические судороги становились самой длинной фазой судорожного припадка (20-25 сек). Развитие ПТК, то есть формирование аудиогенного киндлинга, наблюдали у всех исследованных крыс КМ (n=21).

*Аудиогенный киндлинг у крыс Wistar и WAG/Rij. Субпопуляции с разной чувствительностью к эпилептогенезу.*

У крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией первая короткая звуковая стимуляция вызывала эпизод бега длительностью  $5.3 \pm 0.5$  и  $5.4 \pm 0.4$  сек, соответственно. При повторном тестировании наблюдали три типа изменений судорожного ответа на звук: у одних крыс сразу после окончания бега появлялись и прогрессивно усиливались клонические судороги лимбического типа; у других крыс звук регулярно вызывал аудиогенный бег, но клонус не развивался вовсе или оставался слабо выраженным; наконец, у некоторых крыс судорожная реакция на звук полностью исчезала в ходе повторных стимуляций.

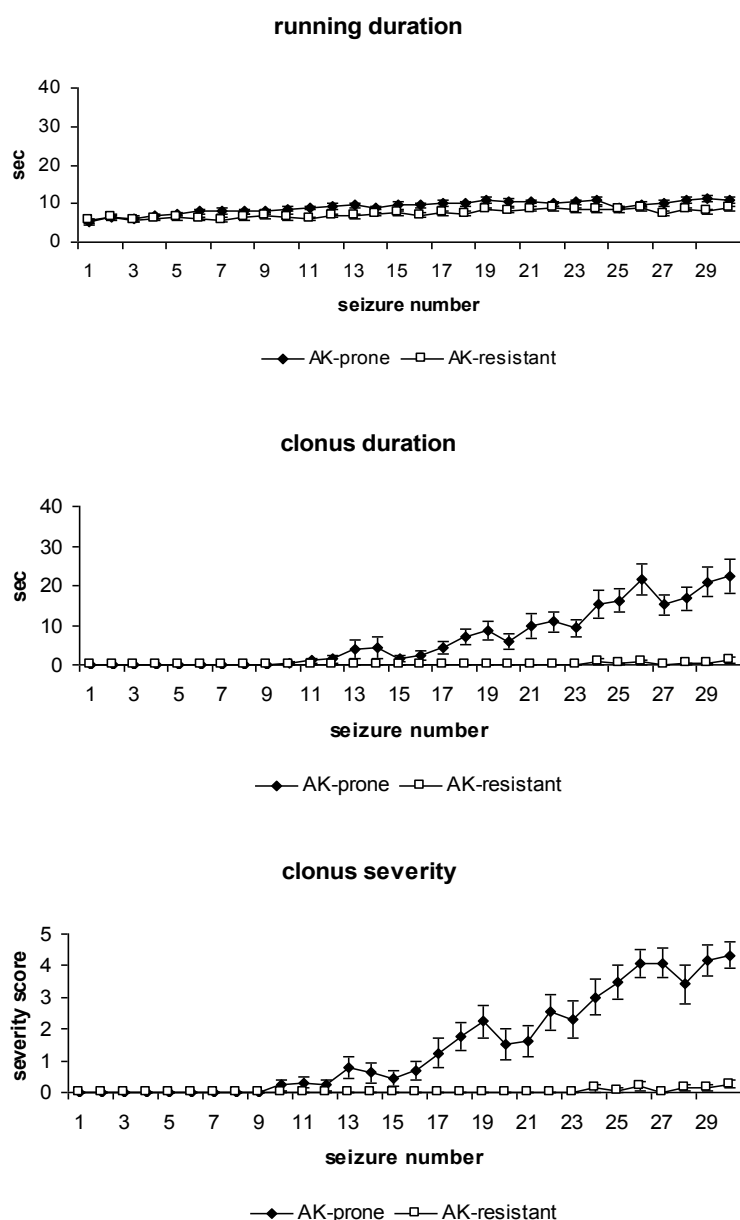
Появление лимбического клонуса в составе аудиогенного припадка, отражающее распространение эпилептической активности в передний мозг, является индикатором формирования киндлинга у крыс, демонстрирующих субмаксимальный судорожный ответ (без тонических судорог) на звуковую стимуляцию. Поэтому, в соответствии с типом реагирования на повторное раздражение, среди крыс Wistar и WAG/Rij было выделено три группы особей: чувствительные к киндлингу (АК-чувствительные) крысы, резистентные к киндлингу (АК-резистентные) крысы и крысы с приобретенной устойчивостью к АС. В таблице 3 приведены данные о численности этих групп в исследованных популяциях крыс Wistar и WAG/Rij. Статистически достоверные межлинейные отличия отсутствовали.

**Таблица 3.** Соотношение особей с разным типом реагирования на повторную звуковую стимуляцию в исследованных популяциях крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией

Линия	Общее число крыс	Число (%) АК-чувствительных крыс	Число (%) АК-устойчивых крыс	Число (%) крыс с приобретенной устойчивостью
Wistar	35	13 (37%)	15 (43%)	7 (20%)
WAG/Rij	35	12 (34%)	14 (40%)	9 (26%)

### Киндлинг-чувствительные и киндлинг-резистентные крысы Wistar и WAG/Rij

Сравнение параметров повторных АС у крыс Wistar и WAG/Rij со стабильной судорожной реакцией на звук (киндлинг-чувствительных и киндлинг-резистентных) показало следующее. У АК-чувствительных крыс Wistar лимбический клонус появлялся после  $14.9 \pm 1.0$  повторных эпизодов судорожного бега (Рис. 2).

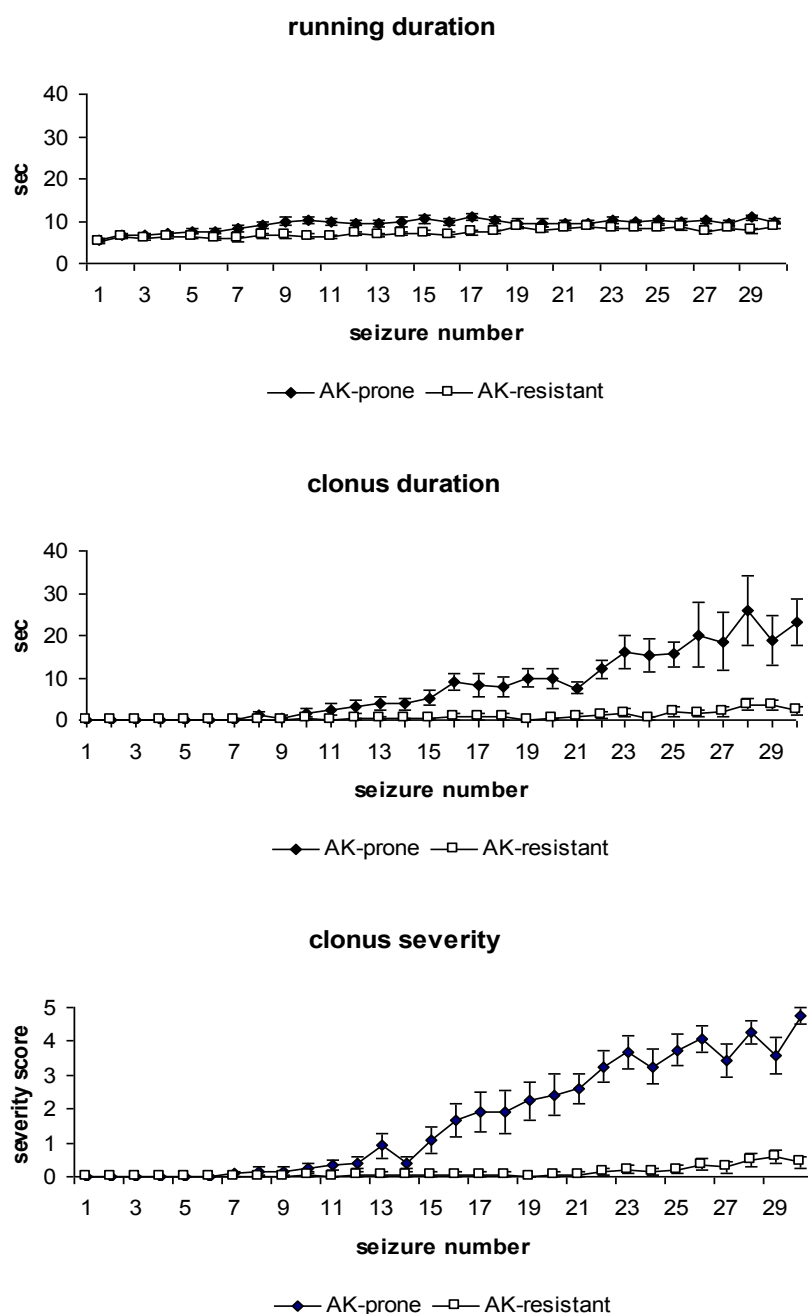


**Рис. 2.** Динамика аудиогенного киндлинга у киндлинг-чувствительных (АК-prone group) и киндлинг-резистентных (АК-resistant group) крыс Wistar. По оси абсцисс – порядковый номер АС (seizure number), по оси ординат – средняя длительность бега (running duration) и лимбического клонуса (clonus duration) в секундах, а также интенсивность лимбического клонуса в баллах по шкале Racine (1972) (clonus severity).

Сначала это был уни/билатеральный клонус лицевой мускулатуры, который развивался сразу после окончания аудиогенного бега. В ходе повторного тестирования этот клонус нарастал по длительности и

интенсивности, проходя через те же стадии, что при классическом электрическом киндлинге миндалины, и достигал своей максимальной (стадия 5) интенсивности (Racine, 1992). У киндлинг-резистентных крыс Wistar максимальные клонические судороги не развивались до конца эксперимента (30 повторных АС). У большинства крыс этой группы (10/15) звук вызывал только бег, у некоторых животных (5/15) лимбический клонус появлялся к концу тестирования (после  $27.2 \pm 1.2$  повторных тестов), но его интенсивность не превышала стадии 2 по шкале Racine.

Паттерн судорожных реакций на повторную звуковую стимуляцию у крыс WAG/Rij был идентичен таковому у крыс Wistar (Рис. 3).



**Рис. 3.** Динамика аудиогенного киндлинга у АК-чувствительных (АК-prone) и АК-резистентных (АК-resistant) крыс WAG/Rij. По оси абсцисс – номер АС (seizure number), по оси ординат – средняя длительность бега (running duration) и лимбического клонуса (clonus duration) в секундах, а также интенсивность лимбического клонуса в баллах по шкале Racine (1972) (clonus severity).

У киндлинг-чувствительных крыс WAG/Rij лимбический клонус появлялся после  $13.6 \pm 1.2$  повторных АС и достигал своей максимальной интенсивности к концу тестирования. В группе киндлинг-резистентных крыс WAG/Rij, лимбический клонус или не развивался (8/14) или слабые клонические судороги появлялись после  $22.5 \pm 2.7$  повторных эпизодов аудиогенного бега (6/14).

При сравнении динамики изменений параметров повторных аудиогенных судорог у крыс Wistar и WAG/Rij с разной чувствительностью к киндлингу тест ANOVA выявил достоверное влияние числа повторных тестов и группы (чувствительность к АК) на среднюю длительность бега ( $F=20.50$ ,  $p<0.0005$  и  $F=15.50$ ,  $p<0.0005$ , соответственно) и лимбического клонуса ( $F=18.62$ ,  $p<0.0005$  и  $F=82.31$ ,  $p<0.0005$ ), а также на интенсивность клонуса ( $F=42.50$   $p<0.0005$  и  $F=197.20$   $p<0.0005$ ). В обеих линиях у киндлинг-чувствительных крыс клонические судороги длились дольше и были интенсивнее, чем у киндлинг-резистентных особей. Высоко достоверные различия между этими группами крыс были также найдены в динамике роста длительности клонуса (значимое взаимодействие между числом судорог и группой,  $F=13.75$ ,  $p<0.0005$ ) и его интенсивности (взаимодействие между числом судорог и группой,  $F=33.33$ ,  $p<0.0005$ ).

#### ***Крысы Wistar и WAG/Rij с приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам***

Скрининг большой группы животных (100 крыс Wistar и 50 крыс WAG/Rij) показал, что у трети крыс обеих линий - 33% (33/100) крыс Wistar и 28% (14/50) крыс WAG/Rij – судорожный ответ на звук полностью исчезает при повторном тестировании. Чаще всего (29/33 крыс Wistar и 9/14 крыс WAG/Rij) это происходило после восьми повторных АС. После двухмесячного перерыва у половины крыс чувствительность к АС восстанавливалась.

#### ***Межлинейные различия в динамике аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij***

Не было найдено достоверных межлинейных отличий в основных характеристиках аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij. Соотношение киндлинг-чувствительных и киндлинг-резистентных крыс, было одинаково в обеих линиях (таблица 3). Сравнение средней длительности

первого лимбического клонуса (стадии 1-2) и первого клонуса максимальной интенсивности (стадии 5) по шкале Racine (1972) также не выявило достоверных межлинейных и межгрупповых различий (таблица 4). Длительность первых клонических судорог (стадии 1-2) была несколько выше у крыс WAG/Rij, по сравнению с крысами Wistar, но эта разница оставалась недостоверной.

**Таблица 4.** Длительность двигательного возбуждения (бега) и лимбического клонуса на разных стадиях аудиогенного киндлинга у АК-чувствительных и АК-резистентных крыс Wistar и WAG/Rij

Компонент припадка	Wistar		WAG/Rij	
	АК-чувствительные (n=13)	АК-резистентные (n=15)	АК-чувствительные (n=12)	АК-резистентные (n=14)
<i>Первый приступ с лимбическим клонусом (стадии 1-2)</i>				
Бег (сек)	10.2±0.6	9.8±0.6	11.2±0.8	9.0±0.6
Клонус (сек)	5.0±0.9	4.4±2.0	8.0±1.2	6.2±1.0
<i>Первый приступ с генерализованным клонусом (стадия 5)</i>				
Бег (сек)	10.2±0.7	-	10.5±0.8	-
Клонус (сек)	15.8±2.3	-	12.2±1.3	-

Достоверные различия между крысами Wistar и WAG/Rij были обнаружены только в группе киндлинг-резистентных животных. Оказалось, что слабый лимбический клонус появлялся быстрее и чаще у АК-резистентных крыс WAG/Rij (после 14.1±1.4 повторных припадков и в 42 % случаев, соответственно,  $p<0.05$ ), чем у АК-резистентных крыс Wistar (после 20.2±1.6 повторов и в 12 % тестов, соответственно;  $p<0.05$ ). Однако интенсивность этого клонуса оставалась низкой, не превышающей стадий 1-2, на протяжении всего тестирования. В общей популяции крыс со стабильными АС такой неполный или парциальный киндлинг значительно чаще развивался у крыс WAG/Rij (у 28 % особей), чем у крыс Wistar (у 8 % особей) ( $p<0.05$ ). То есть у крыс Wistar лимбический клонус после своего появления, как правило, усиливался до максимальной степени выраженности (полное развитие киндлинга), тогда как у крыс WAG/Rij в повторных тестах часто не происходило прогрессивной интенсификации лимбических судорог (частичное развитие киндлинга).



### ***Аудиогенный киндлинг и неконвульсивные абсансные судороги***

Поскольку ранее на модели электрического киндлинга миндалины были получены данные о влиянии неконвульсивной судорожной активности абсансного типа на чувствительность к киндлинг-эпилептогенезу (Eskazan et al., 2002; Onat et al., 2005; Aker et al., 2006), мы сравнили интенсивность спонтанных абсансных судорог у крыс WAG/Rij с разной чувствительностью к аудиогенному киндлингу. У большинства крыс Wistar (13/15, три киндлинг-чувствительных, восемь киндлинг-резистентных и четыре крысы с приобретенной устойчивостью к АК) не было зарегистрировано абсансных судорог. Только у двух крыс Wistar, устойчивых к АК, были записаны abortивные разряды (общей длительностью 5.5 и 9.8 секунд за 20-минутный период). У крыс WAG/Rij, которым были вживлены регистрирующие эпидуральные электроды, общая длительность абсансных судорог варьировала от 15 до 200 сек (за 20-минутный период). У киндлинг-резистентных крыс (n=7) были записаны значительно более длительные абсансные судороги ( $83.4 \pm 12.6$  с), чем у киндлинг-чувствительных крыс (n=5,  $20.4 \pm 2.7$  с) ( $p < 0.05$ ). Интенсивные абсансные судороги (64, 86 и 200 с) были зарегистрированы и у трех крыс с приобретенной устойчивостью к АК.

### ***Аудиогенный киндлинг и судорожная реакция на продленный звук у крыс Wistar и WAG/Rij***

Как упоминалось выше, первые короткие звуковые стимулы вызывали одинаковый судорожный ответ (короткий аудиогенный бег) у крыс Wistar и WAG/Rij с разной чувствительностью к киндлинг-эпилептогенезу. Мы проверили, отличаются ли эти крысы по своей реактивности на длительную звуковую стимуляцию, вызывающую развернутые и максимально интенсивные для этих крыс аудиогенные судороги. Для этого за три недели до начала АК крыс Wistar (n=57) и WAG/Rij (n=30) подвергали длительной (60-секундной) звуковой стимуляции. Средняя интенсивность судорог, вызванных такой стимуляцией у крыс Wistar, составила  $1.56 \pm 0.17$  баллов для киндлинг-чувствительных крыс (n=18),  $1.29 \pm 0.11$  баллов для киндлинг-резистентных крыс (n=28) и  $1.36 \pm 0.15$  баллов для крыс с приобретенной устойчивостью к АК (n=11). У крыс WAG/Rij длительный звук вызвал развернутые судороги

интенсивностью  $1.75 \pm 0.25$ ,  $1.62 \pm 0.14$  и  $1.80 \pm 0.12$  баллов у киндлинг-чувствительных крыс ( $n=4$ ), киндлинг-резистентных крыс ( $n=13$ ) и крыс с приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам ( $n=13$ ), соответственно. Критерий Крускала-Уоллиса не показал достоверных различий между группами ( $p=0.2429$ ). Таким образом, исходная реактивность крыс на звук (как длительный, так и короткий) не отличалась у крыс с разной чувствительностью к киндлинг-эпилептогенезу.

## Обсуждение

Корково-подкорковые взаимодействия играют важную роль в экспрессии генерализованных судорог: кортикоталамические осцилляции лежат в основе абсансной судорожной активности (Meeren et al., 2002; Coenen, van Luijtelaar, 2003), стволые структуры вовлечены в экспрессию клонико-тонических судорог (Browning et al., 1985; Faingold, 2004; Blumenfeld et al., 2009). Одним из экспериментальных подходов к исследованию корково-подкорковых взаимодействий при генерализованных тонико-клонических судорогах является модель аудиогенного киндлинга (АК), в которой удлинение и усложнение повторных судорог отражает распространение эпилептической активности по восходящим путям из ствола к переднему мозгу (Marescaux et al., 1987; Faingold, 2004; Jobe, Browning, 2006 a,b).

В классической парадигме электрического киндлинга повторная локальная стимуляция лимбических структур приводит к появлению и прогрессивной интенсификации судорог у исходно здоровых животных (Goddard et al., 1969). Развитие и усиление моторных судорог в этой модели является результатом постепенной генерализации эпилептической активности из области прямого электрического раздражения в другие отделы мозга (Racine, 1972). При аудиогенном киндлинге повторная инициация рефлекторных стволых судорог приводит к распространению эпилептической активности в передний мозг, что определяет появление нового типа клонических судорог в составе аудиогенного приступа (Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Hirsch et al., 1997; Moraes et al., 2000).

Несмотря на различие механизмов инициации судорог при электрическом и аудиогенном киндлинге, электрофизиологическое и иммуногистохимическое картирование показало, что в обеих моделях развитие

клонических судорог при формировании киндлинга связано с активацией одних и тех же сетей переднего мозга, включающих миндалину и периринальную кору (Hirsch et al., 1997; Simler et al., 1999; Moraes et al., 2000; Raisinghani et al., 2003). Именно периринальная кора и миндалина являются структурами переднего мозга, которые в первую очередь рекрутируются в эпилептическую сеть в ходе аудиогенного киндлинга, тогда как фронто-париетальные отделы коры вовлекаются позже (Simler et al., 1999). Критическая роль миндалины в развитии аудиогенного киндлинга подтверждена в работах с внутримозговыми микроинъекциями (Hirsch et al., 1997; Moraes et al., 2000; Raisinghani et al., 2003). Локальное введение лидокаина в миндалину полностью подавляет клонические судороги, развивающиеся в ходе аудиогенного киндлинга, а внутриамигдаллярное введение NMDA или стимулятора аденилатциклазы форсколина, напротив, вызывает немедленное появление в составе АС посттонического клонуса у «нераскачанных» крыс GEPR (Raisinghani et al., 2003; Tupal, Faingold, 2010). Таким образом, при аудиогенном и электрическом киндлинге в экспрессию лимбических судорог вовлечены одни и те же сети, которые активируются, независимо от природы эпилептогенной стимуляции и локализации первичного очага эпилептического возбуждения (Racine et al., 1973; Burchfield, Applegate, 1989).

Важнейшим преимуществом модели аудиогенного киндлинга является то, что эпилептогенез (прогрессивное усиление судорог) является результатом синаптической активации лимбических структур, а не их прямой электрической или химической стимуляции, что усиливает роль эндогенных механизмов (как патогенных, так и компенсаторных) в патологической пластичности, связанной с киндлингом.

Обычно аудиогенный киндлинг вызывают ежедневным повторением развернутых судорог максимальной интенсивности (Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Garcia-Cairasco et al., 1996; Hirsch et al., 1997; Moraes et al., 2000). Еще Л.В. Крушинский описал появление миоклонических тикообразных подергиваний у крыс КМ после повторного (не менее 10-12) действия звукового раздражителя (Крушинский, 1960). В работах сотрудников лаборатории Л.В. Крушинского была продемонстрирована ведущая роль коры в развитии миоклонуса при повторных аудиогенных судорогах, то есть в формировании аудиогенного киндлинга (Васильева, 1957; Котляр, 1959; Семиохина, 1969).

Наше исследование показало, что киндлинг может формироваться также при повторном вызове минимальных АС (короткого эпизода двигательного возбуждения), хотя происходит это значительно медленнее и реже, чем при вызове аудиогенных судорог максимальной интенсивности.

Различие в фенотипе клонических судорог (ПТК и лимбический клонус), развивающихся при аудиогенном киндлинге у крыс с высокой (КМ) и низкой (Wistar, WAG/Rij) чувствительностью к АС, связано с маскирующим влиянием тонических судорог на моторные проявления лимбического клонуса. Экспериментальное ослабление интенсивности стволовой части припадка и блокирование тонических судорог в составе АС приводит к трансформации ПТК в лимбический клонус (Merrill et al., 2005). В нашей модели «мягкого» аудиогенного киндлинга, вызываемого минимальными АС, маскирующее влияние интенсивных стволовых судорог отсутствует. Во время и после аудиогенного бега крысы не теряют позного контроля, и сразу после окончания двигательного возбуждения развивается клонус лимбического типа, идентичный тому, что наблюдается при электрическом киндлинге лимбических структур (Racine, 1972).

#### ***Субпопуляции крыс Wistar и WAG/Rij с разной чувствительностью к аудиогенному киндлингу***

Проведенное исследование показало, что, несмотря на исходно одинаковую чувствительность к однократной звуковой стимуляции, исследованные крысы Wistar и WAG/Rij отличаются по своей предрасположенности к *хроническому* киндлинг-эпилептогенезу. Одни крысы (АК-чувствительные) демонстрируют быстрое и полное развитие киндлинга, в ходе которого лимбические судороги достигают своей максимальной выраженности. У других крыс (АК-резистентных) лимбические судороги не развиваются вовсе или остаются слабыми. При этом соотношение крыс с разными типами реагирования на повторную звуковую стимуляцию одинаково в линиях Wistar и WAG/Rij.

Существование субпопуляций крыс, чувствительных и устойчивых к АК, также было описано у крыс линии WAR с генетической аудиогенной эпилепсией (Romcy-Pereira, Garcia-Cairasco, 2003). У этих крыс отмечено два паттерна развития аудиогенного киндлинга - с усилением судорог до стадии 5 и

со стабилизацией на стадии 2. Причем доля особей с полным развитием киндлинга была примерно такой же, как среди аудиогенных крыс Wistar и WAG/Rij в нашем исследовании.

Различия в чувствительности к хроническому эпилептогенезу также описаны на модели электрического киндлинга. Показана значительная индивидуальная и межлинейная вариабельность в скорости развития электрического киндлинга (Goddard et al., 1969; Racine et al., 1973; 1999; Loscher et al., 1998a). На основе линий Wistar и Long-Evans выведены две линии крыс с быстрым (Fast) и медленным (Slow) развитием электрического киндлинга миндалины (McIntyre et al., 1999; Racine et al., 1999). Исследования на этих линиях крыс показали важную роль генетических факторов в чувствительности к киндлинг-эпилептогенезу. В настоящее время активно изучаются молекулярные механизмы, определяющие разную чувствительность линий Fast и Slow к электрическому киндлингу. Субпопуляции крыс, чувствительных и устойчивых к электрическому киндлингу миндалины, были также описаны для линии WAG/Rij (Aker et al., 2006).

Идентичный паттерн исходной реакции на *однократный* звуковой раздражитель у всех крыс Wistar и WAG/Rij предполагает отсутствие значительных индивидуальных различий в возбудимости стволовых субстратов АС в исследованных популяциях. Но разная чувствительность к *повторному* эпилептогенному звуковому воздействию (киндлингу) среди крыс обеих линий предполагает существование значительных индивидуальных различий в способности стволовых аудиогенных судорог распространяться в структуры переднего мозга. Интересно, что на модели электрического киндлинга показано, что крысы линий Fast и Slow отличаются по способности первичного эпилептического фокуса рекрутировать удаленные структуры, тогда как локальная возбудимость самого фокуса менее значима для скорости киндлинга (McIntyre et al., 1999; 2002). Burchfield и Applegate (1989) предположили существование «воротного» механизма норадренергической природы, контролирующего распространение эпилептической активности в мозге и скорость формирования киндлинга. Полученные в нашей работе данные о связи чувствительности к аудиогенному киндлингу и интенсивности абсансных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии предполагают, что этот

«воротной» механизм также участвует в регуляции абсансной судорожной активности. Киндлинг-резистентные крысы WAG/Rij демонстрируют более интенсивные абсансные судороги, чем киндлинг-чувствительные крысы той же линии, как в нашей модели «мягкого» аудиогенного киндлинга, так и в модели электрического киндлинга лимбических структур (Eskazan et al., 2002; Onat et al., 2005; Aker et al., 2006). Однако, в отличие от этих работ с электрическим киндлингом, наши эксперименты показали, что киндлинг-резистентные крысы есть также среди крыс линии Wistar, у которых полностью отсутствуют абсансные судороги. Это предполагает, что механизмы устойчивости к киндлинг-эпилептогенезу вряд ли связаны с прямым влиянием абсансной судорожной активности и генерирующих ее сетей на лимбический эпилептогенез, как это предполагает ряд исследователей (Eskazan et al., 2002; Onat et al., 2005; Aker et al., 2006). Более вероятно, что предрасположенность к абсансным судорогам и устойчивость к киндлингу являются следствием одной общей причины, модулирующей и интенсивность абсансной судорожной активности, и лимбический эпилептогенез (киндлинг).

Хорошо известно, что норадренергические механизмы вовлечены как в формирование киндлинга, так и в контроль абсансной судорожной активности. Активация альфа2-NA рецепторов с помощью неселективного агониста клонидина эффективно тормозит развитие электрического киндлинга амигдалы (Gellman et al., 1987; McIntyre, Guigno, 1988), но увеличивает частоту возникновения неконвульсивных пик-волновых разрядов (Buzsaki et al., 1991; Sitnikova, van Luijtelaa, 2005). При этом норадренергическая система только модулирует частоту абсансных судорог у генетически чувствительных крыс, но не вызывает их возникновение *de novo* у здоровых животных (Lannes et al., 1991; Danober et al., 1998). Это может объяснять, почему высокая пик-волновая активность наблюдается у киндлинг-резистентных крыс WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией, но она полностью отсутствует у киндлинг-резистентных крыс Wistar, генетически не предрасположенных к абсансным судорогам. Известно, что некоторые линии крыс и мышей с генетической чувствительностью к аудиогенным или абсансным судорогам имеют врожденные аномалии норадренергической передачи (Noebels, 1984; Browning et al., 1989; Faingold, 1999). Показано также, что альфа2-NA механизмы

существенно отличаются у крыс Fast и Slow с разной чувствительностью к электрическому киндлингу (Shin et al. 2004; Shin, McIntyre, 2007). Можно предположить, что причиной разной чувствительности к аудиогенному киндлингу, найденной в данной работе, могут быть небольшие внутрилинейные вариации в функционировании норадренергической системы.

## **3.2. Нейрофармакологический анализ механизмов иктогенеза и эпилептогенеза на модели аудиогенного киндлинга**

### ***3.2.1. Участие эндоканнабиноидной системы в иктогенезе и эпилептогенезе при аудиогенной эпилепсии***

Эндоканнабиноидная система - одна из важнейших нейромодуляторных систем головного мозга, которая играет важную роль в регуляции синаптической передачи и синаптической пластичности (Alger, 2004; Katona, Freund, 2012). Эндоканнабиноиды обеспечивают локальную гомеостатическую регуляцию активности индивидуальных синапсов, осуществляя ретроградную модуляцию синаптической передачи. Эндоканнабиноиды синтезируются при активации постсинаптических нейронов и ретроградно тормозят выделение медиаторов (обычно глутамата или ГАМК) через пресинаптические метаботропные CB1 рецепторы (Katona, Freund, 2012).

Модулируя выход возбуждающих и тормозных медиаторов, эндоканнабиноидная система и ее CB1 рецепторы контролируют нейронную возбудимость и регулируют баланс возбуждения/торможения в ЦНС. На разных экспериментальных моделях эпилепсии показано, что эндоканнабиноидная сигнализация активно участвует в регуляции чувствительности мозга к эпилептической активации (Wallace et al., 2003; Alger, 2004). Активность эндоканнабиноидной системы резко меняется при эпилептическом возбуждении: увеличивается синтез эндоканнабиноидов и быстро активируются CB1 рецепторы, особенно в лимбической системе (Wallace et al., 2003; Marsiano et al., 2003; Lutz, 2004). Предполагается, что эти процессы направлены на защиту мозга от перевозбуждения. У мышей с нокаутированными CB1 рецепторами конвульсанты вызывают более интенсивные судороги и повышенную смертность (Karlocai et al., 2011). Сниженная экспрессия этих рецепторов описана у крыс с генетической предрасположенностью к абсансным судорогам (van Rijn et al., 2010) и у пациентов с височной эпилепсией (Ludanyi et al., 2008). Напротив, у грызунов с врожденной устойчивостью к лимбическим судорогам повышена экспрессия CB1 рецепторов в гиппокампе (Araujo et al., 2010). Избирательное нокаутирование CB1 рецепторов на разных типах терминалей показало, что для антиэпилептической защиты головного мозга критичны CB1 рецепторы, локализованные на глутаматергических окончаниях.



Усиление экспрессии CB1 рецепторов на этих терминалях повышает устойчивость к судорогам (Guggenhuber et al., 2010), а их нокаутирование ведет к росту судорожной чувствительности (Monory et al., 2006; Marsiano et al., 2003). При этом нокаутирование CB1 рецепторов на ГАМК терминалях, несмотря на их широкое распространение в структурах головного мозга, не оказывает существенного влияния на предрасположенность к эпилепсии (Marsiano et al., 2003). Препараты, стимулирующие эндоканнабиноидную сигнализацию, быстро снижают нейронную возбудимость и тормозят судороги (Wallace et al., 2002, 2003; van Rijn et al., 2010), хотя есть редкие сообщения об их проконвульсивных эффектах этих препаратов (Vilela et al., 2013). Фармакологический блок эндоканнабиноидной сигнализации облегчает развитие судорожной активности, оказывая быстрое проэпилептическое действие (Wallace et al., 2002; Deshpande et al., 2007). Эти данные указывают на «острую» противосудорожную роль эндоканнабиноидной системы и перспективность использования лигандов эндоканнабиноидных рецепторов для антиэпилептической терапии (Шубина, Кичигина, 2012; Hofmann, Frazier, 2011).

В то же время активное участие эндоканнабиноидной системы в различных формах синаптической пластичности предполагает ее вовлечение в механизмы эпилептогенеза, тесно связанные с пластическими патологическими перестройками нейронных сетей. Однако исследования роли эндоканнабиноидной системы в этих процессах на экспериментальных моделях дали противоречивые результаты (Chen et al., 2007; Echegoyen et al., 2009; van Rijn et al., 2011). Данные, полученные на одних моделях эпилептогенеза, указывают на проэпилептогенную роль эндоканнабиноидной системы (Chen et al., 2007; Echegoyen et al., 2009), тогда как другие исследования свидетельствуют о ее антиэпилептогенном влиянии (Wendt et al., 2011; Bhaskaran, Smith, 2010).

На модели аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга мы исследовали острые (иктогенные) и длительные (эпилептогенные) эффекты антагониста центральных CB1 рецепторов SR141716 и мощного неселективного агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212. В первой серии экспериментов с антагонистом CB1 рецепторов SR141716 (SR, римонабант) проверялось участие эндоканнабиноидных рецепторов в различных формах резистентности к аудиогенным судорогам и аудиогенному киндлингу у крыс

Wistar. Предполагалось, что, если эти рецепторы вовлечены в поддержание врожденной или приобретенной форм устойчивости к судорогам и киндлингу, то их фармакологическая блокада будет снимать данные формы резистентности. Во второй серии экспериментов оценивали влияние агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212(2) (WIN) на аудиогенные судороги и аудиогенный киндлинг у крыс KM. Предполагалось, что стимуляция эндоканнабиноидной системы должна оказывать антиэпилептогенное и антииктогенное действие на судороги и эпилептогенез.

### ***Проэпилептические эффекты антагониста эндоканнабиноидных CB1 рецепторов SR141716***

Как уже упоминалось, у некоторых крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией повторный вызов аудиогенных судорог не вызывает формирование киндлинга, и даже может приводить к исчезновению судорожной реакции на звук. В литературе существуют данные о том, что повторная звуковая стимуляция крыс с аудиогенной эпилепсией иногда ведет к ослаблению судорожного ответа на звук и даже его полному торможению (Батуев и др., 1997; Батаев, 2007; Galvis-Alonso et al., 2004; Merrill et al., 2005). Длительное постиктальное ослабление судорожной чувствительности было также описано на моделях электрического киндлинга, электрошока и фармакологически вызванных судорог (Mucha, Pinel, 1977; Post et al., 1984; Bragin et al., 2002; Merrill et al., 2005). Механизмы такой приобретенной резистентности к эпилептическому возбуждению неизвестны, но предполагается, что повторные судороги могут активировать эндогенные адаптивные механизмы, которые длительно тормозят развитие последующих эпизодов эпилептической активности.

Клинические и экспериментальные данные указывают на участие эндоканнабиноидной сигнализации в *быстром* торможении судорог (Wallace et al., 2002, 2003; van Rijn et al., 2010), но данные о роли этой системы в *эпилептогенезе* (длительном патологическом процессе, ведущем к развитию эпилепсии) крайне противоречивы. Показано участие эндоканнабиноидной сигнализации как в защитных антиэпилептогенных процессах, так и в патологических изменениях, ведущих к прогрессивной эпилептизации мозга (Chen et al., 2007; Echegouyen et al., 2009; Wendt et al., 2011; Bhaskaran, Smith, 2010). Ранее мы показали, что длительная фармакологическая блокада

эндоканнабиноидных CB1 рецепторов может приводить к развитию спонтанных лимбических судорог у здоровых неэпилептических крыс Wistar (van Rijn et al., 2011). В настоящем исследовании изучали влияние блокады CB1 рецепторов на чувствительность к АС и АК у крыс Wistar с рефлекторной аудиогенной эпилепсией.

## Результаты

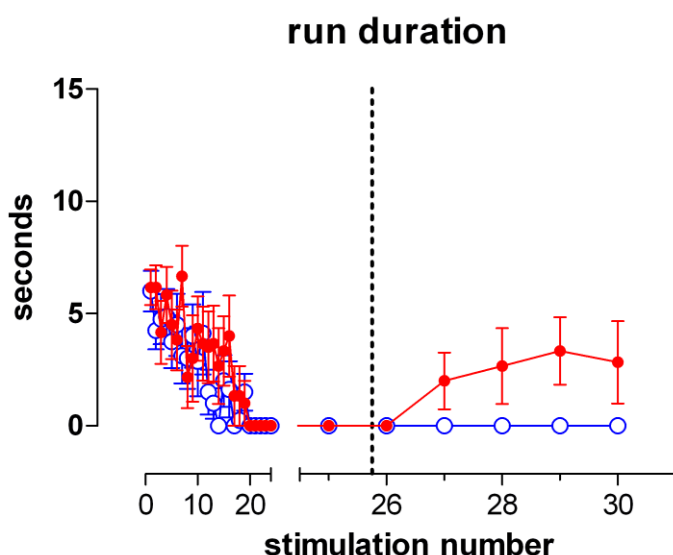
Исследовалось влияние антагониста CB1 рецепторов SR141716 (SR) на чувствительность к аудиогенным судорогам и аудиогенному киндлингу у крыс Wistar, предварительно подвергнутым 25 повторным звуковым стимуляциям. В зависимости от паттерна реагирования на повторные воздействия, было выделено 3 группы крыс: (1) неэпилептические крысы, у которых звук никогда не вызывал судорожной реакции (n=8); (2) крысы с приобретенной резистентностью к судорогам, у которых только первые стимулы вызывали судорожный ответ (n=14); (3) крысы с регулярным судорожным ответом на звук (n=11). Каждая группа была разделена на экспериментальную и контрольную подгруппы, которым вводили ежедневно (в течение 5 дней) вводили SR (30 мг/кг) или растворитель, соответственно. «Острые» эффекты оценивали через 3 ч после введения первой дозы препарата (в 26-м тесте), длительные следовые эффекты – в течение двух недель после окончания введения SR или растворителя (27-30-й тесты).

У здоровых неэпилептических крыс (группа 1) звук никогда не вызывал судорожного ответа. Пятидневное введение SR не повлияло на врожденную устойчивость этих крыс к АС.

У исходно аудиогенных крыс с приобретенной устойчивостью к АС (группа 2) только первые звуковые стимуляции вызвали двигательное возбуждение. К 20-му тесту судорожная реакция на звук полностью исчезала у всех животных (Рис.4). После однократного введения SR (за три часа до 26-й стимуляции) аудиогенные судороги, по-прежнему, не развивались, но после хронического (5-дневного) введения антагониста CB1 рецепторов судорожный ответ на звук вновь появился у части животных (3/6). В течение двух недель после окончания введения препарата общее число судорожных ответов на звук было достоверно выше (9/24) в экспериментальной группе, чем в контрольной (0/24) ( $p < 0.005$ , тест Фишера). При этом SR не влиял на паттерн судорожного

ответа, клонические судороги не развивались у крыс этой группы ни до, ни после введения SR или растворителя.

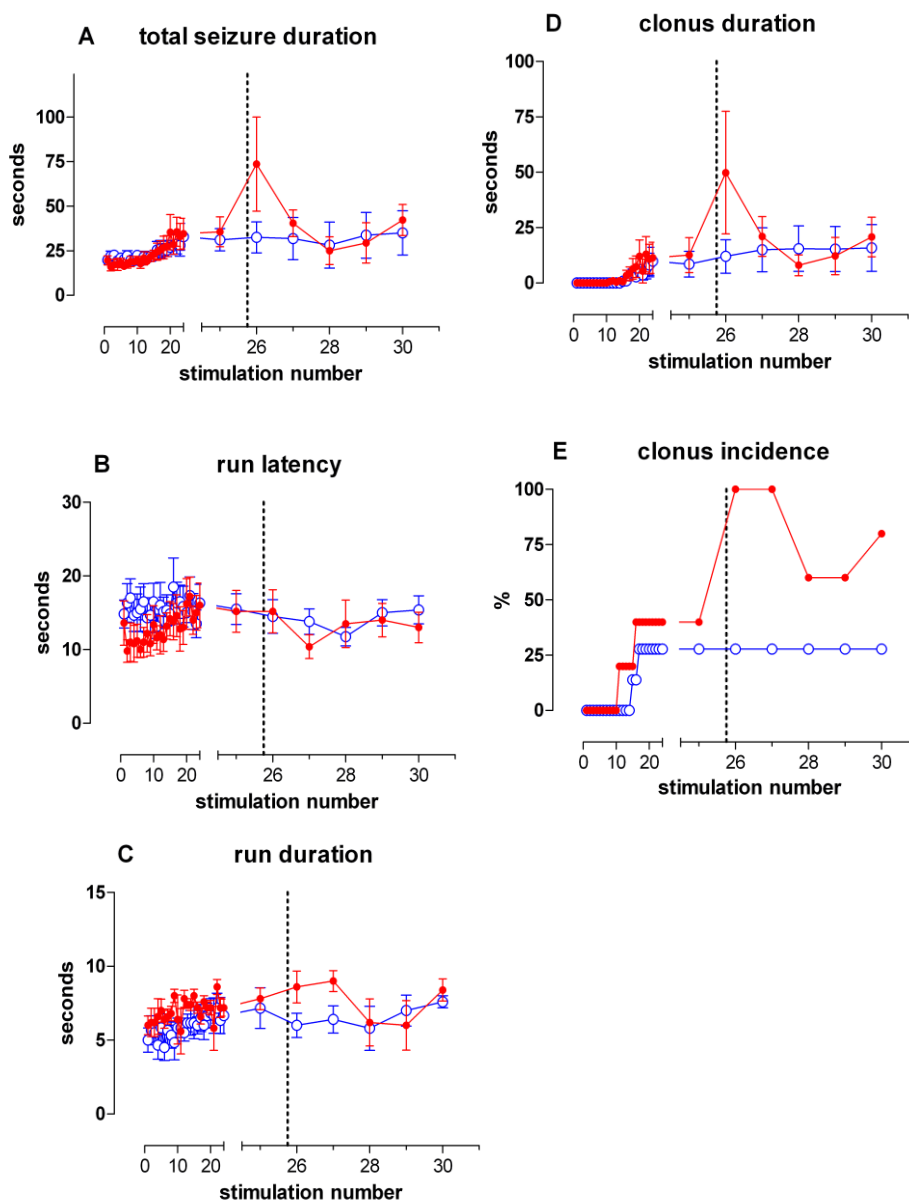
У крыс с регулярными АС (группа 3) введение растворителя не меняло паттерн судорожного ответа на звук: латентность, частота возникновения и длительность фаз припадка не изменились ни через 3 ч после однократного введения, ни в течение двух недель после повторных инъекций (Рис. 5). Общая длительность АС у контрольных крыс составила  $31.3 \pm 6.2$  сек до введения растворителя и  $32.5 \pm 8.7$  сек через 3 ч после его введения. Антагонист СВ1 рецепторов резко менял судорожный ответ на звук у крыс этой группы: через три часа после его первого введения общая длительность АС выросла вдвое – с  $35.6 \pm 8.3$  до  $73.6 \pm 26.4$  сек ( $p < 0.05$ ) (Рис.5А). Такое продление судорожной реакции на звук было связано исключительно с увеличением длительности ее лимбического компонента (Рис. 5 Г, Д), тогда как параметры начальной стволовой части (аудиогенного бега) припадка оставались неизменными (Рис. 5 Б, В). Через 3 ч после однократного введения SR клонус развился у всех крыс экспериментальной группы, включая киндлинг-резистентных крыс, у которых он никогда не появлялся в 25 тестах, предшествующих введению препарата. Число крыс, у которых звук вызвал лимбический клонус, было значительно выше в экспериментальной группе (5/5), чем в контрольной (2/6) ( $p < 0.05$ , тест Фишера).



**Рис. 4.** Появление судорожной реакции на звук после хронического введения антагониста эндоканнабиноидных СВ1 рецепторов SR141716 крысам Wistar с приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам. По оси ординат - средняя длительность судорог (двигательного возбуждения, run duration), вызванных повторной звуковой стимуляцией. По оси абсцисс – номер звуковой стимуляции. Растворитель или SR

(30 мг/кг) вводили за 3 часа до 26-й стимуляции (вертикальная прерывистая черта) и в течение четырех последующих дней. 27-й стимул предъявляли через 2 дня после последней инъекции SR. Синим цветом обозначены реакции крыс контрольной группы с введением растворителя, красным – крыс экспериментальной группы с введением SR.

У киндлинг-чувствительных крыс, которые демонстрировали интенсивные лимбические судороги до введения SR, длительность клонуса резко увеличивалась после его введения - с 37 до 57 сек и с 26 до 155 сек. Судороги, развившиеся *de novo* у киндлинг-резистентных крыс, представляли собой мягкий лимбический клонус (стадии 1-2 по шкале Racine), характерный для ранних стадий киндлинга. Лимбический клонус, появившийся после введения SR у АК-резистентных крыс, продолжал развиваться после окончания введения препарата (Рис. 5 Д). В течение этих двух недель общее число лимбических судорог у экспериментальных крыс было достоверно выше (15/20), чем у контрольных животных (8/24) ( $p < 0.01$ , тест Фишера).



**Рис. 5.**

Проэпилептическое действие антагониста эндоканнабиноидных CB1 рецепторов SR141716 на лимбический компонент аудиогенных судорог у крыс Wistar со стабильным судорожным ответом на звук. По оси ординат - средняя длительность (А) и латентность (В) аудиогенных судорог, длительность отдельных фаз AC - судорожного бега (С) и лимбического клонуса (D) в секундах, а также частота возникновения лимбического клонуса (Е) до и после введения растворителя (синий цвет, n=6) и SR (красный цвет, n=5). Остальные обозначения см. рис. 4.

### ***Антиэпилептогенный эффект агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212(2)***

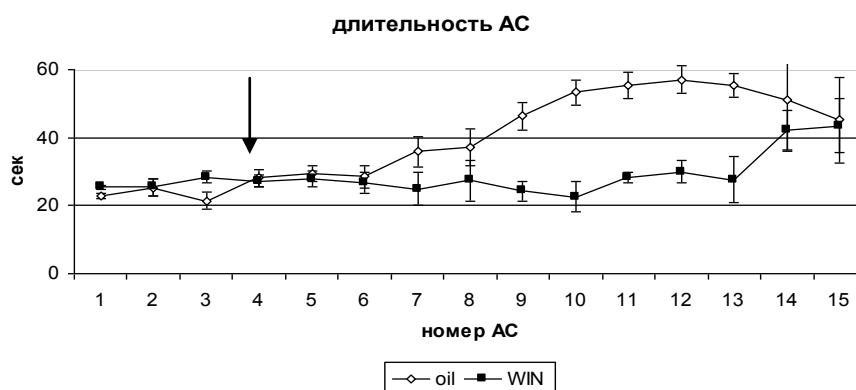
В следующей серии экспериментов оценивалось влияние на иктогенез и эпилептогенез агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212(2) (WIN) при однократном введении на ранних стадиях аудиогенного киндлинга у крыс КМ. Повторный вызов интенсивных аудиогенных судорог у этих крыс с высокой судорожной чувствительностью всегда ведет к быстрому развитию киндлинга (глава 1). Поведенческим выражением АК у этих крыс является постепенное увеличение длительности судорожного ответа за счет появления и удлинения фазы вторично генерализованного посттонического клонуса (ПТК).

Ни WIN (4 мг/кг), ни растворитель не меняли латентность, длительность и интенсивность аудиогенных судорог, вызванных через час после введения ( $p>0.3$ ) (Таблица 5).

**Таблица 5.** Параметры аудиогенных судорог, вызванных у крыс КМ через 1 час после введения WIN55212.2 или растворителя.

	<i>ЛП (с)</i>	<i>Бег (с)</i>	<i>Тонус (с)</i>	<i>Интенсивность (балл, Jobe)</i>
растворитель	7.2±1.5	4.9±0.5	18.5±0.7	8.6±0.4
WIN55.212-2	8.1±1.3	5.7±0.3	19.0±0.5	8.6±0.3

Несмотря на отсутствие острых иктогенных эффектов, данная доза WIN оказывала мощное антиэпилептогенное влияние. После однократного введения 4 мг/кг WIN формирование аудиогенного киндлинга значительно замедлялось (Рис. 6). Дисперсионный анализ (ANOVA for repeated measures) показал достоверное влияние WIN на изменения длительности повторных судорог ( $F=3.56$ ,  $p<0.0001$ ). У контрольных крыс ПТК развивался после  $8.1 \pm 0.5$  повторных АС, а у крыс с предварительным введением WIN после  $13.9 \pm 0.6$  тестов ( $p<0.0001$ ). При этом латентность и длительность остальных компонентов повторных АС (бега и тонуса), а также их интенсивность не менялись ( $p>0.5$ ).



**Рис. 6.** Тормозное влияние агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN 55,212 на формирование аудиогенного киндлинга у крыс КМ. WIN в дозе 4 мг/кг или растворитель (oil) вводился однократно перед четвертой звуковой стимуляцией (указано стрелкой). По оси ординат – длительность аудиогенных судорог, по оси абсцисс – номер АС.

## Обсуждение

Множество данных указывает на то, что эндоканнабиноидная система активно вовлечена в эпилептогенез и может быть многообещающей мишенью при лечении эпилепсии. Однако психоактивные свойства и множество побочных эффектов каннабиноидов ограничивают их прямое исследование и использование в клинике. Поэтому основная информация о влиянии эндоканнабиноидной сигнализации на развитие эпилептического процесса получена в исследованиях на экспериментальных моделях.

Имеющиеся данные говорят о крайне сложной роли эндоканнабиноидной сигнализации в эпилептогенезе. Широкое распределение СВ1 рецепторов в ЦНС, их модулирующее влияние на активность нескольких медиаторных систем, высокая пластичность эндоканнабиноидной сигнализации, временная и региональная специфичность ее изменений в эпилептическом мозге (Goffin et al., 2011; Falensky et al., 2009) осложняют исследование и понимание роли этой системы в патогенезе эпилепсии. Показано, что активация эндоканнабиноидной передачи во время судорог может быть направлена как на снижение гипервозбудимости за счет ослабления возбуждающей глутаматергической передачи (Lutz, 2004; Monory et al., 2006), так и на провокацию эпилептогенеза за счет торможения ГАМК передачи (Chen et al., 2007).

Проведенное нами исследование на модели АК продемонстрировало выраженное проконвульсивное действие антагониста CB1 рецепторов SR141716 и длительное антиэпилептогенное влияние синтетического агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55,212. Эти результаты согласуются с данными, полученными на других моделях (Chen et al., 2007; Ludanyl et al., 2008; Falensky et al., 2009; van Rijn et al., 2010; Bhaskaran, Smith, 2010), и свидетельствуют об участии эндоканнабиноидной сигнализации в быстрых и долговременных изменениях чувствительности мозга к патологическому возбуждению при хронической эпилепсии.

***Проэпилептогенное влияние антагониста эндоканнабиноидных рецепторов SR141716 на аудиогенные судороги и аудиогенный киндлинг у крыс Wistar***

Эксперименты с антагонистом CB1 рецепторов SR141716 показали следующее.

(1) Пятидневное введение антагониста CB1 рецепторов SR141716 не влияет на *врожденную* устойчивость к аудиогенным судорогам здоровых крыс Wistar. Ранее нами было показано, что хроническое ежедневное введение SR в той же дозе уже через неделю может вызвать у неэпилептических крыс развитие спонтанных лимбических судорог (van Rijn et al., 2011). Способность антагониста CB1 рецепторов вызывать развитие лимбических (но не стволовых судорог) у здоровых крыс Wistar позволяет говорить о повышенной чувствительности лимбических сетей переднего мозга к блокаде CB1 рецепторов, что соответствует данным о высокой плотности эндоканнабиноидных рецепторов в лимбических структурах и сравнительно низкой – в стволовых отделах мозга (Tsou et al., 1998).

(2) В то же время антагонист CB1 рецепторов оказывает длительное проконвульсивное влияние на судорожную чувствительность у исходно «аудиогенных» крыс Wistar с *приобретенной* устойчивостью к аудиогенным судорогам (группа 2). Хроническое введение SR вызывало восстановление судорожной чувствительности к звуку у этих крыс. Интересно, что в клинике также описано возобновление судорог после их длительного отсутствия у пациента, которого лечили SR141716 (римонабантом) от ожирения (Braakman et al., 2009).



Механизмы такого проэпилептогенного действия еще предстоит исследовать. Исчезновение АС после повторных стимуляций у аудиогенных крыс группы 2 предполагает формирование устойчивости стволовых сетей к эпилептогенной активации звуком. Такое же исчезновение судорожной реакции на звук после 18 повторных аудиогенных припадков ранее описано у крыс GEPR-3 (Merrill et al., 2005). Нерегулярное возникновение аудиогенных судорог и ослабление интенсивности их тонического компонента при частой звуковой стимуляции (от 2 до 5 стимулов в день) описано у крыс КМ и WAR (Батуев и др., 1997; Ватаев, 2005; Galvis-Alonso et al., 2004). Ослабление повторных судорог, вплоть до их полного торможения, описано также на модели электрического киндлинга (Goddard et al., 1969; Racine et al., 1993). Инициация судорог (с помощью электрошока или каината) перед началом электрического киндлинга замедляет его формирование (Mucha and Pinel, 1977; Post et al., 1984; Vragin et al., 2002). Также у крыс КМ в течение нескольких дней после электрошокового раздражения интенсивность аудиогенных судорог снижается вдвое и полностью тормозится миоклонус (лимбический клонус), развившийся при повторной звуковой стимуляции (Крушинский и др. 1958). Предполагается, что во время судорог происходит активация эндогенных адаптивных механизмов, ослабляющих реакцию на последующую эпилептогенную стимуляцию, но природа этих компенсаторных процессов до сих пор остается неясной. Результаты, полученные нами на модели АК, показывают, что эти механизмы критически связаны с активацией эндоканнабиноидной системы и ее СВ1 рецепторов.

То, что антагонист СВ1 рецепторов оказывал длительное следовое влияние на чувствительность к аудиогенным судорогам у крыс группы 2, указывает на существование тонической регуляции возбудимости субстратов АС со стороны эндоканнабиноидной системы. Поскольку возобновление судорожного ответа на звук у этих крыс происходит только после окончания хронического введения SR и наблюдается в течение достаточно длительного периода (двух недель), речь идет о неких пластических изменениях в стволовых судорожных сетях, связанных с эндоканнабиноидной сигнализацией. Действительно в слуховом стволе (дорсальном кохлеарном ядре и НД), описаны различные формы синаптической, и внутренней пластичности, в контроле которых активно участвует эндоканнабиноидная система (Syka, 2002;

Tzounopoulos, 2008). Более того, предполагается, что эндоканнабиноидные CB1 рецепторы являются одним из главных модуляторов баланса возбуждения/торможения и синаптической пластичности в слуховом стволе (Zhao et al., 2009). Повторная эпилептическая активация слухового ствола при аудиогенных судорогах может вызывать локальные пластические изменения тонической активности эндоканнабиноидной системы, направленные на снижение нейронной возбудимости и судорожной чувствительности. Ослабление эндоканнабиноидной сигнализации при хроническом введении антагониста CB1 рецепторов может влиять на эти адаптивные изменения возбудимости слуховых отделов ствола.

Восстановление аудиогенного судорожного ответа у крыс с приобретенной устойчивостью к АС является единственным эффектом SR на стволую часть припадка. Гораздо более выраженные проэпилептические эффекты антагониста эндоканнабиноидных рецепторов наблюдались у крыс со стабильной судорожной реакцией на звук, и касались они лимбической части повторных аудиогенных приступов.

(3) У крыс со стабильным судорожным ответом на звук (группа 3) SR оказывал мощное влияние на чувствительность к лимбическому эпилептогенезу. Уже после первого введения антагониста CB1 рецепторов лимбический клонус удлинялся у киндлинг-чувствительных крыс и появлялся de novo у киндлинг-резистентных крыс, которые в предыдущих 25 тестах демонстрировали только стволые судороги без лимбического клонуса. Как обсуждалось в главе 1, появление лимбического клонуса в составе повторных АС является индикатором распространения эпилептиформной активности из ствола в передний мозг. Способность одной дозы SR «мгновенно» вызывать у киндлинг-резистентных крыс Wistar лимбические судороги означает, что при заблокированных CB1 рецепторах облегчается рекрутирование лимбических структур в эпилептическую сеть АС. Такой же эффект вызывает локальная активация аденилатциклазы в амигдале: после однократной инъекции форсколина в эту структуру у нераскачаных крыс GEPR-9 сразу же развиваются вторично-генерализованные судороги, характерные для поздних этапов АК (Tupal, Faingold, 2010a). Так как эндоканнабиноиды тонически тормозят активность аденилатциклазы, а SR снимает это торможение (Bidaut-Russel et al., 1990; Alger, 2004), проконвульсивный эффект SR на лимбический

компонент АС в нашей модели может быть опосредован повышением активности аденилатциклазы в миндалине. Поскольку гиппокамп или миндалина содержат много CB1 рецепторов (Tsou et al., 1998; Katona et al. 2001), SR может прямо повышать их возбудимость и чувствительность к эпилептической активации из слухового ствола.

Итак, проэпилептогенные эффекты фармакологической блокады CB1 рецепторов наблюдали только у крыс с исходной предрасположенностью к судорогам, что предполагает участие эндоканнабиноидной системы в модуляции, но не в генерации АС. Блокирование CB1 рецепторов у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией повышало процент крыс с судорожной реакцией на повторную звуковую стимуляцию (за счет устранения приобретенной устойчивости к АС у крыс группы 2) и повышало вероятность развития лимбических судорог в ответ на звук (за счет устранения резистентности к киндлингу у крыс группы 3). Этот результат предполагает участие тонической активности эндоканнабиноидной системы в адаптивном процессе, ведущем к купированию или смягчению судорожной реакции на повторные эпилептогенные воздействия. Действительно, есть данные, что CB1 рецепторы могут существовать в тонически активном состоянии (Pan et al., 1998). То, что тоническая активность эндоканнабиноидной системы может участвовать в формировании устойчивости к судорогам, подтверждается данными о повышенной экспрессии CB1 рецепторов в гиппокампе грызунов с врожденной устойчивостью к судорогам (Araujo et al., 2010) и о сниженной чувствительности к судорогам мышей с генетически повышенной экспрессией этих рецепторов на глутаматергических нейронах гиппокампа (Guggenhuber et al., 2010).

#### ***Антиэпилептогенное действие агониста эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212,2 на развитие аудиогенного киндлинга у крыс КМ***

Результаты экспериментов с агонистом эндоканнабиноидных рецепторов WIN55212,2 подтверждают гипотезу о защитной роли эндоканнабиноидной сигнализации в эпилептогенезе. Предварительное введение WIN на самых ранних этапах аудиогенного киндлинга в дозе, не вызывающей никаких «острых» эффектов, значительно задерживало его формирование у крыс КМ. То есть, достаточно слабая однократная стимуляция эндоканнабиноидной системы,

не влияющая на первичные стволовые судороги, в течение длительного периода предотвращает их вторичную генерализацию в передний мозг при повторном возникновении.

*Острые антиэпилептические* эффекты WIN были описаны в разных моделях эпилепсии *in vivo* и *in vitro* (Wallace et al., 2003; Rizzo et al., 2009; van Rijn et al., 2010; Citraro et al., 2013). При этом отмечалась крайне высокая эффективность этого агониста эндоканнабиноидных рецепторов (Шубина, Кичигина, 2011). Наши данные указывают на существование *длительного антиэпилептогенного* эффекта WIN55212. Антиэпилептогенный эффект этого агониста эндоканнабиноидных рецепторов при его хроническом введении был описан ранее на модели электрического киндлинга миндалины (Wendt et al., 2011). Но в этом исследовании WIN вводили перед каждой эпилептогенной стимуляцией, что затрудняло разделение острых и длительных эффектов препарата. Тем не менее, сохранение сниженной интенсивности судорог в течение недели после прекращения хронического введения WIN предполагало существование *длительного антиэпилептогенного* влияния этого агониста эндоканнабиноидных рецепторов на развитие электрического киндлинга.

Полученный нами результат предполагает, что даже однократная стимуляция эндоканнабиноидной системы на ранних этапах эпилептогенеза может активировать адаптивные механизмы, тормозящие эпилептогенез и замедляющие прогрессивную патологическую реорганизацию нейронных сетей. Ясно, что в данном случае основную роль играет не прямая стимуляция эндоканнабиноидных рецепторов (острые эффекты отсутствуют), а длительные пластические изменения эндоканнабиноидной сигнализации, вызванные кратковременной стимуляцией эндоканнабиноидной системы на ранних стадиях эпилептогенеза.

Таким образом, на модели аудиогенного киндлинга получены экспериментальные доказательства гипотезы о важной роли эндоканнабиноидной системы в эндогенных противосудорожных механизмах ЦНС. CB1 рецепторы могут быть мишенью для лечения, направленного на снижение риска интенсификации повторных приступов у пациентов с прогрессирующими формами эпилепсии. Проведенное исследование показало крайне высокую антиэпилептогенную активность агониста эндоканнабиноидных рецепторов (WIN55212), причем использование

протокола с однократным введением препарата особенно интересно с точки зрения снижения риска развития толерантности при хроническом применении препаратов, активирующих эндоканнабиноидную систему.

### **3.2.2. Участие гистаминергической системы в иктогенезе и эпилептогенезе при аудиогенной эпилепсии**

Гистаминергическая система – одна из моноаминергических систем мозга, обеспечивающих глобальную модуляцию активности ЦНС. Показано, что эта система участвует в контроле эпилептической активности (Feng, Faingold, 2000; Kamei, 2001; Tuomisto et al., 2001). У пациентов с парциальными судорогами описаны изменения плотности гистаминовых (H1) рецепторов вокруг эпилептического фокуса (Inuma et al., 1993). При повторной электрической стимуляции миндалина и развитии киндлинга наблюдается локальное уменьшение уровня гистамина в этой структуре (Kamei et al., 1998). Вещества, повышающие уровень гистамина, оказывают антиконвульсивное действие и тормозят судороги, вызванные PTZ и киндлингом миндалина (Tuomisto, Tacke, 1986; Tuomisto et al., 1987; Scherkl et al., 1991; Yokoyama et al., 1992; Kamei et al., 1998). Показана тесная корреляция между уровнем гистамина в мозге и торможением лимбических судорог в ответ на введение препаратов, модулирующих активность гистаминергической системы (Kamei et al., 1998).

Нижнее двухолмие (НД), играющее ключевую роль в инициации аудиогенного приступа (Faingold, 1999; Ross, Coleman, 2000), плотно иннервировано гистаминергическими волокнами, берущими свое начало в туберомамиллярных ядрах (Panula et al., 1989; Inagaki et al., 1990). У крыс с аудиогенной эпилепсией наблюдается общее снижение концентрации гистамина в мозге (Tuomisto et al., 1987; Раевский и др., 1995). Локальное и системное усиление гистаминергической передачи ослабляет тонические судороги, вызванные звуком у крыс КМ (Tuomisto et al., 1987) и снижает интенсивность аудиогенных судорог у крыс GEPR (Feng, Faingold, 2000).

Мы исследовали влияние метоприна, вызывающего повышение уровня гистамина в мозге путем блокады гистамин-N-метилтрансферазы, фермента деградации гистамина (Duch et al., 1978), на аудиогенные судороги разной интенсивности (у крыс КМ и Wistar) до и после формирования киндлинга.

Использовалась доза препарата (10 мг/кг), вызывающая при системном введении двукратное повышение концентрации гистамина в мозге (Hough et al., 1986; Itoh et al., 1991).

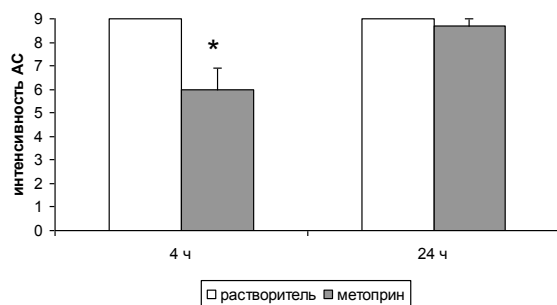
## Результаты

Метоприн (10 мг/кг), введенный «нераскачаным» крысам КМ, не влиял на латентность и общую длительность АС, но значительно менял интенсивность припадка и длительность его отдельных компонентов (таблица 9, рис. 10). Через 4 часа после инъекции метоприна только одна из шести крыс КМ демонстрировала максимальные аудиогенные судороги, характерные для животных этой линии. У остальных особей звук вызывал более мягкий припадок интенсивностью от 3 до 7 баллов по шкале Jobe et al. (1973) с более короткими тоническими судорогами. Через 24 часа после введения метоприна длительность тонических судорог продолжала оставаться сниженной ( $p < 0.005$ ). Несмотря на такое выраженное тормозное действие на тонические судороги, метоприн вызывал увеличение длительности начальной локомоторной фазы АС ( $p < 0.05$ ).

**Таблица 9.** Влияние метоприна (10 мг/кг) на параметры и длительность отдельных фаз аудиогенных судорог (АС) у крыс КМ.

Параметры АС	растворитель		метоприн	
	4 ч (n=6)	24 ч (n=6)	4 ч (n=6)	24 ч (n=6)
ЛП АС (с)	4.2±1.1	4.0±1.1	4.3±1.8	3.8±1.1
Длительность АС (с)	19.8±0.5	18.2±0.6	18.7±1.2	17.2±0.7
Длительность бега (с)	4.2±0.2	4.0±0.3	7.3±1.1*	5.5 ±1.1
Длительность тонуса (с)	15.3±0.5	16.8±0.8	11.3±0.4**	11.7±0.8**
Балл (Jobe)	9.0±0.0	9.0±0.0	6.0±0.9*	8.7±0.3

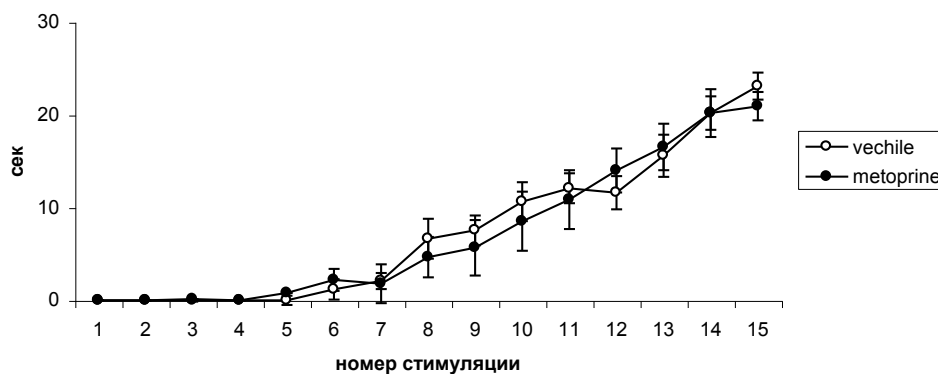
\* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.005$  – по сравнению с контрольной группой (Mann-Whitney тест).



**Рис. 10.** Влияние метоприна (10 мг/кг) на интенсивность аудиогенных судорог у крыс КМ.

\* -  $p < 0.05$ , достоверное отличие от контроля. Ордината – интенсивность АС по шкале Jobe et al., (1973).

Введение метоприна перед четвертым тестом не влияло на скорость формирования киндлинга при повторной стимуляции крыс КМ (Рис. 11).



**Рис. 11.** Отсутствие влияния метоприна на формирование аудиогенного киндлинга у крыс КМ. Препарат в дозе 10 мг/кг был введен перед 4-й стимуляцией. По оси ординат – длительность вторично генерализованных судорог (посттонического клонуса) в секундах.

У крыс КМ со сформированным киндлингом метоприн, по-прежнему, не меняя общей длительности аудиогенного приступа, удлинял начальный бег и снижал интенсивность и длительность тонических судорог (таблица 10). Не было обнаружено влияния метоприна на длительность вторично генерализованных клонических судорог – посттонического клонуса (ПТК).

**Таблица 10.** Влияние метоприна (10 мг/кг) на параметры и длительность отдельных фаз аудиогенных судорог (АС) у крыс КМ со сформированным киндлингом

Параметры АС	растворитель		метоприн	
	4 ч (n=8)	24 ч (n=12)	4 ч (n=8)	24 ч (n=12)
ЛП АС (с)	3.9±1.2	3.6±0.8	5.0±1.5	5.3±1.3*
Длительность АС (с)	44.7±1.8	40.5±2.0	36.8±3.5	42.9±3.8
Длительность бега (с)	3.6±0.3	3.6±0.2	8.1±1.3**	7.0. ±0.5**
Длительность тонуса (с)	16.1±0.3	16.2±0.3	10.0±2.1*	15.7±1.9
Длительность ПТК (с)	25.0±2.1	24.7±1.6	27.4±8.1	22.1±2.8
Балл (Jobe)	9.0±0.0	9.0±0.0	5.0±0.7**	5.5±0.6**

\* -  $p < 0.05$  и \*\* -  $p < 0.005$  – по сравнению с контрольной группой (Mann-Whitney тест).

Чтобы понять, является ли удлинение начальной локомоторной фазы АС результатом специфического облегчающего действия метоприна на этот компонент приступа или следствием тормозного влияния препарата на тонические судороги (задержки их развития), мы проверили влияние той же дозы метоприна на одиночный эпизод аудиогенного бега (за которым не

следуют генерализованные клонико-тонические судороги) у крыс Wistar. У этих крыс метоприн в три раза увеличивал длительность двигательного возбуждения ( $p < 0.05$ , таблица 11) и резко повышал его интенсивность. Первые звуковые стимулы вызывали короткий эпизод слабого бега без прыжков у контрольных животных и длительный интенсивный бег с множеством высоких прыжков у крыс, которым был предварительно введен метоприн. Несмотря на удлинение и интенсификацию самого бега, общая интенсивность судорог не менялась, и у большинства крыс звук вызывал по-прежнему один эпизод бега без клонико-тонических судорог (балл 1). Только у одной крысы бег закончился коротким генерализованным клонусом (балл 3). Через 24 часа после введения метоприна средняя длительность аудиогенного бега оставалась повышенной, хотя это различие не достигало уровня достоверности.

**Таблица 11.** Влияние метоприна (10 mg/kg) на латентность и длительность АС (двигательного возбуждения или бега) у крыс Wistar

Параметры	растворитель		метоприн	
	4 ч (n=6)	24 ч (n=6)	4 ч (n=6)	24 ч (n=5)
ЛП (с)	13.8±0.7	15.0±1.2	15.0±1.5	17.8±1.0
Длительность бега (с)	6.8±0.3	7.0±0.3	22.7±7.4*	13.8 ±5.6
Балл (Jobe)	1.0±0.0	1.0±0.0	1.3±0.3	0.8±0.2

\* -  $p < 0.05$  – достоверное отличие от контрольной группы (Mann-Whitney тест).

У крыс Wistar со сформированным киндлингом метоприн вызывал повышение интенсивности стволовой части АС с 1 балла до  $2.25 \pm 0.9$  баллов через 4 часа ( $p < 0.05$ ) и до  $3.0 \pm 0.0$  баллов через 24 часа ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney тест).

## Обсуждение

Проведенное исследование показало, что метоприн, вызывающий общее повышение уровня гистамина в мозге, оказывает избирательное влияние на первичные стволовые судороги (двигательное возбуждение и тонус), но не на переднемозговую компонент АС (ПТК). Причем характер влияния метоприна на *стволовую* часть аудиогенного припадка отличается для судорог разного типа: системное введение препарата ослабляет тонические судороги и одновременно усиливает начальное локомоторное возбуждение.



Тормозное влияние метоприна на тонические судороги согласуется с многочисленными данными об антиконвульсивных эффектах стимуляции центральной гистаминергической системы (Tuomisto, Tacke, 1986; Scherkl et al., 1991; Yokoyama et al., 1992; Kamei et al., 1998) и ее тормозном влиянии на тонические судороги в модели АС (Tuomisto et al., 1987; Feng, Faingold, 2000). Наши эксперименты показали, что наряду с этим антиконвульсивным действием на тонический компонент аудиогенных судорог, активация гистаминергической системы усиливает начальное двигательное возбуждение, предшествующее тоническим судорогам. То, что экзальтация бега наблюдается независимо от того, следуют за ним тонические судороги или нет, указывает на прямое потенцирующее действие данного гистаминергического препарата на самый ранний компонент АС.

Существуют, хотя и немногочисленные, данные о проконвульсивных эффектах активации гистаминергической системы мозга. Стимуляция этой системы может облегчать амигдаларный киндлинг (Wada et al., 1996; Wu et al., 2008) и потенцировать химически вызванные судороги (Sturman et al., 1994). На некоторых моделях описаны смешанные (проконвульсивные и антиконвульсивные) эффекты активации гистаминергической передачи (Harada et al., 2004; Ishikawa et al., 2007). У крыс GEPR-9 локальная микроинъекция гистамина в НД вызывает быстрое и длительное торможение тонической фазы АС, но не влияет на локомоторную и клоническую фазы припадка у крыс с абстинентными аудиогенными судорогами (Feng, Faingold, 2000).

Различное влияние общей фармакологической активации гистаминергической системы на разные компоненты аудиогенного приступа может быть результатом сложной роли этой системы в функционировании мозга и специфическими региональными эффектами гистамина. Хотя все стволовые ядра, вовлеченные в сеть АС, плотно иннервированы гистаминергическими волокнами, и здесь много гистаминовых рецепторов, общее повышение уровня гистамина может оказывать специфическое действие на отдельные структуры этой сети. Например, *pedunculopontine nucleus*, получающее мощный возбуждающий гистаминергический вход из туберомамиллярного ядра, входит в состав локомоторной области среднего мозга (Garcia-Rill, 1986) и вовлечено в экспрессию судорог, вызванных звуком (Clough et al., 1997; Simler et al., 1999; Merrill et al., 2003) и электрической

стимуляцией НД (McCown et al., 1995). Эта область плотно иннервирована гистаминергическими волокнами, и микроинъекция сюда гистамина вызывает arousal (Lin et al., 1996). Активация *pedunculopontine nucleus* при введении метоприна и общем повышении уровня гистамина в мозге может усиливать двигательное возбуждение во время аудиогенного припадка.

Таким образом, полученные данные показывают, что центральная гистаминергическая система оказывает мощное модулирующее влияние на *стволовые* компоненты АС. Торможение тонического компонента аудиогенных судорог и облегчение начального двигательного возбуждения после введения метоприна предполагает сложную природу стволового судорожного ответа и смешанное (про/антиконвульсивное) влияние гистаминергической системы на иктогенез.

### **3.2.3. Участие ГАМКергических механизмов в экспрессии аудиогенных судорог**

Ослабление тормозных процессов в структурах головного мозга считается одним из важнейших механизмов развития судорог разного генеза. Микроинъекции антагонистов ГАМК рецепторов в структуры переднего мозга (пириформную кору, миндалину) вызывают клонические судороги лимбического типа (Pirreda, Gale, 1985; Turski et al., 1985; Ebert et al., 2000). Такие же инъекции в стволовые отделы мозга (нижнее или верхнее двухолмие, околотоводопроводное серое вещество) вызывают судорожный бег и генерализованные клонико-тонические судороги (Millan et al., 1986; Faingold et al., 1994; Merrill et al., 2003). Локальная потенция ГАМКергической передачи в структурах ствола и переднего мозга тормозит соответствующий тип судорог (Pirreda et al., 1987; Stevens et al., 1988; N'Gouermo, Faingold, 1999). У крыс с генетической аудиогенной эпилепсией описано ослабление ГАМКергической передачи в НД, и, по мнению ряда исследователей, именно дефицит ГАМК торможения в этой структуре лежит в основе чувствительности к аудиогенным судорогам (Faingold, 2002).

Вигабатрин (ВГБ) необратимо блокирует активность ГАМК-трансаминазы (фермента деградации ГАМК), повышая синапсосомальную и внеклеточную концентрацию ГАМК в головном мозге (Jung et al., 1977; Gale,

Iadarola, 1980; Loscher et al., 1989; Valdizan et al., 1999). Клинические данные свидетельствуют о разной эффективности ВГБ при парциальной и генерализованной формах эпилепсии у пациентов (Michelucci, Tassinari, 1989; Snodgrass, 1992). В исследованиях на животных антиконвульсивное действие системных инъекций ВГБ также варьирует - от низкой эффективности в модели максимального электрошока (Bernasconi et al., 1988; Liu et al., 1990) до мощного антиконвульсивного действия в киндлинг-модели парциальных судорог (Loscher et al., 1989; Myslobodsky et al., 1979b). Более того, результаты, полученные даже на одной и той же модели разными исследователями, часто отличаются, что связано с различиями в способах введения препарата, его дозировке, линейных различиях экспериментальных животных и т.д.

Одним из важных преимуществ модели аудиогенного киндлинга является то, что она позволяет тестировать влияние антиэпилептических препаратов на судороги разного типа у одного и того же животного. Аудиогенные судороги у крыс со сформированным аудиогенным киндлингом состоят из последовательно сменяющих друг друга и четко различающихся по своему фенотипу поведенческих компонентов, генерируемых сетями ствола и переднего мозга и моделирующих первично генерализованные и парциальные (лимбические) судороги, соответственно. Мы исследовали влияние ВГБ на судороги разной интенсивности и разного типа у крыс КМ, Wistar и WAG/Rij со сформированным аудиогенным киндлингом. Так как большинство авторов сообщают о повышении концентрации ГАМК в мозге в течение, по крайней мере, 24 часов (Valdizan et al., 1999; Loscher et al., 1989), эффекты ВГБ тестировали через 2, 4 и 24 часа после его введения.

## **Результаты.**

### ***Влияние фармакологической стимуляции ГАМКергической передачи на аудиогенные судороги у крыс КМ***

Вигабатрин в дозах 100 и 200 мг/кг уменьшал общую длительность аудиогенных судорог у крыс КМ, но не менял их латентность (таблица 6). Изменение длительности судорог зависело от дозы ( $F(2,96)=16.0$ ;  $p<0.001$ ) и времени после введения препарата ( $F(3,96)=2.81$ ;  $p=0.044$ ). Эффект

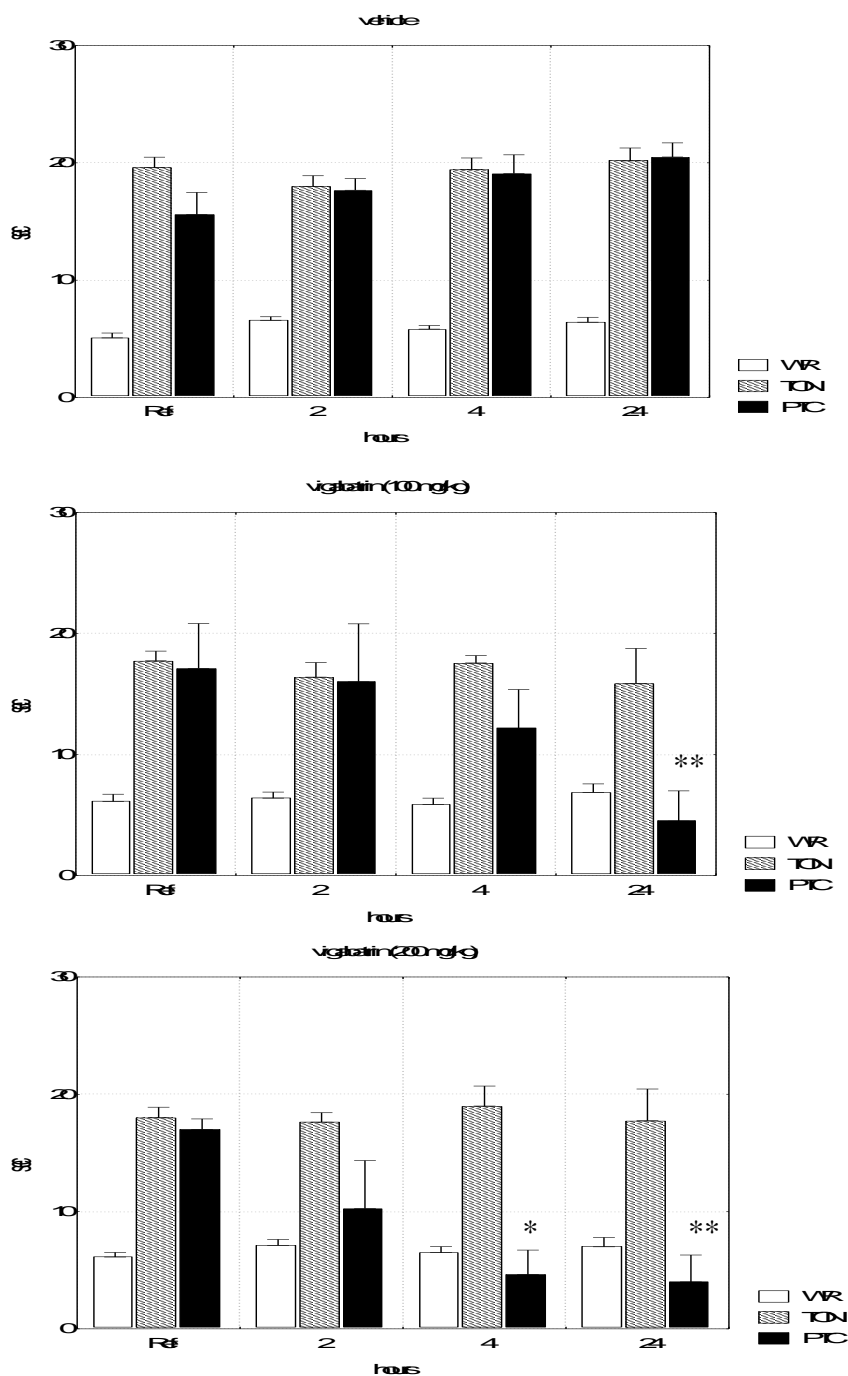
взаимодействия факторов «доза» и «время» был достоверным ( $F(6.96)=3.90$ ;  $p=0.002$ ). Post-hoc анализ показал достоверное снижение общей длительности АС через 4 и 24 часа после введения ВГБ.

Укорочение АС происходило за счет избирательного торможения переднемозговой части припадка – посттонического клонуса (ПТК). На рисунке 7 приведены средние длительности всех трех компонентов АС у крыс КМ до и через 2, 4 и 24 часа после введения физраствора, 100 и 200 мг/кг ВГБ. Введение ВГБ, не меняя длительности стволовых компонентов АС (бега и клонико-тонических судорог), резко сокращало продолжительность ПТК – переднемозгового компонента припадка.

**Таблица 6.** Влияние вигабатрина на характеристики аудиогенного припадка у раскочанных крыс КМ

	<i>Часы после введения</i>	<i>Физраствор</i>	<i>Вигабатрин 100 мг/кг</i>	<i>Вигабатрин 200 мг/кг</i>
Латентный период (сек)	Ref	5.6 ± 3.4	5.1 ± 1.2	5.8 ± 1.1
	2	5.6 ± 0.9	3.8 ± 1,5	6.3 ± 2.1
	4	6.2 ± 1.1	4.2 ± 1.0	5.8 ± 1.5
	24	4.8 ± 1.8	4.8 ± 1.1	8.3 ± 2.2
Общая длительность (сек)	Ref	39.3 ± 2.2	41.0 ± 3.8	39.9 ± 1.8
	2	42,3 ± 1.4	38.8 ± 4.1	35.0 ± 4.4
	4	44.3± 1.7	33.9 ± 3.4*	30.1 ± 2.8**
	24	46.3 ± 1.1	27.3 ± 4.1 **	28.9 ± 3.3**
Развитие ПТК (%)	Ref	100 (12/12)	100 (8/8)	100 (8/8)
	2	100 (12/12)	100 (5/5)	63* (5/8)
	4	100 (12/12)	71 (5/7)	50* (4/8)
	24	100 (12/12)	50* (4/8)	38* (3/8)

Развитие ПТК выражено в процентах (числе) крыс, у которых в составе приступа присутствовал посттонический клонус (ПТК), относительно общего числа тестируемых животных. \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.005$  – достоверная разница относительно контрольной группы с введением физраствора.



**Рис. 7** . Влияние вигабатрина (100 и 200 мг/кг) на длительность фаз АС – бега (WR), тонических судорог (TON) и посттонического клонуса (PTC) у крыс КМ со сформированным киндлингом. Абсцисса – время до (Ref) и после введения препарата (часы), ордината – средняя длительность каждой фазы АС (сек). \*\*  $p < 0.005$  – достоверное отличие от контроля с введением физраствора (vehicle).

Статистический анализ показал достоверное влияние дозы ВГБ ( $F(2.95)=18.0$ ;  $p < 0.0001$ ) и времени после введения ( $F(3.95)=5.06$ ;  $p = 0.003$ ) на длительность ПТК, а также достоверное взаимодействие дозы и времени ( $F(6.95)=4.71$ ;  $p = 0.0003$ ). Post hoc сравнение показало тормозное влияние ВГБ на клонические судороги (ПТК) через 24 часа после введения низкой (100 мг/кг) и через 4 и 24 часа после высокой (200 мг/кг) дозы. У некоторых крыс КМ посттонический клонус полностью исчезал, и паттерн АС был таким же, как до формирования киндлинга. Число крыс, демонстрирующих ПТК, снижалось с

увеличением дозы препарата и временем после его введения, достигая минимума (38% от всех крыс) через 24 часа после введения 200 г/кг ВГБ.

***Влияние фармакологической стимуляции ГАМКергической передачи на аудиогенные судороги у крыс Wistar и WAG/Rij***

Как и у крыс КМ, у крыс Wistar и WAG/Rij со сформированным аудиогенным киндлингом вигабатрин уменьшал общую длительность судорог, не меняя их латентности (таблицы 7 и 8). Выявлено достоверное влияние дозы препарата ( $F(2.68)=24.9$ ;  $p<0.0001$  для крыс Wistar и  $F(2.73)=26.1$ ;  $p<0.0001$  для крыс WAG/Rij), времени после его введения ( $F(3.68)=6.06$ ;  $p=0.001$  и  $F(3.73)=9.65$ ;  $p<0.001$ , соответственно), а также взаимодействие факторов «доза» и «время» ( $F(6.68)=2.48$ ;  $p=0.031$  для крыс Wistar и  $F(6.73)=4.03$ ;  $p=0.002$  для крыс WAG/Rij). Post hoc анализ показал достоверное снижение общей длительности АС, начиная с 4-го часа после введения 100 мг/кг ВГБ ( $p<0.05$ ) и со 2-го часа после введения 200 мг/кг ВГБ ( $p<0.05$ ) с дальнейшим снижением к 24-му часу ( $p<0.005$ ).

Снижение общей длительности АС после системного введения ВГБ происходило опять-таки за счет избирательного подавления лимбического клонуса, развившегося в ходе киндлинга. На рисунке 8 приведены данные о длительности обеих фаз аудиогенных судорог у крыс Wistar и WAG/Rij до и после введения физраствора и разных доз ВГБ. Введение ВГБ не влияло на параметры начальной фазы бега. Длительность лимбического клонуса менялась в зависимости от дозы ВГБ ( $F(2.68)=25.1$ ;  $p<0.0001$  для крыс Wistar и  $F(2.73)=29.6$ ;  $p<0.0001$  для крыс WAG/Rij) и времени после введения препарата ( $F(3.68)=6.24$ ;  $p=0.001$  для крыс Wistar и  $F(3.73)=9.07$ ;  $p<0.0001$  для крыс WAG/Rij). Взаимодействие факторов «доза» и «время» было достоверным для обеих линий:  $F(6.68)=2.52$ ;  $p=0.029$  для крыс Wistar и  $F(6.73)=3.81$ ;  $p=0.002$  для крыс WAG/Rij. У многих крыс этих линий ВГБ вызывал полное подавление лимбических судорог, развившихся в ходе киндлинга. С увеличением дозы и времени после введения препарата частота и интенсивность лимбического клонуса снижались, и через 24 часа после введения 200 мг/кг ВГБ наблюдали полный блок этой фазы припадка у всех крыс обеих линий (Таблицы 7 и 8, Рис. 9).

**Таблица 7.** Влияние вигабатрина на характеристики аудиогенного приступа у крыс Wistar со сформированным аудиогенным киндлингом

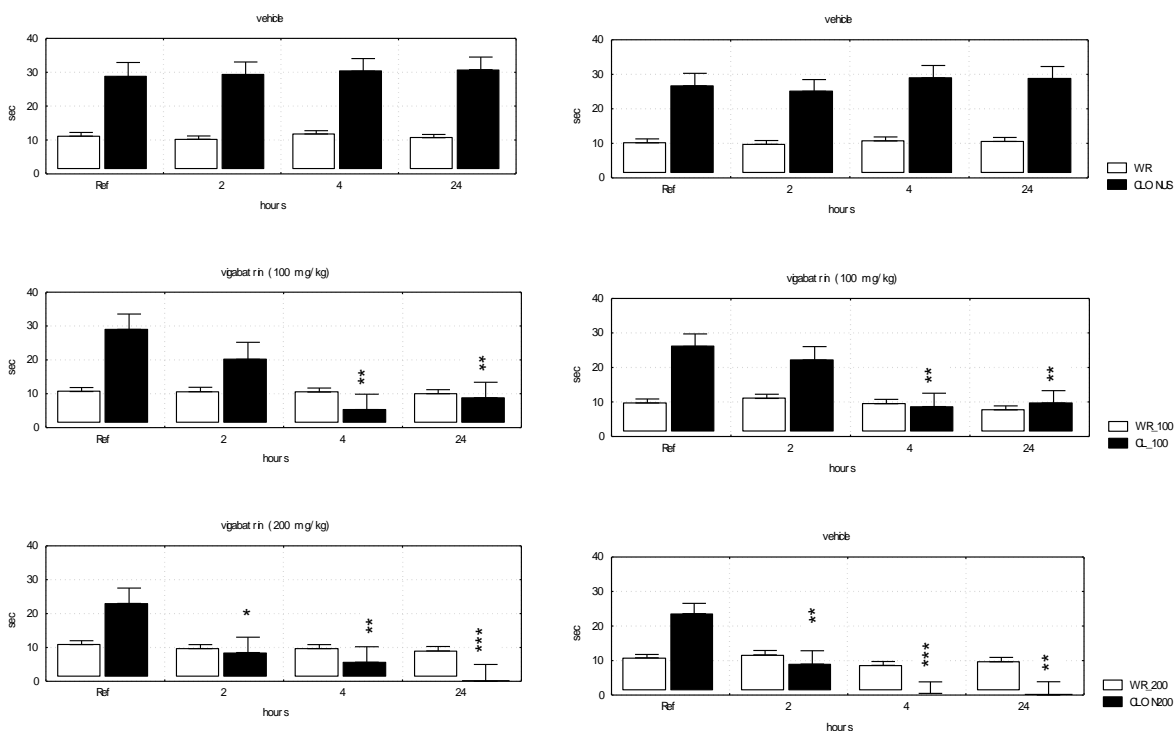
	<i>Часы после введения</i>	<i>Физраствор</i>	<i>Вигабатрин 100 мг/кг</i>	<i>Вигабатрин 200 мг/кг</i>
Латентный период (сек)	Ref	16.7 ± 2.9	16.3 ± 3.0	15.2 ± 2.4
	2	16.6 ± 2.4	16.2 ± 4.3	13.8 ± 1.5
	4	17.1 ± 3.2	21.8 ± 5.4	13.7 ± 1.4
	24	17.4 ± 1.8	18.9 ± 3.4	13.0 ± 1.4
Общая длительность (сек)	Ref	39.9 ± 3.6	39.7 ± 4.0	33.8 ± 2.7
	2	39.6 ± 4.1	30.8 ± 6.5	18.2 ± 6.2*
	4	42.2 ± 3.1	15.8 ± 6.3**	15.3 ± 6.2*
	24	41.4 ± 3.4	18.8 ± 6.3**	9.0 ± 0.3**
Развитие лимбического клонуса (%)	Ref	100 (7/7)	100 (6/6)	100 (6/6)
	2	100 (9/9)	80 (4/5)	33* (2/6)
	4	100 (9/9)	17* (1/6)	20* (1/6)
	24	100 (9/9)	33* (2/6)	0** (0/5)

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$  – достоверное отличие от контрольной группы.

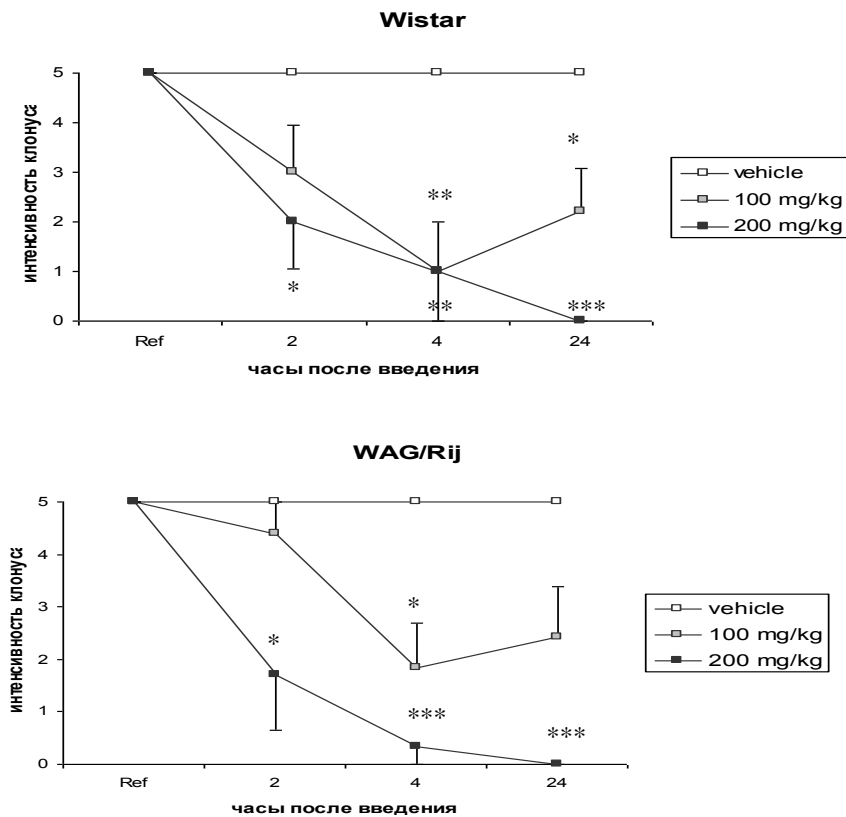
**Таблица 8.** Влияние вигабатрина на на характеристики аудиогенного приступа у крыс WAG/Rij со сформированным аудиогенным киндлингом

	<i>Часы после введения</i>	<i>Физраствор</i>	<i>Вигабатрин 100 мг/кг</i>	<i>Вигабатрин 200 мг/кг</i>
Латентный период (сек)	Ref	12.1 ± 0.7	11.5 ± 1.0	11.7 ± 1.1
	2	12.1 ± 1.7	11.4 ± 2.2	14.5 ± 2.0
	4	11.4 ± 1.2	12.0 ± 1.3	14.3 ± 1.3
	24	12.9 ± 1.3	16.1 ± 1.4	16.2 ± 1.6
Общая длительность (сек)	Ref	36.9 ± 2.3	35.7 ± 2.0	34.4 ± 2.0
	4	39.7 ± 3.8	18.2 ± 5.0**	9.1 ± 2,4***
	24	37.9 ± 3.4	17.4 ± 5.6**	9.6 ± 3.4***
Развитие лимбического клонуса (%)	Ref	100 (7/7)	100 (7/7)	100 (6/6)
	2	100 (8/8)	100 (6/6)	33* (2/6)
	4	100 (7/7)	50 (3/6)	17* (1/6)
	24	100 (7/7)	57 (4/7)	0** (0/6)

\* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ , \*\*\* -  $p < 0.0005$  – достоверные отличия от контрольной группы.



**Рис. 8.** Влияние вигабатрина (100 и 200 мг/кг) на длительность бега (WR) и лимбического клонуса (Clon) у крыс Wistar (слева) и WAG/Rij (справа) со сформированным аудиогенным киндлингом. \*, \*\*, \*\*\*  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$ ,  $p < 0.0005$  – достоверное отличие от контроля с введением физраствора (vehicle).



**Рис. 9.** Влияние вигабатрина на интенсивность лимбического клонуса у крыс Wistar и WAG/Rij со сформированным аудиогенным киндлингом. Ордината – интенсивность лимбического клонуса по шкале Racine (1972).



## Обсуждение

Проведенное исследование показало, что системное введение вигабатрина, препарата повышающего уровень внутримозгового ГАМК, в дозе 100 и 200 г/кг избирательно подавляет развитие переднемозговых судорог в составе аудиогенного припадка, не оказывая существенного влияния на его стволовые компоненты (двигательное возбуждение и клонико-тонические судороги). Этот эффект наблюдается у крыс разных генетических линий, при аудиогенных приступах разной интенсивности, у крыс со спонтанными абсансными судорогами (крысы WAG/Rij) и без них (крысы KM и Wistar).

Антиэпилептические свойства ВГБ связывают с общим усилением ГАМК торможения в мозге. Известно, что препарат быстро адсорбируется в течение первого часа после внутрибрюшинного введения животным (Jung et al., 1977; Rey et al., 1992) и длительно (до 48 часов) повышает концентрацию ГАМК путем необратимой блокады фермента метаболизма ГАМК ГАМК-трансаминазы (Jung et al., 1977; Valdizan et al., 1999). Антиконвульсивное действие ВГБ длится несколько суток. У пациентов, несмотря на короткое время полужизни в организме (5-7 часов) и относительно низкую концентрацию в плазме, ВГБ повышает концентрацию ГАМК в мозге в течение почти недели после однократной дозы (Ben-Menachem, 2011). У крыс Wistar описан параллелизм между повышением концентрации ГАМК и антиконвульсивным действием однократной инъекции ВГБ (Valdizan et al., 1999). Ранее предполагалось, что для антиконвульсивного действия ВГБ критично не общее повышение ГАМК, а увеличение ее концентрации в синапсоммах (Gale, Iadarola, 1980). Позже выяснилось, что снижение нейронной возбудимости и повышение судорожного порога после введения ВГБ связано скорее с ростом внеклеточной концентрации ГАМК и повышением тонического ГАМК (A) торможения (Overstreet, Westbrook, 2001; Wu et al., 2003).

Отсутствие тормозного влияния ВГБ на стволовую часть АС (двигательное возбуждение и клонико-тонические судороги) в наших экспериментах согласуется с сообщениями других исследователей о слабом влиянии этого препарата на однократные аудиогенные судороги (Liu et al., 1990; Frye et al., 1983). В модели максимального электрошока низкие дозы ВГБ также не оказывают влияния на тонические судороги (Bernasconi et al., 1988; Holland et

al., 1992), хотя их тормозят более высокие дозы (более 500 мг/кг) препарата (Gale, Iadarola, 1980). Дозы, использованные в нашем исследовании (100 и 200 мг/кг), очевидно, являются подпороговыми для торможения стволовых судорог, но достаточными для эффективного подавления судорог лимбического типа, генерируемых сетями переднего мозга.

Выраженное антиконвульсивное действие ВГБ на лимбические судороги, было ранее описано на модели электрического киндлинга миндаины (Loscher et al., 1989; Myslobodsky et al., 1979b; Shin et al., 1986). Но в этой модели противосудорожное действие ВГБ критически зависело от интенсивности электрической стимуляции, применяемой для инициации лимбических судорог. При высокой интенсивности эпилептогенной стимуляции, значительно превышающей судорожные пороги, были эффективны только высокие дозы ВГБ (800-1600 мг/кг). При использовании для вызова судорог более слабой околпороговой электрической стимуляции ВГБ тормозил лимбические судороги уже в низкой дозе 200 мг/кг (Rundfeld, Loscher, 1992). Было высказано предположение, что надпороговая электрическая стимуляция может маскировать противосудорожные эффекты ВГБ (Shin et al., 1986; Rundfeld, Loscher, 1992). Кроме того, показано, что сама по себе имплантация электродов, необходимая для инициации судорог в модели электрического киндлинга, может существенно менять локальный метаболизм ГАМК в миндалине и пороги судорожной активации этой структуры (Loscher et al., 1999).

Использование минимальной сенсорной стимуляции для инициации аудиогенных судорог позволило нам обнаружить антиконвульсивное влияние ВГБ при применении низких доз препарата и выявить различия в его эффективности относительно судорог разного генеза. Результаты нашего исследования показывают, что системное введение ВГБ, вызывающее общее повышение уровня ГАМК в мозге, селективно тормозит активность эпилептических сетей переднего мозга, генерирующих лимбические судороги, и оказывает минимальное влияние на стволовые сети, ответственные за генерацию двигательного возбуждения и тонических судорог. Ранее избирательное торможение вторично генерализованного лимбического компонента АС было описано у крыс Wistar и GEPR после локальной

инактивации миндаины и черной субстанции (Hirsch et al., 1997; Feng et al., 2001; Deransart et al., 2001).

Причина разного влияния системного введения вигабатрина на судороги, генерируемые стволом и передним мозгом, остается неясной. Не обнаружено региональных различий в степени повышения ГАМК после системного введения ВГБ (Sills et al., 2001; Losher et al., 1989). Но у крыс с генетической аудиогенной эпилепсией описан конститутивный дефицит ГАМК передачи в НД и других структурах ствола (Faingold, 2002; Evans et al., 1994; Doretto et al., 1994), что может ослаблять влияние ВГБ на стволую часть аудиогенного припадка. Раевский и соавторы (1995) показали, что у крыс КМ концентрация ГАМК снижена в продолговатом мозге, но повышена в коре. Букер с соавторами (Booker et al., 1986) описали гиперчувствительность ГАМК рецепторов в коре крыс GEPR-3 и GEPR-9 с генетической аудиогенной эпилепсией и предположили ее компенсаторный характер. Возможно, разная активность ГАМКергической системы в структурах ствола и переднего мозга у крыс с аудиогенной эпилепсией определяют разную чувствительность этих отделов к повышению ГАМК, вызванному системным введением ВГБ. Кроме того, повторные судороги могут приводить к увеличению числа постсинаптических ГАМК (A) рецепторов в лимбических структурах (Kalichman et al., 1982). Наконец, ВГБ может влиять на вторичную генерализацию судорог из ствола в кору.

Наши результаты показывают, что антиконвульсивный эффект ВГБ зависит от дозы препарата и интенсивности АС (КМ-Wistar), но не зависит от наличия у животных генетической абсансной эпилепсии (Wistar-WAG/Rij). Тормозное влияние ВГБ на интенсивные судороги у крыс КМ с высокой судорожной чувствительностью развивается позже (начиная с 4-го часа после введения), чем его действие на лимбический клонус у крыс Wistar и WAG/Rij с более мягкими аудиогенными судорогами (уже через 2 часа).

Таким образом, вигабатрин, вызывающий повышение уровня ГАМК в мозге, избирательно тормозит развитие переднемозгового компонента АС. Мы предполагаем, что этот результат отражает активное вовлечение ГАМКергической системы в контроль эпилептической активации переднего мозга. Важно отметить высокую чувствительность модели АС к действию ВГБ:

выраженные и быстро развивающиеся антиэпилептические эффекты наблюдали после введения минимальной дозы препарата (100-200 мг/кг), тогда как в других моделях антиконвульсивное действие было описано только для значительно более высоких доз ВГБ (500-1000 мг/кг).

#### **3.2.4. Антииктогенный и антиэпилептогенный эффекты леветирацетама при аудиогенной эпилепсии**

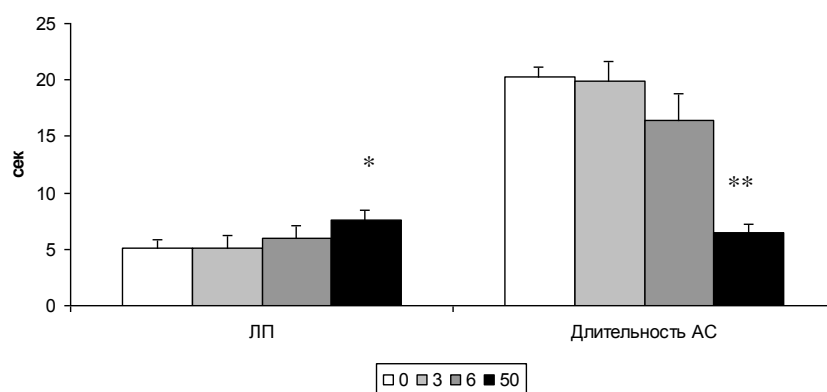
Новый антиэпилептический препарат второго поколения леветирацетам (ЛВ, Кеппра), который активно используется в клинике, обладает уникальным и до конца не выясненным механизмом действия на судорожную активность. Леветирацетам не активен в «острых» моделях эпилепсии, традиционно используемых для скрининга антиэпилептических препаратов (максимальный электрошок и PTZ), но оказывает мощный антииктогенный эффект в хронических моделях – электрического kindlingа (Loscher, Honak, 1993; Klitgaard et al., 1998; Stratton et al., 2003) и генетически детерминированных судорог у животных (Gower et al., 1995; Bouwman, van Rijn, 2004; Dedeurwaerdere et al., 2005; Ji-qun et al., 2005). Это резко отличает ЛВ от большинства других антиэпилептических препаратов, которые активны как в классических «острых», так и в хронических моделях эпилепсии. Кроме быстрого антииктогенного эффекта, на модели электрического kindlingа миндалины было описано длительное антиэпилептогенное действие ЛВ при хроническом введении (Loscher et al., 1998b; Stratton et al., 2003).

Мы исследовали быстрые (антииктогенные) и длительные (антиэпилептогенные) эффекты *однократного* введения ЛВ на модели аудиогенного kindlingа у крыс КМ и Wistar с высокой и низкой чувствительностью к АС, соответственно. Хотя антиконвульсивное (антииктогенное) действие ЛВ было впервые обнаружено на модели аудиогенных судорог (Gower et al., 1992, 1995), его влияние на развитие аудиогенного kindlingа и судороги разного типа в составе АС не исследовались.

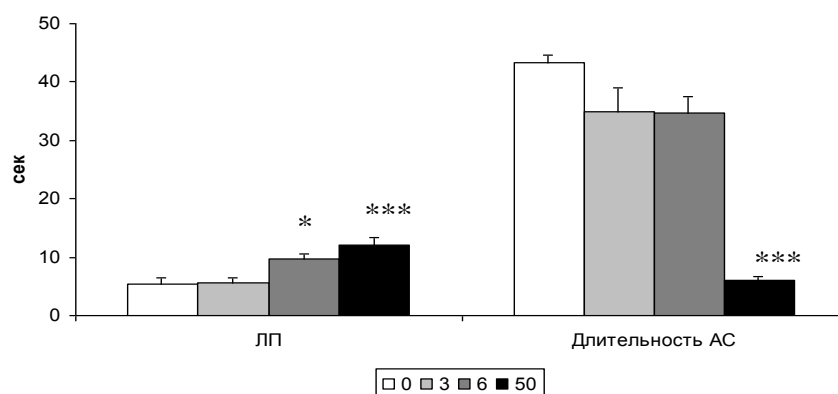
## Результаты

### *Антииктогенное влияние леветирацетама на аудиогенные судороги у крыс КМ*

У крыс КМ ЛВ демонстрировал сильное антииктогенное действие, вызывая через 1 час после введения увеличение латентности и снижение общей длительности АС как у «нераскачанных» крыс КМ (рис. 12), так и у крыс со сформированным киндлингом (рис. 13).



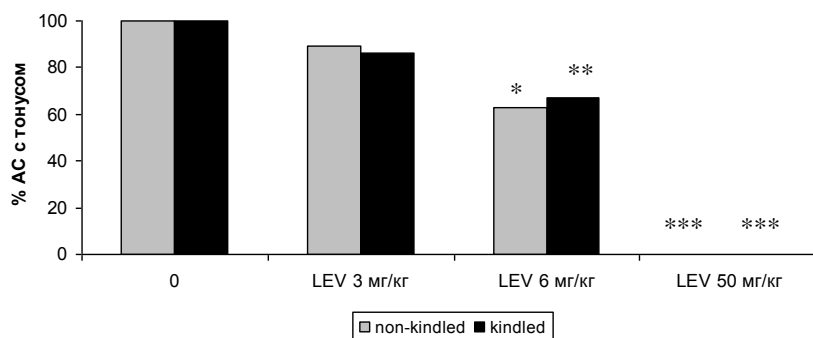
**Рис. 12.** Латентность (ЛП) и общая длительность аудиогенных судорог (АС) через 1 час после введения физраствора (0) и разных доз ЛВ (3, 6 и 50 мг/кг) крысам КМ до формирования у них киндлинга.



**Рис. 13.** Латентность (ЛП) и общая длительность АС через 1 час после введения физраствора (0) и разных доз ЛВ (3, 6 и 50 мг/кг) крысам КМ со сформированным киндлингом.

Доза 6 мг/кг ЛВ достоверно снижала число припадков с тоническим компонентом, а после введения максимальной дозы 50 мг/кг ЛВ тонические судороги не развивались ни у одной крысы (Рис. 14). Такое дозо-зависимое торможение тонических судорог у крыс КМ сопровождалось увеличением

длительности начального бега (Таблица 12 и 13). До формирования киндлинга ЛВ в дозах 6 и 50 мг/кг менял длительность обеих фаз припадка через 1 час после введения ( $F=2.599$ ,  $p<0.001$ ), но через 2 дня какие-либо эффекты ЛВ отсутствовали (Таблица 12).



**Рис. 14.** Число АС с тоническим компонентом, вызванных коротким звуком у крыс КМ через 1 час после введения физраствора (0) или разных доз ЛВ у крыс КМ до (non-kindled) и после (kindled) формирования киндлинга. \*  $p<0.05$ , \*\* -  $p<0.005$ , \*\*\* -  $p<0.0005$ .

**Таблица 12.** Влияние леветирацетама на параметры аудигенных судорог (АС) у крыс КМ до формирования киндлинга

Доза	Латентность АС (с)			Длительность бега (с)			Длительность тонуса (с)		
	До	1 час	2 дня	До	1 час	2 дня	До	1 час	2 дня
0	4.4±0.6	5.1±0.7	4.3±0.6	3.9±0.3	4.1±0.3	4.3±0.3	16.0±0.9	16.0±0.8	15.8±0.4
3 мг/кг ЛВ	4.1±1.2	5.1±1.1	4.8±1.0	3.6±0.2	5.3±0.5	4.4±0.4	16.8±0.7	14.6±1.9	16.4±0.7
6 мг/кг ЛВ	4.1±0.7	6.0±1.1	4.8±0.8	3.9±0.3	6.9±0.6**	3.9±0.2	15.8±0.6	9.5±2.8*	16.5±0.5
50 мг/кг ЛВ	5.1±0.8	7.6±0.8*	5.9±1.3	4.3±0.3	5.8±1.0*	4.5±0.3	17.8±0.8	0***	18.1±0.5

$n=7$  для каждой экспериментальной группы

У крыс КМ со сформированным киндлингом ЛВ в максимальной дозе (50 мг/кг) тормозил вторично генерализованный клонус (ПТК) (Таблица 13).

**Таблица 13.** Влияние леветирацетама на длительность отдельных фаз и интенсивность аудиогенных судорог (АС) у крыс КМ после формирования киндлинга

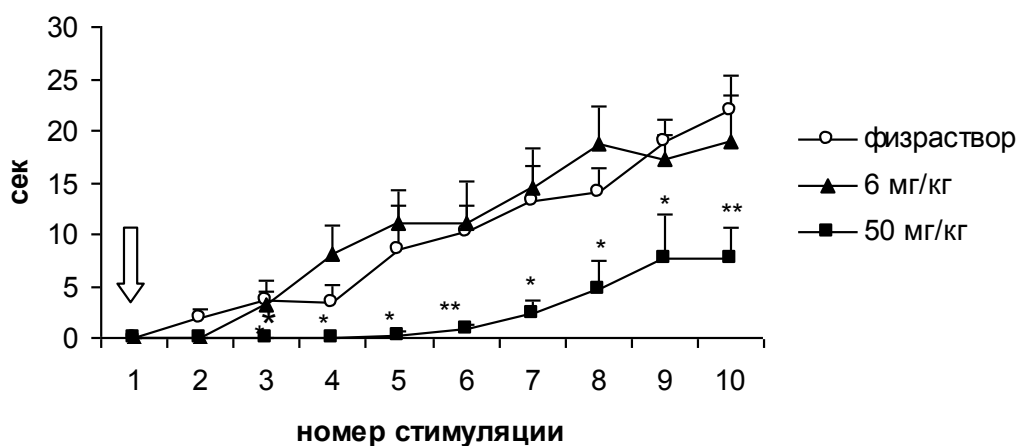
Доза	бег (с)	тонус (с)	ПТК (с)	стадия (Jobe)
0	4.6±0.4	15.7±0.4	22.1±2.3	9.0±0.0
3 мг/кг ЛВ	6.9±0.5**	12.1±1.8	16.5±2.8	7.1±0.9
6 мг/кг ЛВ	7.9±0.5***	10.3±2.7*	14.3±2.9	6.3±1.3
50 мг/кг ЛВ	6.1±0.4*	0***##	0***###	1.0±0.0*

\*-  $p<0.05$ ; \*\* -  $p<0.005$ . относительно физраствора; # -  $P<0.05$  относительно 6 мг/кг;  $n=9$  для каждой экспериментальной группы

### *Антиэпилептогенное влияние леветирацетама на формирование аудиогенного киндлинга у крыс КМ*

При развитии аудиогенного киндлинга у крыс КМ появлялся и прогрессивно удлинялся вторично генерализованный клонус, ПТК, при неизменной длительности локомоторной и тонической фаз АС. На рисунке 15 приведена динамика аудиогенного киндлинга (роста длительности ПТК при повторной звуковой стимуляции) у крыс КМ, получивших однократную инъекцию физраствора или ЛВ (6 и 50 мг/кг). Анализ показал достоверное влияние числа повторных судорог [ $F(9,162)=23.7$ ;  $p<0.001$ ] и дозы [ $F(1,18)=7.97$ ;  $p<0.003$ ], а также взаимодействие этих факторов [ $(18,162)=2.14$ ;  $p=0.007$ ]. Однократное введение ЛВ в дозе 50 мг/кг достоверно замедляло формирование киндлинга и уменьшало длительность ПТК в последнем 10-м тесте по сравнению с контрольной группой ( $p<0.05$ ). Доза 6 мг/кг не влияла на динамику киндлинга.

#### Длительность посттонического клонуса

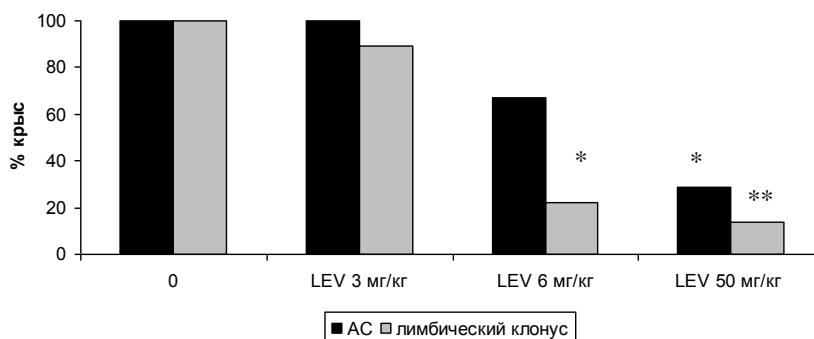


**Рис. 15.** Влияние однократного введения леветирацетама на формирование аудиогенного киндлинга у крыс КМ. Физиологический раствор или леветирацетам в дозе 6 или 50 мг/кг вводили перед началом киндлинга. Ордината – длительность посттонического клонуса (поведенческого маркера аудиогенного киндлинга). Данные выражены как среднее  $\pm$  S.E.M. для каждой группы (по 7 крыс в группе). \* и \*\* - достоверные различия между группами ( $p<0.05$  и  $p<0.005$ , соответственно).

### *Антииктогенное влияние леветирацетама на аудиогенные судороги у крыс Wistar*

Если у крыс КМ ЛВ не влиял на возникновение АС, а только менял выраженность отдельных фаз припадка (минимальная судорожная реакция в форме двигательного возбуждения возникала практически всегда), то у крыс Wistar эти же дозы препарата могли полностью блокировать судорожный ответ на звук. Самый сильный антиконвульсивный эффект леветирацетама наблюдали при его введении «нераскачаным» крысам Wistar с аудиогенной эпилепсией (n=9) перед инициацией у них первых АС: уже минимальная доза (3 мг/кг) резко увеличивала латентность этих приступов – до  $41.2 \pm 3.9$  сек ( $17.2 \pm 1.8$  сек у контрольных крыс) через час после введения, а более высокие дозы полностью блокировали судорожный ответ на звук.

У крыс Wistar со сформированным киндлингом леветирацетам дозозависимо снижал вероятность развития двигательного возбуждения (АС) и особенно вторично-генерализованных лимбических судорог в ответ на звуковое раздражение (Рис. 16).



**Рис. 16.** Леветирацетам дозозависимо снижает вероятность возникновения двигательного возбуждения (АС) и лимбического клонуса в ответ на звуковую стимуляцию крыс Wistar со сформированным киндлингом (\* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.005$ ).

Уже минимальная доза ЛВ (3 мг/кг) снижала интенсивность лимбического клонуса, не влияя на остальные параметры припадка (таблица 14). Доза 6 мг/кг удлиняла латентность АС, снижала интенсивность лимбических судорог и длительность обеих фаз припадка (бега и клонуса). Доза 50 мг/кг полностью блокировала АС у большинства крыс Wistar со сформированным киндлингом (5/7), только у двух особей звук вызвал небольшое двигательное возбуждение, закончившееся у одной крысы слабым



(стадия 2) и коротким (10 с) клонусом. При этом все контрольные крысы после введения физиологического раствора демонстрировали АС с лимбическим клонусом максимальной интенсивности (стадия 5).

**Таблица 14.** Влияние леветирацетама (ЛВ) на длительность отдельных фаз и интенсивность аудиогенных судорог (АС) у крыс Wistar со сформированным аудиогенным киндлингом

<b>Доза</b>	<b>ЛП (с)</b>	<b>бег (с)</b>	<b>клонус (с)</b>	<b>стадия (Racine)</b>
<b>0</b>	12.0±1.6	8.1±0.5	33.3±3.9	5.0±0.0
<b>3 мг/кг</b>	16.0±2.5	8.8±0.5	19.3±5.7	3.3±0.7*
<b>6 мг/кг ЛВ</b>	21.8±5.4*	4.3±1.2*	6.3±4.2*	1.1±0.7**

\* -  $p < 0.05$ ; \*\* -  $p < 0.005$ . относительно контрольной группы;  $n=7$  для каждой группы

## Обсуждение

### *Острые антииктогенные эффекты леветирацетама*

Проведенное исследование показало мощное антииктогенное действие леветирацетама на все компоненты аудиогенного приступа, вызванного короткой звуковой стимуляцией у крыс КМ и Wistar. Введение ЛВ в дозе 50 мг/кг за один час до инициации судорог значительно увеличивало латентность АС, полностью подавляло развитие тонического (стволового) и клонического (переднемозгового ПТК) компонентов припадка у крыс КМ, а у крыс Wistar блокировало развитие судорожной реакции на звук.

Наши эксперименты показали, что разные фазы АС обладают разной чувствительностью к быстрому антиконвульсивному действию ЛВ. У крыс КМ самый чувствительный к действию препарата компонент АС - тонические судороги. Уже минимальная доза ЛВ задерживала их развитие у раскачанных крыс, увеличивая длительность предшествующего двигательного возбуждения (его длительность при развернутых АС у крыс КМ определяется латентностью развития тонических судорог – см. гл.1). Дозы 6 и 50 мг/кг снижали интенсивность и длительность тонических судорог. На вторично генерализованный клонус (ПТК) достоверно влияла только максимальная доза ЛВ. Двигательное возбуждение у крыс КМ развивалось всегда, даже при блокировании остальных компонентов аудиогенного приступа. Более мощное антиконвульсивное действие ЛВ наблюдали у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией, у которых доза 6 мг/кг резко ослабляла развитие обоих компонентов АС (аудиогенного бега и лимбического клонуса), а доза 50 мг/кг

полностью блокировала судорожный ответ на звук. Лимбические судороги были самым чувствительным к действию ЛВ компонентом АС у крыс Wistar со сформированным киндлингом.

Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о высокой антииктогенной активности ЛВ. Уже в первом исследовании ЛВ было описано дозо-зависимое увеличение латентности АС и торможение тонических судорог у аудиогенных крыс Wistar при введении достаточно низких доз препарата (Gower et al., 1995). В этой работе уже доза 17 мг/кг полностью тормозила тонический компонент АС у 80 % животных, а бег исчезал только после введения 96 мг/кг ЛВ. Также отмечалось, что увеличение латентности АС и ослабление тонической фазы АС происходит после введения минимальной дозы 5.4 мг/кг. У крыс линии SER со смешанной генетической эпилепсией ЛВ в дозах 80 и 160 мг/кг тормозил тонические и абсансные судороги (Ji-qun et al., 2005). Выраженный антиконвульсивный эффект ЛВ был также описан у крыс КМ (Маликова и др., 2007). В этом исследовании дозы ЛВ 40 и 80 мг/кг резко увеличивали латентность и снижали интенсивность АС. Кроме того, в этом исследовании у многих животных наблюдали изменение паттерна начального двигательного возбуждения: после введения ЛВ оно становилось двухволновым за счет появления паузы в составе АС, что указывало на усиление тормозных процессов. В данной работе для инициации АС у крыс КМ использовали интенсивную звуковую стимуляцию, которая продолжалась до начала клонико-тонических судорог. В нашем исследовании, использовавшем для вызова АС короткий звук, который выступал только как триггер судорожной, наблюдали более выраженный антиконвульсивный эффект ЛВ у крыс КМ с полным торможением тонико-клонических судорог после введения дозы 50 мг/кг. Можно предположить, что леветирацетам активно влияет иррадиацию возбуждения из первичного фокуса АС в другие стволовые отделы (отвечающие за полное развитие приступа), что определяет разное действие препарата на самоподдерживающиеся аудиогенные приступы, инициированные коротким звуком (в нашем протоколе АС), и судороги, развивающиеся на фоне продолжающейся эпилептогенной стимуляции (в работе Маликовой и др., 2007). То, что ЛВ может активировать механизмы, ограничивающие генерализацию судорог (как в пределах ствола, так и в удаленные лимбические структуры переднего мозга), подтверждается и другими эффектами этого

препарата у крыс КМ - удлинением ЛП и начального двигательного возбуждения (из-за задержки развития клонико-тонических судорог), замедлением скорости киндлинга. Увеличение латентности АС после введения минимальной дозы 5.4 мг/кг ЛВ, описанное в работе Гауэрса с соавторами (Gowers et al., 1995), также указывает на ослабление epileptogenic действия звука и процессов инициации судорожной активности при действии леветирацетама.

Известно, что ЛВ не действует на классические молекулярные мишени антиэпилептических препаратов (калийные каналы, ГАМК и глутаматные рецепторы). Леветирацетам связывается с белком синаптических везикул SV2A (Lynch et al., 2004), который контролирует везикулярный эндо- и экзоцитоз, определяет подвижность и кластеризацию везикул в большинстве синапсов, таким образом, регулируя выброс медиаторов, особенно при высокой синаптической активности (Boido et al., 2010). Показана тесная корреляция между связыванием с SV2A и антиконвульсивным действием ЛВ (Gillard et al., 2003). Эффективность ЛВ значительно снижена у мышей с дефицитом SV2A (Kaminski et al., 2009). Высокая чувствительность стволовых и лимбических судорог, вызванных звуком, к действию ЛВ, обнаруженная в нашем исследовании, согласуется с данными о высоком уровне SV2A в лимбических и стволовых структурах, вовлеченных в экспрессию АС (Fuks et al., 2003).

### ***Длительный антиэпилептогенный эффект леветирацетама***

Проведенное нами исследование на модели аудиогенного киндлинга показало крайне высокую и длительную антиэпилептогенную активность ЛВ. Однократного введения этого препарата в дозе 50 мг/кг перед началом АК было достаточно для значительного замедления формирования киндлинга у крыс КМ. Торможение эпилептогенеза наблюдали в течение примерно трех недель после однократного введения ЛВ. При этом длительные эффекты ЛВ касались только вторично генерализованных судорог (ПТК), тогда как первичные стволовые компоненты повторных АС (двигательное возбуждение и тонические судороги) оставались неизменными в этот период. То есть ЛВ влиял только на пластические изменения эпилептических сетей, определяющие вторичную генерализацию судорог в передний мозг в ходе аудиогенного киндлинга.

Известно, что ЛВ быстро метаболизируется: время его полураспада составляет 2-3 часа у крыс и 6-8 часов у человека (Loscher et al., 1998b). Следовательно, долговременный эффект ЛВ, описанный нами у крыс КМ, связан не с остаточной аккумуляцией препарата, а с его истинными антиэпилептогенными свойствами и способностью замедлять патологическую пластичность нейронных сетей в эпилептическом мозге. Действительно, известно, что синапсин SV2A, с которым леветирацетам связывается в мозге, вовлечен в регуляцию синаптической пластичности (Vaido et al., 2010). Также ЛВ регулирует активность ряда генов, вовлеченных в синаптическую реорганизацию нейронных сетей при электрическом киндлинге (Gu et al., 2004).

Ранее сообщалось об антиэпилептогенных эффектах ЛВ, но только при его хроническом введении. На модели электрического киндлинга было показано, что ежедневные инъекции ЛВ (54 мг/кг) перед каждой стимуляцией миндалины подавляют развитие киндлинга не только в период хронического введения препарата, но и, по крайней мере, в течение трех недель после окончания его введения (Loscher et al., 1998b; Stratton et al., 2003). В пост-статусной пилокарпиновой модели эпилептогенеза частота спонтанных судорог оставалась сниженной в течение недели после завершения двухнедельного введения ЛВ (Gliem et al., 2002). Длительное подавление конвульсивных и неконвульсивных судорог после окончания хронического введения ЛВ также было обнаружено на генетических моделях эпилепсии. Исследования на крысах SER (spontaneously epileptic rats) показали необычную длительность тормозных эффектов ЛВ. Значительное ослабление тонических и абсансных судорог наблюдали у крыс линии SER в течение нескольких дней после завершения пятидневного курса введения ЛВ в дозе 80 мг/кг (Ji-qun et al., 2005) и в течение пяти недель после окончания более продолжительного трехнедельного введения ЛВ в ранний постнатальный период (Yan et al., 2005). Такие эффекты не наблюдались при введении других антиэпилептических препаратов. Значительное снижение неконвульсивной эпилептической активности в течение 4 дней после пятидневного введения ЛВ (54 мг/кг) описано у крыс линии GAERS с генетической абсансной эпилепсией (Dedeurwaerdere et al., 2005). У обезьян с фоточувствительной эпилепсией одна доза ЛВ подавляла судорожные разряды на 48 часов (Kasteleijn-Nolst Trenite et al., 1996). Наше исследование на

модели АК у крыс КМ показало, что даже однократного введения ЛВ (50 мг/кг) достаточно для длительного антиэпилептогенного эффекта.

Клинические исследования также указывают на существование крайне длительных эффектов ЛВ у человека. Антиэпилептическое действие наблюдали через день после введения ЛВ, хотя время полураспада препарата в плазме человека составляет около 7 часов (Freidman, French, 2006).

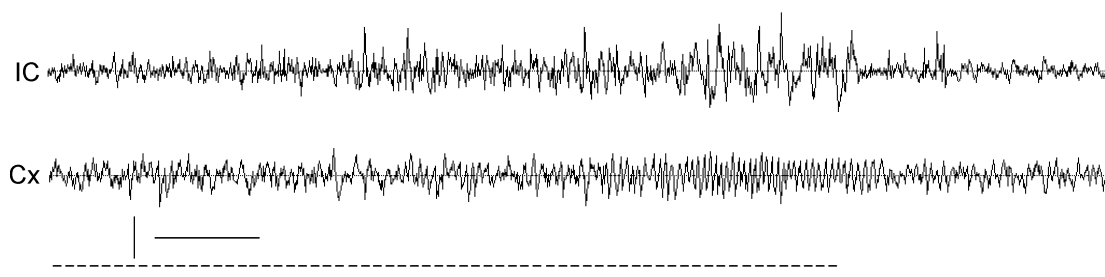
Таким образом, проведенное исследование показало, что даже однократное введение ЛВ в дозе 50 мг/кг задерживает развитие аудиогенного киндинга, что указывает на мощное и очень длительное антиэпилептогенное действие леветирацетама. Полученные данные могут быть использованы для формирования наиболее продуктивной стратегии фармакологической терапии у пациентов с эпилепсией, особенно в свете сообщений о быстром развитии резистентности к антиконвульсивному действию ЛВ при его длительном применении у некоторых пациентов и экспериментальных животных (French, 2006; van Vliet et al., 2006). Примечательно, что есть клинические данные о том, что редкое (раз в неделю) введение ЛВ более эффективно при лечении рефрактерной эпилепсии, чем ежедневный прием препарата (Friedman, French, 2006).

### 3.3 Электрографический анализ аудиогенного kindлинга у крыс Wistar и WAG/Rij.

Электрографические методы позволяющие оценить изменения активности больших нейронных популяций с высоким временным разрешением, остаются первоочередным инструментом при исследовании эпилепсии. Электрографические характеристики аудиогенных судорог изучены значительно слабее, чем их поведенческие проявления. Мы исследовали изменения электрической активности нижнего двухолмия (области первичного эпилептического возбуждения при аудиогенной эпилепсии) и коры больших полушарий (области вторичной генерализации судорожных разрядов) во время минимальных аудиогенных судорог (двигательного возбуждения).

#### 3.3.1. Электрическая активность коры и нижнего двухолмия при минимальных аудиогенных судорогах и их повторном вызове у крыс Wistar

Во время первых эпизодов двигательного возбуждения у крыс Wistar (n=11) в нижнем двухолмии (НД) регистрировали эпилептиформную активность (высокоамплитудные спайки и острые волны), а в париетальной коре – гиперсинхронную активность (Рис. 17).

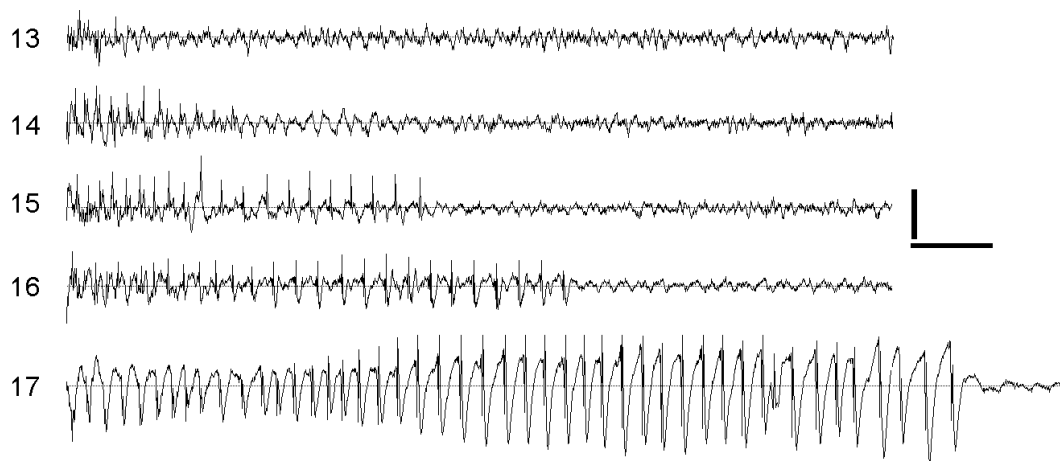


**Рис. 17.** Электрическая активность нижнего двухолмия (IC) и париетальной коры (Cx) во время двигательного возбуждения. Пунктирной линией внизу обозначено время звуковой стимуляции, сплошной – двигательная реакция на звук. Калибровка - 200 мкВ, 2 сек.

Высокоамплитудные негативные спайки и острые волны развивались в НД даже при abortивной двигательной реакции (небольшом перемещении по камере). В коре во время первых эпизодов двигательного возбуждения никогда не регистрировали эпилептиформную активность, но в париетальных областях наблюдали резкую гиперсинхронизацию в диапазоне 8-9 Гц. Частота колебаний в этой области коры во время аудиогенного бега увеличивалась составляла

8.8±0.2 Гц, что значимо отличалось от изменений, наблюдаемых в париетальной коре во время быстрой локомоции (7.3±0.2 Гц) ( $p < 0.005$ ). При повторном вызове эпизодов аудиогенного бега и формировании киндлинга в коре появлялась эпилептиформная активность, которая представляла собой пиково-волновой послеразряд (afterdischarge, AD) частотой 2-3 Гц, который развивался сразу после окончания двигательного возбуждения (Рис. 18).

Такой послеразряд сопровождался клоническими судорогами типичного лимбического паттерна (клонус головы и передних лап), причем каждому спайку соответствовало миоклоническое подергивание. У киндлинг-чувствительных крыс корковый АД развивался после 12.4±1.2 повторных эпизодов аудиогенного бега ( $n=8$ ), а у киндлинг-резистентных крыс (с парциальным киндлингом) – после 27.0±3.9 эпизодов ( $n=5$ ). В повторных тестах амплитуда коркового разряда увеличивалась с 0.24±0.01 до 1.27±0.11 мВ, а его длительность - с 9.6±1.4 до 31.4±4.2 сек. Усиление электрографической эпилептиформной активности в коре сопровождалось интенсификацией поведенческих судорог лимбического типа.



**Рис. 18.** Развитие эпилептиформной активности в коре после повторных минимальных АС у киндлинг-чувствительных крыс Wistar. Записи получены у одной крысы после пяти последовательных (с 13-го по 17-й) эпизодов аудиогенного бега. Начало записи совпадает с окончанием бега (цифры слева обозначают номер эпизода). Калибровка: 0.5 мВ, 2 сек.

## Обсуждение

Анализ электрической активности коры и НД при звуковой стимуляции крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией показал, что во время самого раннего

эпизода двигательного возбуждения в НД развивается эпилептиформная активность. В новой коре эпилептические разряды возникают только при повторном вызове аудиогенного бега и формировании киндлинга.

Эти данные об активации НД во время аудиогенных судорог согласуются с известными представлениями о стволовой локализации эпилептического возбуждения, вызванного звуковой стимуляцией грызунов с аудиогенной эпилепсией. Электрофизиологические исследования, начатые еще в 1950-х годах в лаборатории Крушинского, показали, что во время однократных АС эпилептиформные разряды регистрируются в слуховых и вестибулярных ядрах ствола, но отсутствуют в коре (Васильева, 1957; Крушинский, 1960). Отсутствие в коре эпилептических разрядов во время АС также было показано на 8 линиях мышей с аудиогенной эпилепсией (Махон, Cowen, 1976) и крысах Wistar-AS (Kiesmann et al., 1988; Marescaux et al., 1987). Эпилептиформная активация стволовых отделов мозга была продемонстрирована во время развернутых аудиогенных приступов, вызванных однократной звуковой стимуляцией крыс GEPR-9 (Ludvig, Moshe, 1989). У крыс с высокой судорожной чувствительностью (NER, GEPR-9) корковые высокоамплитудные спайки иногда регистрируют уже во время первых интенсивных АС (Iida et al., 1998; Moraes et al., 2005), однако эти спайки раньше возникают в стволовых отделах (НД или РФ), чем в коре (Moraes et al., 2005).

Несмотря на эти многочисленные доказательства стволового генеза локомоторной фазы АС, природа самой раннего компонента этой фазы - первого эпизода двухволнового двигательного возбуждения - до сих пор оставалась неясной. Как упоминалось в главе 1, у крыс с низкой чувствительностью к АС, таких как крысы Wistar с аудиогенной эпилепсией, начальное двигательное возбуждение растянуто во времени и развивается в виде двух эпизодов, разделенных паузой. Первая фаза этого возбуждения представляет собой слабый бег, самостоятельно обрывающийся через несколько секунд после своего начала. Некоторые исследователи рассматривают эту фазу АС как своеобразный фальстарт или преконвульсивную стартл-реакцию на звуковое раздражение (Ross, Colemann, 2000). Наши эксперименты впервые показали, что во время этой самой ранней фазы аудиогенного приступа, причем даже в случае слабо выраженной моторной реакции на звук, в стволе



развивается эпилептиформная активность. То есть самый первый эпизод двухволнового двигательного возбуждения отражает эпилептическую активацию ствола.

Как показало наше электрографическое исследование, в первых тестах во время таких стволовых судорог в коре больших полушарий эпилептиформная активность отсутствовала. Однако в париетальной области коры во время аудиогенного бега регистрировали гиперсинхронные экзальтированные колебания в тета диапазоне (8-9 Гц). Развитие синхронизованного ритма в тета-диапазоне в корковых областях слухового и двигательного анализаторов также было описано во время интенсивного двигательного возбуждения у крыс КМ (Семиохина, Цурита, 1974). Сообщалось об усилении тета- и альфа-колебаний во время клонической фазы АС у крыс КМ (Оганесян, Ватаев, 1995). Экзальтация ритмической активности в тета-диапазоне (7-15 Гц) описана перед началом судорог, вызванных фармакологической стимуляцией - системным введением каината (Medvedev et al., 2000) и внутрисептальной инъекцией пикротоксина (Кичигина и др., 2005). Начало клинических судорог у пациентов часто связано с внезапным изменением частоты ЭЭГ и развитием синусоидальных волн в дельта- и тета-диапазонах (Blume et al., 1984).

Известно, что у крыс синхронизованная активность в тета диапазоне является неспецифическим компонентом реакции активации (arousal) и развивается при сенсорной стимуляции и двигательной активности (Виноградова, 1975). Причем частота и мощность такой тета синхронизации растет с усилением афферентного притока, увеличением амплитуды и скорости движений (Whishow, Vanderwolf, 1973). Известно, что активность септо-гиппокампальной системы, основного генератора колебаний в тета-диапазоне, модулируется стволовой ретикулярной формацией. Прямая электрическая стимуляция большинства стволовых структур, особенно nucleus pontis oralis, вызывает экзальтацию тета-активности в гиппокампе, что на поведенческом уровне сопровождается замиранием, бегом или ходьбой (Kramis et al., 1975; Robinson, Vanderwolf, 1978). Гиппокампальная тета-синхронизация наблюдается при стимуляции ствола и у парализованных животных (Routenberg, Kramis 1968). Частота синхронизованной активности в тета диапазоне увеличивается при усилении стволовой стимуляции. При изучении животного гипноза была

показана тесная корреляция между выраженностью тета ритма на ЭЭГ и активностью нейронов ретикулярной формации ствола (Klemm, 1976). Таким образом, экзальтация тета-колебаний может отражать активацию стволовой ретикулярной формации, которая, как известно, регулирует как активность структур переднего мозга, так и мышечный тонус. Можно предположить, что описанная нами экзальтированная активность париетальной коры в диапазоне 8-9 Гц во время минимальных ствольных судорог, вызванных звуком, отражает активацию гиппокампа, связанную с гипервозбуждением стволовой ретикулярной формации при аудиогенных судорогах (Faingold, Randall, 1995, Faingold, 2004).

Электрографический анализ реакций коры на повторные минимальные АС показал, что развитие и интенсификация лимбических клонических судорог в процессе аудиогенного киндлинга всегда связаны с появлением и прогрессивным нарастанием низкочастотной эпилептиформной активности в коре больших полушарий. Эта эпилептическая активность была единственным проявлением патологического повышения возбудимости коры в ходе аудиогенного киндлинга на стандартной записи ЭЭГ с фильтрацией сверхмедленной активности ниже 1 Гц. Однако когда была проведена регистрация ЭЭГ в полном диапазоне частот, включая сверхмедленные сдвиги потенциала, оказалось, что задолго до эпилептической активации новой коры после повторных аудиогенных судорог начинала возникать волна распространяющейся депрессии (РД).

### ***3.3.2. Волна распространяющейся депрессии – регулярная реакция коры на повторные аудиогенные судороги у крыс Wistar***

Распространяющаяся депрессия (РД) является стереотипным ответом нервной ткани на различные патологические воздействия. РД представляет собой временную локальную деполяризацию нервных и глиальных клеток, которая распространяется по серому веществу в виде авторегенеративной волны со скоростью около 3 мм/мин (Leao, 1944; Bures et al., 1974; Lauritzen, 1987; Hablitz and Heinemann, 1989; Somjen, 2001; Королева и др., 1993). Самым надежным показателем развития РД в структурах головного мозга является высокоамплитудный негативный сдвиг внеклеточного потенциала. Однако такие сверхмедленные колебания потенциала, как правило, фильтруются при

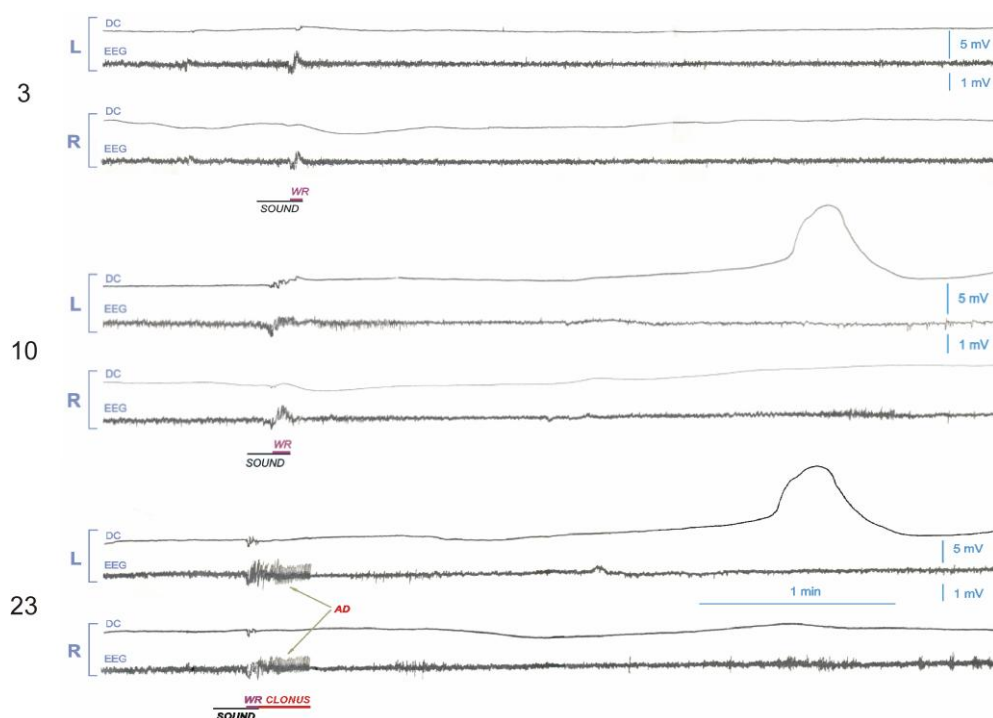
стандартной записи ЭЭГ, и возникновение волны РД в ряде ситуаций остается незамеченным. Так как известно, что РД оказывает мощное влияние на нейронную активность, ЭЭГ, локальный мозговой кровоток и другие аспекты функционирования структур головного мозга, понятна необходимость контроля возможного участия волны РД в процессах, развивающихся в ЦНС в условиях патологии. Раньше считалось, что РД возникает только при сильном повреждающем воздействии на нервную ткань и редко развивается в мозге человека. Однако исследования последних лет показали, что РД достаточно часто и легко возникает в коре больших полушарий у пациентов с разной формой нейропатологии (Dreier et al., 2006; Fabricius et al., 2008; Dreier, 2011).

Будучи одним из проявлений нейронной гипервозбудимости, волна РД достаточно часто возникает при судорожном возбуждении у экспериментальных животных (Leao, 1944; Bures et al., 1974; Somjen 2001). Известно, что конвульсивные судороги, вызванные электрической или химической стимуляцией мозга, могут приводить к возникновению РД (Leao, 1944; Koroleva and Bures, 1983; Mody et al., 1987; Hablitz and Heinemann, 1989; Somjen et al., 1992; Koroleva et al., 1993). На фармакологической модели эпилепсии была показана способность сенсорной стимуляции (вспышки света или звука) вызывать в коре больших полушарий волну РД (van Harreveld, Stamm, 1955). Возможность возникновения РД при аудиогенных судорогах никогда ранее не изучалась. В наших экспериментах был проведен анализ сверхмедленной активности коры во время повторных минимальных аудиогенных судорог с целью проверки вовлечения феномена РД в процессы, происходящие в коре во время аудиогенного киндлинга.

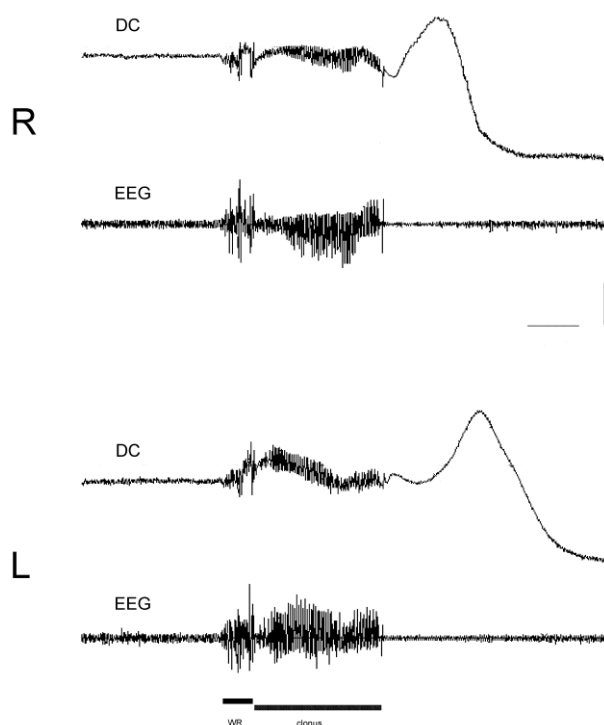
## **Результаты**

На рисунке 19 приведены записи ЭЭГ в диапазоне 1-45 Гц (нижние фрагменты) и сверхмедленных сдвигов потенциала (верхние фрагменты) в коре левого и правого полушарий во время и после 3-го, 10-го и 23-го эпизодов аудиогенного бега у одной и той же крысы. Короткое двигательное возбуждение в первых тестах не вызывало в новой коре ни эпилептической активности, ни РД (опыт 3 на рис. 19). Начиная с 9.4±1.2 теста (5-15), после аудиогенного бега в коре одного из полушарий появлялся характерный высокоамплитудный негативный сдвиг потенциала (7.0±1.3 мВ, 18.6±0.7 сек на половине

амплитуды), сопровождавшийся временной депрессией ЭЭГ и являвшийся надежным электрографическим показателем развития корковой волны РД (опыты 10 и 23 на рис. 19). Волна РД продолжала регулярно возникать в коре в повторных тестах, в том числе после развития корковой эпилептиформной активности (AD). Только на поздних стадиях киндлинга волна РД становилась билатеральной (Рис. 20).

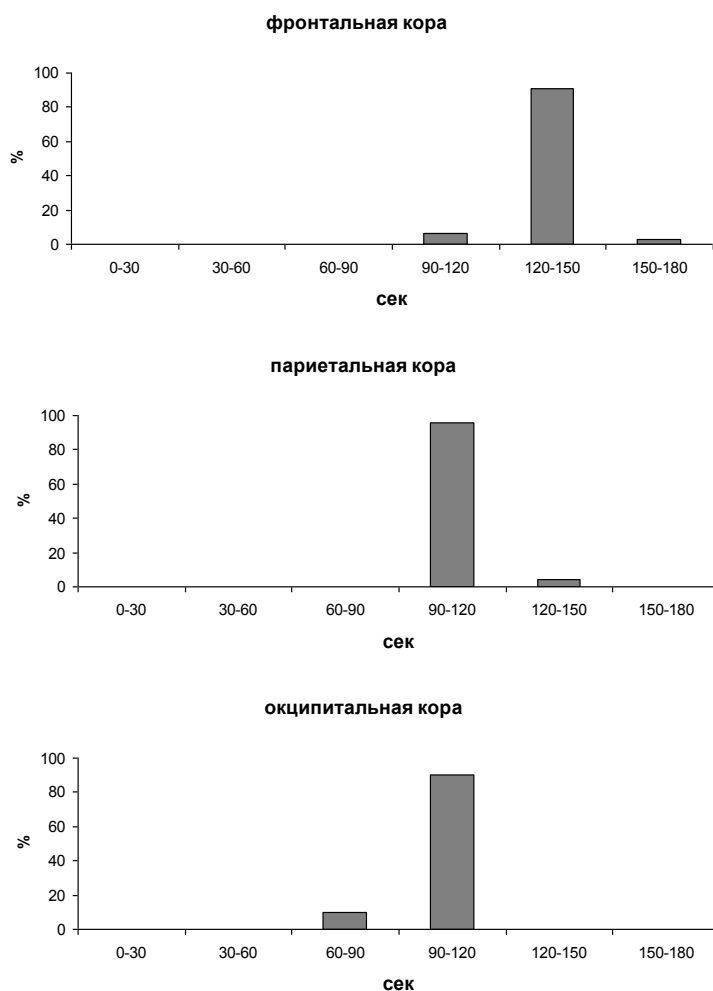


**Рис 19.** Возникновение корковой волны РД после повторных эпизодов аудиогенного бега у крыс Wistar. Репрезентативные электрографические записи активности фронтальной коры левого (L) и правого (R) полушарий у одной и той же крысы Wistar в 3м, 10м и 23м тестах. Вверху - записи медленных сдвигов потенциала, внизу - ЭЭГ. Горизонтальными линиями отмечены периоды стимуляции (SOUND), бега (WR) и лимбического клонуса (CLONUS).



**Рис. 20.** Билатеральное возникновение корковой волны РД после интенсивных лимбических судорог (стадия 4) на поздних стадиях киндлинга у крыс Wistar. Одновременная запись ЭЭГ (EEG) и сверхмедленных сдвигов потенциала (DC) в коре левого (L) и правого (R) полушарий. Калибровка - 10 сек, 1 мВ (EEG) и 2 мВ (DC). Внизу отмечены периоды аудиогенного бега (WR) и лимбического клонуса (clonus).

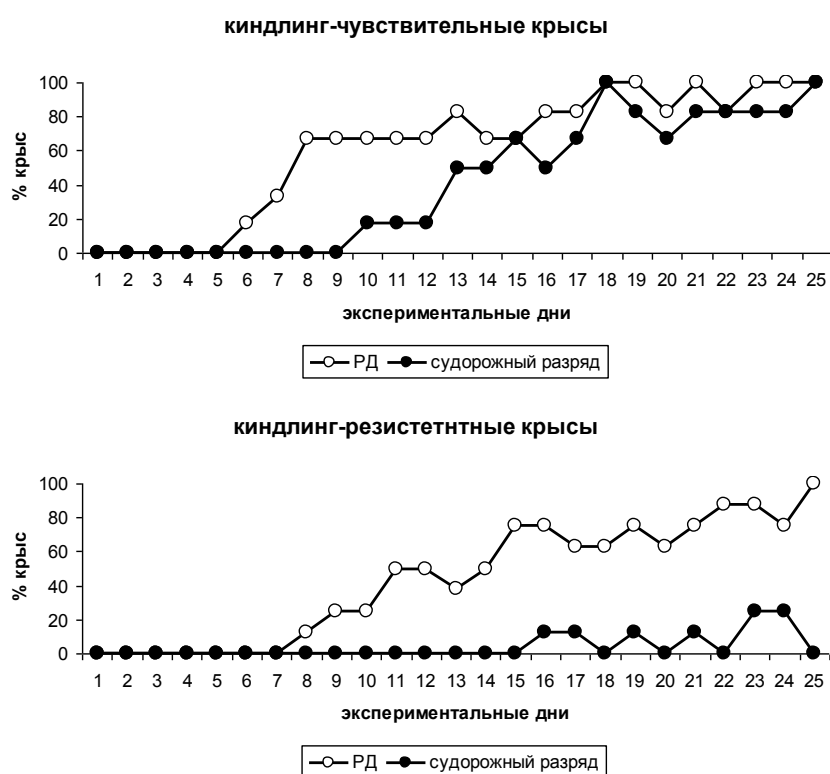
Односторонняя волна РД появлялась в новой коре с большой временной задержкой - через 1.5-2 мин после окончания ствольных судорог (аудиогенного бега). Такая большая латентность предполагает локальное возникновение РД в ограниченной области коры одного полушария и медленное, несинаптическое распространение в остальные корковые области полушария. На рисунке 21 приведено распределение латентностей односторонних волн РД, то есть интервалов времени между окончанием бега и появлением волны во фронтальной, париетальной и затылочной областях коры. Средняя латентность волн РД во фронтальной коре составила  $142.4 \pm 1.5$  сек, что было достоверно больше ( $p < 0.005$ ), чем ЛП волн РД в париетальной и затылочной коре ( $103.3 \pm 2.2$  сек и  $101.5 \pm 1.7$  сек, соответственно).



**Рис. 21.** Латентности появления волн РД во фронтальной, париетальной и затылочной областях коры после окончания аудиогенного бега. Абсцисса – время (сек) между окончанием аудиогенного бега и появлением волны РД в данной области коры. Ордината – доля волн РД с данной латентностью.

При развитии киндлинга и появлении в коре интенсивных эпилептических разрядов волна РД становилась билатеральной и ее латентность сокращалась почти вдвое. Латентные периоды билатеральных волн РД составляли  $83.3 \pm 3.3$  сек во фронтальной коре,  $52.5 \pm 9.3$  сек в париетальной коре и  $31.0 \pm 6.4$  сек в затылочной коре, что достоверно отличалось от соответствующих латентностей односторонних волн РД ( $p < 0.05$ ).

Корковая волна РД была зарегистрирована у всех крыс со стабильными аудиогенными судорогами – как у киндлинг-чувствительных крыс, так и у киндлинг-резистентных крыс, хотя у первых РД начинала возникать после повторных судорог раньше, чем у последних - с  $8.0 \pm 0.8$  ( $n=18$ ) и  $12.3 \pm 1.0$  ( $n=18$ ) тестов, соответственно ( $p=0.0024$ , Mann-Whitney тест). На рисунке 22 приведена частота возникновения РД и судорожных разрядов (AD) в коре киндлинг-чувствительных и киндлинг-резистентных крыс после повторных эпизодов аудиогенного бега.

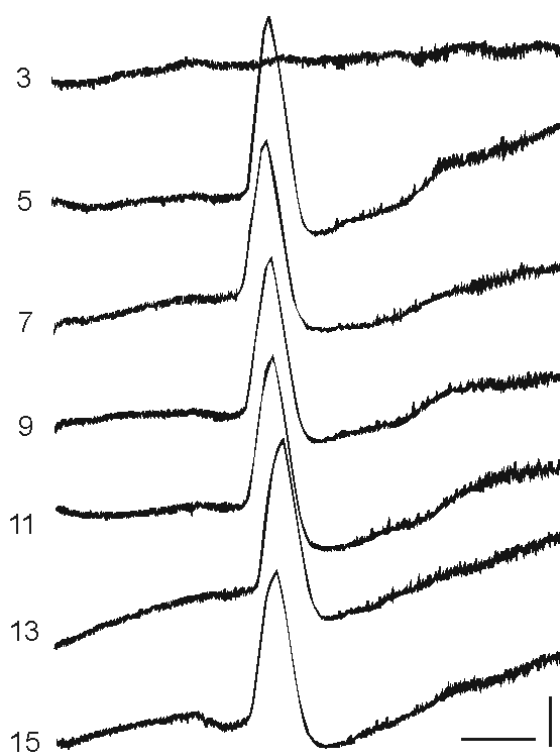


**Рис. 22.** Возникновение волны РД и судорожного разряда в коре больших полушарий крыс киндлинг-чувствительных и киндлинг-резистентных крыс Wistar при повторных аудиогенных судорогах

Видно, что у киндлинг-чувствительных особей в ходе формирования аудиогенного киндлинга волна РД появляется в коре раньше, чем

эпилептический разряд. У киндлинг-резистентных крыс волна РД являлась основным ответом коры на повторные стволовые аудиогенные судороги, регулярно возникающим в отсутствие корковой судорожной активности.

В повторных тестах (на ранних стадиях киндлинга у киндлинг-чувствительных и в течение всего периода регистрации у киндлинг-резистентных крыс) основные характеристики односторонних волн РД (амплитуда, длительность и латентность) оставались удивительно стабильными. На рисунке 23 показаны волны РД, зарегистрированные в париетальной коре после повторных эпизодов аудиогенного бега у одной и той же киндлинг-резистентной крысы. Начиная с пятого опыта, в коре регулярно возникала РД с примерно одинаковыми амплитудно-временными характеристиками. При звуковой стимуляции неаудиогенных крыс Wistar в коре никогда не регистрировали волн РД.



**Рис. 23.** Стабильный паттерн корковых волн РД, возникающих при повторных аудиогенных судорогах у крыс Wistar. Записи получены у одной крысы после 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15-го эпизодов аудиогенного бега. Каждый отрезок представляет собой запись электрической активности париетальной коры левого полушария. Начало каждого отрезка записи совпадает с окончанием левостороннего бега. Число в начале каждого отрезка указывает номер теста. Калибровка: 30 сек и 10 мВ.

Таким образом, волна РД была самым ранним и самым частым электрографическим событием в коре при повторных стволовых судорогах, вызванных звуком у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией. Судорожная активность развивалась в коре значительно позже, реже или не развивалась вообще.

## Обсуждение

Наши опыты показали, что при повторной инициации стволовых аудиогенных судорог в коре легко возникает волна РД, которая является самым ранним и регулярным корковым событием, предшествующим эпилептической активации коры в ходе киндлинга. То есть короткий (3-10 сек) эпизод стволовых судорог (аудиогенного бега) является мощным триггером волны РД в коре бодрствующих крыс Wistar с акустической гиперчувствительностью. Важно, что в нашей модели для вызова РД достаточно естественной сенсорной стимуляции без каких-либо дополнительных фармакологических воздействий, повышающих возбудимость ЦНС.

Распространяющаяся депрессия представляет собой волну локальной деполяризации, которая медленно несинаптическим способом распространяется по серому веществу и сопровождается высокоамплитудным сдвигом внеклеточного потенциала и депрессией ЭЭГ (Leao, 1944; Bures et al., 1974). Известно, что патологическое гипервозбуждение коры во время интенсивной судорожной активности может вызывать РД у экспериментальных животных (Leao, 1944; van Harreveld, Stamm, 1955; Bures et al., 1974; Koroleva et al., 1993; Somjen, 2001) и человека (Fabricius et al., 2008). Считается, что нарушение ионного гомеостаза и сильная деполяризация нервной ткани во время интенсивной эпилептической активации ведет к запуску авторегенеративного процесса РД (Leao, 1944; van Harreveld, Stamm, 1955; Bures et al., 1974; Mody et al., 1987; Hablitz and Heinemann, 1989; Somjen et al., 1992; Koroleva et al., 1993).

Однако было показано, что РД может возникать и после кратковременных слабых судорог, и даже после одного эпилептического спайка (Koroleva, Bures, 1983; Koroleva et al., 1993; Kohling et al., 2003), хотя механизмы такого возникновения РД остаются неизвестными. Так, сенсорная стимуляция (вспышка света или звук) может вызывать РД в гипервозбудимой коре кроликов после введения им субковульсивной дозы PTZ (van Harreveld, Stamm, 1955). РД возникает спонтанно в отсутствие судорожной активности при минимальном растормаживании срезов коры крыс, вызванном аппликацией в субсудорожных доз бикикулина (Kohling et al., 2003).

Наши эксперименты на модели рефлекторной эпилепсии показали, что РД может возникать в коре при минимальных стволовых аудиогенных



судорогах в результате восходящей синаптической активации коры у бодрствующих свободно подвижных крыс в отсутствии каких-либо фармакологических воздействий. То, что РД никогда не возникает в коре неэпилептических крыс при идентичной звуковой стимуляции, показывает, что нормальная физиологическая активация звуком недостаточна для инициации корковой РД. Обязательным условием возникновения РД в наших опытах был *повторный* вызов *стволовых судорог* (по крайней мере, пяти повторных АС) - то есть гипервозбуждение стволовых сетей (во время АС) и повышение возбудимости коры (при повторном вызове АС и киндлинге).

Место и механизмы возникновения корковой РД при минимальных аудиогенных судорогах неясны. Длительная задержка (около 1.5-2 мин) между окончанием этих судорог и появлением волны РД во фронтальной, париетальной и затылочной областях коры предполагает, что РД возникает в отдаленной, достаточно ограниченной области коры и несинаптически (с типичной для РД скоростью 3 мм/мин) распространяется в другие корковые области. Одинаковая латентность волн РД, записанных у разных крыс и в разных тестах, предполагает достаточно стабильную локализацию области локального возникновения односторонней РД при аудиогенных судорогах. Нейроны этой области должны легко деполяризоваться в ответ на возбуждение, приходящее из стволовых отделов мозга. Наши данные пока не позволяют определить местонахождение этой области, но результаты иммуногистохимического картирования (по c-fos) повторных аудиогенных судорог у крыс Wistar показывают, что РД, скорее всего, возникает в латеральных областях коры больших полушарий (Hirsch et al., 1997; Simler et al. 1999). Эти исследования показали, что при аудиогенном киндлинге среди структур переднего мозга раньше всего активируются миндалина и периринальная кора - уже после 5-10 повторных АС, а активация фронто-париетальной коры происходит позже - после 18 повторных судорог (Hirsch et al., 1997; Simler et al. 1999). Так как в наших экспериментах РД и эпилептические разряды появлялись в коре после 5-10 и 15-20 повторных аудиогенных судорог, соответственно, можно предположить, что возникновение РД связано с ранней активацией миндалины и периринальной коры. Последующее вовлечение фронто-париетальных областей новой коры в эпилептическую сеть АС видимо

определяет развитие здесь эпилептического разряда (AD) и моторных судорог лимбического типа (Kelly et al., 1999). Таким образом, во вторичной генерализации судорог из ствола в передний мозг при аудиогенном киндлинге участвуют специфические пути, связывающие слуховые структуры подкорки с периринальной корой и миндалиной (LeDoux et al., 1985; Kolb, Tees, 1990; Kimura et al., 2003). Для возникновения РД при повторных аудиогенных судорогах активация этих путей во время АС должна быть достаточной сильной для деполяризации нервной ткани до уровня, превышающего порог запуска и авторегенеративного распространения волны РД. Важно отметить, что волны РД, вызванные в миндалине и палеокортикальных областях коры, легко распространяются в неокортекс, так как в лизэнцефалическом мозге крыс эти структуры связаны почти непрерывным серым веществом, поддерживающим несинаптическое распространение РД (Fifkova, Syka, 1964; Bures et al., 1974). Данные о времени несинаптического распространения волны РД между миндалиной и дорсальной корой (Fifkova, Syka, 1964) подтверждают предположение о ее возникновении в латеральных областях коры больших полушарий.

Полученные нами данные о регулярном одностороннем возникновении корковой РД в ответ на сенсорную стимуляцию, специфически активирующую стволовые сети, могут быть важны для понимания патофизиологических механизмов мигрени, в том числе постиктальной мигрени. Согласно современным представлениям, РД активно вовлечена в патогенез мигрени – заболевания, связанного с повторными приступами сильной, обычно односторонней головной боли, которым иногда предшествует зрительная аура. Считается, что корковая РД лежит в основе мигренозной ауры и является возможным инициатором последующей головной боли (Leao, Morrison, 1945; Lauritzen, 1987, Moskowitz et al., 1993). Данные нейровизуализации продемонстрировали РД-подобный процесс в коре пациентов во время приступа мигрени (Woods et al., 1994; Hadjikhani et al. 2001). Однако до сих пор остаются неясными механизмы возникновения РД в интактной коре пациентов с мигренью. Клинические данные свидетельствуют о способности сенсорных стимулов инициировать приступ мигрени (Main et al., 1997) и о повышенной

реактивности пациентов с мигренью на сенсорную стимуляцию, особенно повторную (Coppola et al., 2007).

Полученные в наших экспериментах данные могут способствовать пониманию механизмов возникновения РД у пациентов с мигренью и связи между активацией ствола, наблюдающейся у них во время приступа мигрени, и возникновением корковой РД (ауры). Наши данные о способности короткого эпизода стволового возбуждения (минимальных аудиогенных судорог) инициировать в коре одностороннюю волну РД предполагают, что причиной возникновения РД в начале приступа мигрени может быть гиперактивация стволовых отделов мозга, что согласуется с концепцией стволового триггера мигрени (Goadsby, 2007). Результаты наших исследований также показывают, что для возникновения корковой РД в ответ на сенсорный стимул нужно совместное действие двух факторов – исходной гиперчувствительности к сенсорной стимуляции и повышенной возбудимости коры, что соответствует клиническим данным о многофакторной природе мигрени. Наследственность, гипервозбудимость коры и повышенная реактивность на внешние стимулы – хорошо известные предпосылки развития мигрени у человека (Welch et al., 1990; Lambert, Zagami, 2009; Goadsby, 2007).

### ***3.3.3 Электрическая активность коры при повторном вызове минимальных аудиогенных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами (абсансной и аудиогенной) эпилепсии***

Крысы WAG/Rij, выведенные на основе линии Wistar, являются известной генетической моделью неконвульсивной абсансной эпилепсии (van Luijtelaar, Coenen, 1989; Coenen, van Luijtelaar, 2003). Крысы этой линии демонстрируют спонтанные генерализованные пик-волновые разряды (spike-wave discharges, SWD) на ЭЭГ. Описана субпопуляция крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии – абсансной и аудиогенной (Кузнецова, 1998), которые являются интересной моделью для исследования взаимодействия нейронных сетей разных типов судорожной активности. Крысы WAG/Rij с двумя формами эпилепсии демонстрируют спонтанные неконвульсивные абсансные судороги (SWD) и аудиогенные конвульсивные судороги в ответ на звуковую

стимуляцию. Неконвульсивные абсансные судороги генерируются таламокортикальными сетями (Gloor, Fariello, 1988; van Luijtelaa, Coenen, 1989; Coenen, van Luijtelaa, 2003), причем критическую роль в инициации этих судорог играет гипервозбудимость коры, прежде всего, ее соматосенсорных областей (Gloor, Fariello, 1988; Meeren et al., 2002; Luhmann et al., 1995; Strauss et al., 2004).

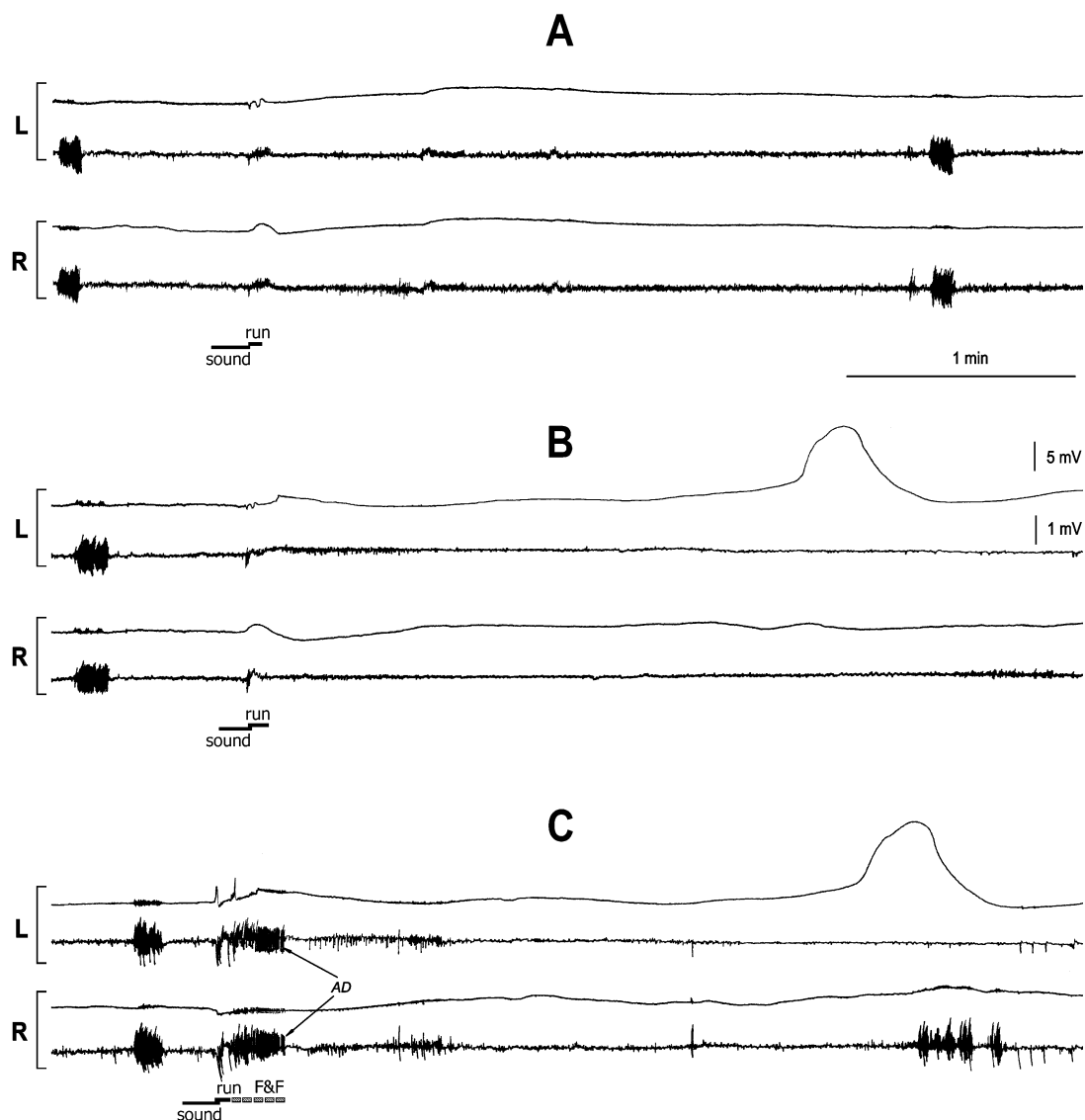
Идентичность поведенческих паттернов аудиогенных судорог у крыс Wistar и WAG/Rij (Кузнецова, 1998; Vinogradova, 2008) предполагает независимое функционирование таламокортикальных сетей, генерирующих SWD, и стволовых сетей, управляющих АС. С другой стороны, крысы с генетической эпилепсией абсансного типа (WAG/Rij и GAERS) демонстрируют устойчивость к вторичной генерализации лимбических судорог при электрическом киндлинге миндаины (Eskazan et al., 2002), что указывает на существование антагонистических взаимоотношений между таламокортикальными и лимбическими судорожными сетями.

Как было показано ранее, повторная инициация АС у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией может вызывать развитие эпилептических разрядов и волны РД в коре больших полушарий (глава 3.2). В данной серии экспериментов были исследованы электрографические ответы коры на повторные АС у крыс WAG/Rij, демонстрирующих два типа генерализованной судорожной активности – абсансные и аудиогенные судороги.

## **Результаты**

### ***Электрографические реакции коры на повторные аудиогенные судороги у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии***

Фоновая регистрация ЭЭГ у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии показала, что абсансные судорожные разряды (SWD) возникают у них с частотой  $2.2 \pm 1.9/2$  мин, а длительность этих разрядов варьирует от 1.3 до 9.4 сек в минуту. В первых опытах минимальные аудиогенные судороги (эпизод бега) не вызывали в коре ни РД, ни эпилептиформной активности (AD) (Рис. 24А). Как и у крыс Wistar, первым проявлением нарастающей в ходе киндлинга возбудимости коры крыс WAG/Rij была односторонняя длиннотентная волна РД. Начиная с  $10.7 \pm 1.3$  (5-16) стимуляции, высокоамплитудный негативный

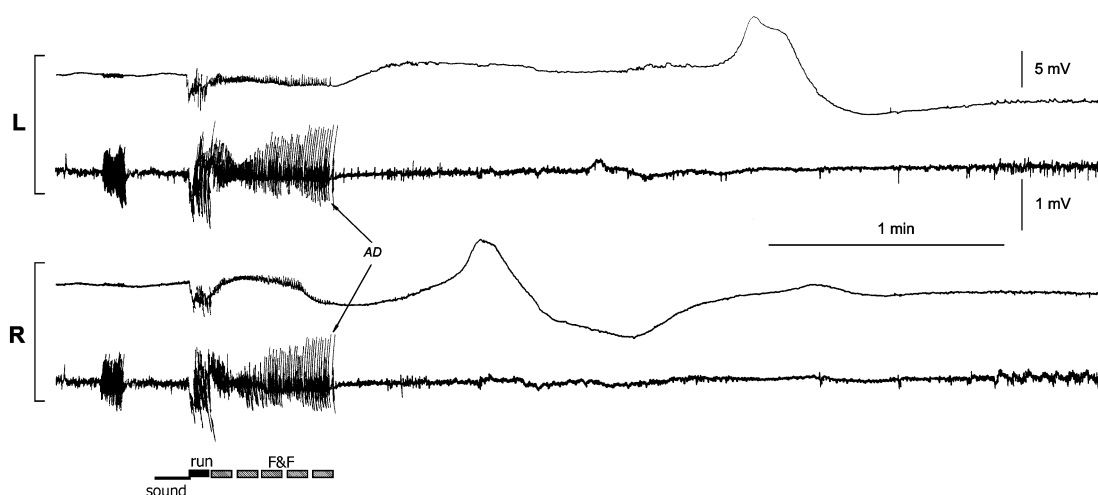


**Рис. 24.** Электрографические ответы коры на повторные аудиогенные судороги у крыс WAG/Rij. Приведены фрагменты одновременной записи сверхмедленных сдвигов потенциала (верхние кривые) и ЭЭГ (нижние кривые) во фронтальной коре левого (L) и правого (R) полушарий одной и той же крысы. Эпилептиформные пачки до начала звуковой стимуляции – спонтанные неконвульсивные разряды (SWD). Горизонтальными линиями внизу отмечены длительности звукового стимула (sound), бега (run) и лимбического клонуса (F&F). (A) Третий звуковой стимул вызвал короткий эпизод бега влево, судорожная активность в коре отсутствует. (B) Тринадцатая звуковая стимуляция вызвала левосторонний бег, через 2.5 минуты после которого в коре левого полушария появилась волна РД. (C) В 25-м тесте звук вызвал бег влево с последующим клонусом. Во время клонуса в коре регистрировали эпилептиформный разряд (AD). После приступа в коре левого полушария появилась волна РД.

медленный сдвиг потенциала амплитудой  $9.0 \pm 1.5$  мВ (4-14 мВ) и длительностью  $17.7 \pm 0.6$  сек (на половине амплитуды), регулярно возникал в коре одного из полушарий (Рис. 24В). Этот сдвиг постоянного потенциала сопровождался временной депрессией ЭЭГ и свидетельствовал о возникновении

в коре волны РД. Односторонняя волна РД появлялась в париетальной и фронтальной областях коры через  $93.1 \pm 7.9$  сек и  $142.5 \pm 6.3$  сек после окончания аудиогенного бега, соответственно. Возникновение в коре односторонней РД не было связано с какими-либо изменениями поведенческого или электрографического паттерна АС. Фенотип судорог, вызвавших корковую РД, не отличался от фенотипа предыдущих АС, не сопровождавшихся возникновением в коре волны РД. Первые волны РД появлялись после двигательного возбуждения длительностью  $7.0 \pm 0.9$  сек, что достоверно не отличалось от длительности эпизодов бега, не вызывавших волну РД ( $5.9 \pm 0.5$  сек). После своего появления РД становилась регулярной реакцией коры на последующие аудиогенные судороги.

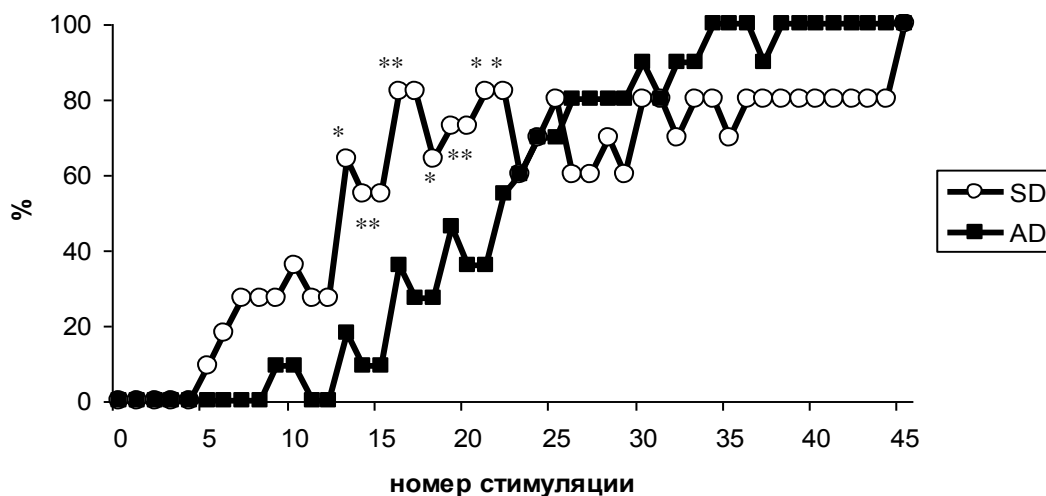
У киндлинг-чувствительных крыс, одновременно с развитием клонических судорог, в коре появлялся билатеральный низкочастотный (1-4 Гц) корковый разряд (AD). Амплитуда первых разрядов, во время которых наблюдался слабый лимбический клонус (стадии 1-2), составляла  $0.5 \pm 0.1$  мВ. В этих опытах по-прежнему регулярно возникала односторонняя РД. При усилении клонических судорог и достижении стадии 3 (Racine, 1972) значительно увеличивалась амплитуда AD - до  $1.8 \pm 0.4$  мВ ( $p < 0.005$ ), и волна РД начинала возникать в обоих полушариях (Рис. 25).



**Рис.25.** Билатеральное возникновение корковой волны РД на поздней стадии аудиогенного киндлинга у крысы WAG/Rij. Обозначения те же, что на рис. 24. Звук вызвал короткую побегу, за которой последовал двусторонний клонус передних лап в позе кенгуру (стадия 4 по Racine).

У крыс WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией, как и у крыс Wistar, односторонняя волна РД была самым ранним корковым событием при аудиогенном киндлинге. У киндлинг-чувствительных крыс WAG/Rij волна РД появлялась с  $9.3 \pm 0.8$  теста, а корковый эпилептический разряд с  $12.6 \pm 1.3$  теста. Вплоть до поздних стадий киндлинга РД возникала значительно чаще, чем АД ( $p < 0.05$ ). У киндлинг-резистентных крыс, демонстрировавших парциальный киндлинг (до стадий 1-2), РД и АД регистрировали достоверно позже – с  $14.7 \pm 1.0$  ( $p < 0.001$ ) и  $21.9 \pm 2.2$  ( $p < 0.005$ ) тестов, соответственно. На рисунке 26 приведены данные о возникновении в коре РД и АД при повторных аудиогенных судорогах у киндлинг-чувствительных крыс WAG/Rij. На поздних стадиях АК эпилептиформный послеразряд развивался в коре у всех киндлинг-чувствительных крыс, а РД - у 80 % животных.

Ни РД, ни АД не возникали в коре контрольных «неаудиогенных» крыс WAG/Rij при их звуковой стимуляции.

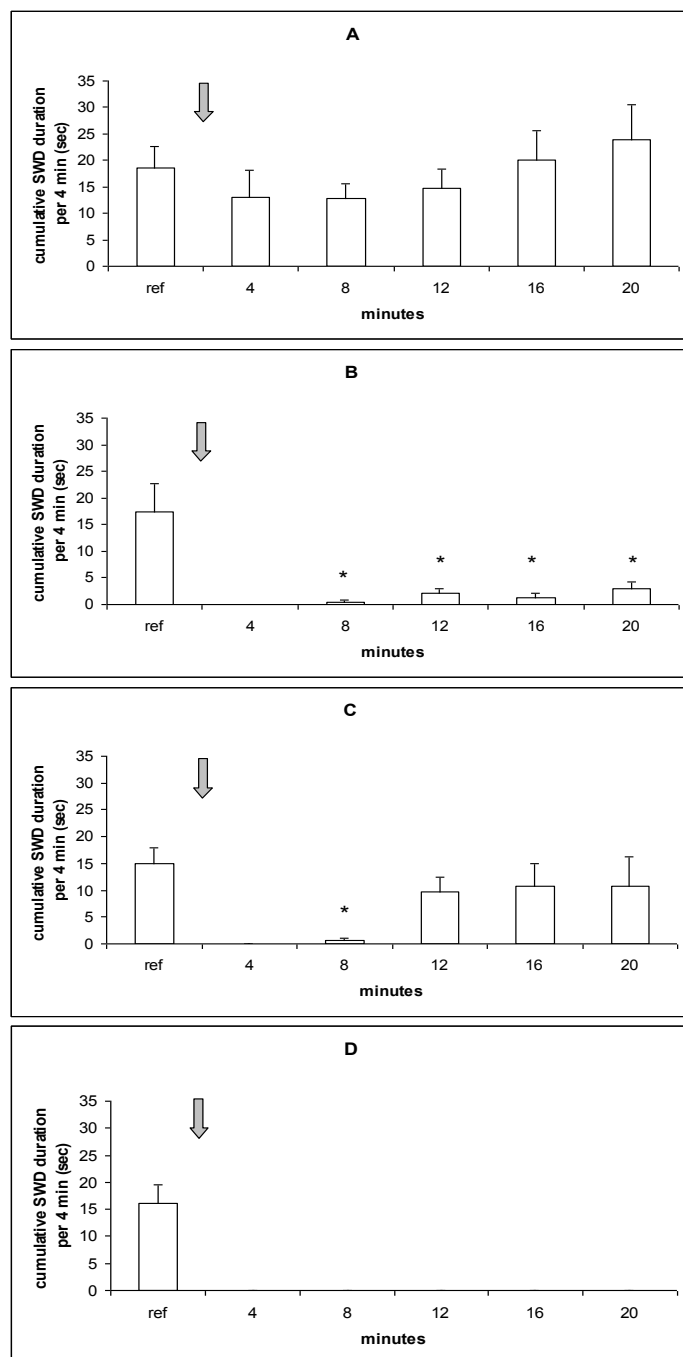


**Рис. 26.** Возникновение РД (spreading depression, SD) и АД (afterdischarge) в коре крыс WAG/Rij при повторной звуковой стимуляции, вызывающей минимальные аудиогенные судороги (эпизод двигательного возбуждения). Ордината – процент крыс, у которых в коре возникала РД/АД. \*- $p < 0.05$ .

### *Влияние минимальных аудиогенных судорог на абсансную судорожную активность у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии*

Первые эпизоды короткого двигательного возбуждения, не вызывавшие в коре ни РД ни АД, незначительно влияли на спонтанную неконвульсивную судорожную активность (SWD) у крыс WAG/Rij (Рис. 24А и 27А). Только в

первые четыре минуты после таких АС наблюдалось небольшое и недостоверное ослабление SWDs. Если бег вызывал в коре только одностороннюю волну РД, то наблюдали торможение неконвульсивной судорожной активности (SWD) в течение всех 20 мин постиктального периода ( $F=7.054$ ,  $p<0,005$ ) (Рис. 27В).



**Рис. 27.** Влияние аудиогенных судорог на спонтанную судорожную активность абсансного типа (SWD) у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии. По ординате – длительность SWD (сек) за 4 мин до (ref) и в течение 20 минут после окончания аудиогенных судорог, не вызвавших в коре ни АД, ни РД (А), вызвавших одностороннюю корковую РД (В), односторонние РД и АД (С), двусторонние РД и АД (D). \*  $p<0.05$  – достоверное отличие относительно соответствующих периодов на А.

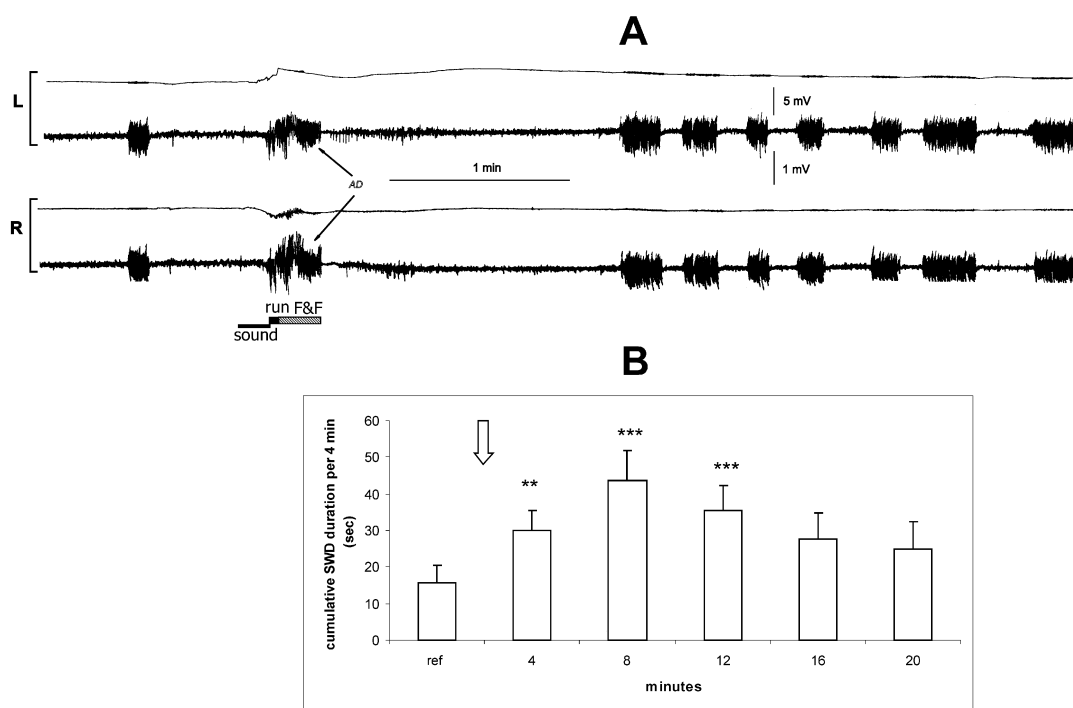
Если аудиогенные судороги вызывали не только унилатеральную волну РД, но и АД, также наблюдали постиктальное торможение SWD ( $F=3.513$ ,  $p<0.05$ ), но более кратковременное (Рис. 27С). При этом

достоверное снижение длительности судорожных разрядов абсанс эпилепсии (SWD) наблюдали только в течение первых 8 минут постиктального периода. На поздних стадиях киндлинга, когда судороги вызывали и АД и РД в коре



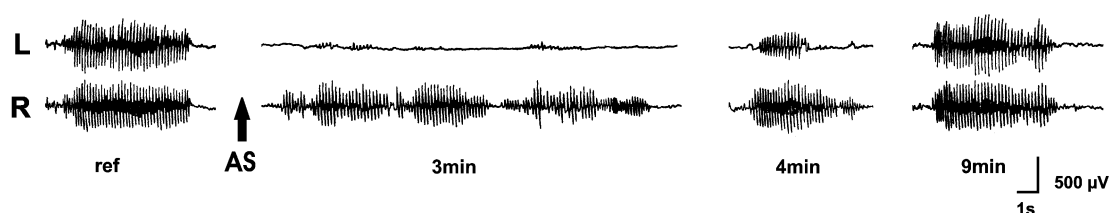
обоих полушарий, всегда наблюдали длительную депрессию спонтанных SWD, которые полностью исчезали на весь 20-минутный период наблюдения ( $F=8.800$ ,  $p<0.0001$ ) (Рис. 27D). В этом случае спонтанная абсансная активность оставалась полностью депрессированной не менее часа после такого аудиогенного приступа, несмотря на то, что в течение всего этого периода крысы находились в состоянии пассивного бодрствования, наиболее благоприятного для возникновения абсансных судорог состояния.

В 15 % случаев на поздних стадиях аудиогенного киндлинга у крыс WAG/Rij корковый АД развивался в отсутствие волны РД. В этом случае всегда наблюдали резкую интенсификацию спонтанной SWD активности ( $F=2.992$ ,  $p<0.05$ ) (рис. 28A). В приведенном на рисунке 28A примере звук вызвал эпизод бега и клонические судороги максимальной интенсивности (стадия 5) с эпиплептиформным разрядом (AD) в коре, но РД не возникла. В этом случае наблюдали резкую экзальтацию абсансной судорожной активности в первые 10-15 минут постиктального периода (Рис. 28B).



**Рис. 28.** Экзальтация спонтанных абсансных судорог после аудиогенного приступа с интенсивным эпиплептическим возбуждением коры (AD) без волны РД. На А приведена репрезентативная запись электрической активности коры обоих полушарий после аудиогенных судорог (обозначения те же, что на рис. 24). На В – длительность абсансных разрядов (SWD)/4 мин в течение преиктального (ref) и постиктального периодов при аудиогенных судорогах, вызвавших в коре AD без волны РД (обозначения те же, что на рис. 27).

На поздних стадиях аудиогенного киндлинга, в условиях резко повышенной возбудимости коры и развития высокоамплитудной эпилептиформной активности во время АС, во время односторонней корковой волны РД у крыс WAG/Rij наблюдали кратковременную активацию коры недепрессированного (противоположного волне РД) полушария (Рис. 29). Эта активация напоминала по своему паттерну абсансный разряд (SWD-like discharge) и всегда наблюдалась в период от 2.5 до 4 минут (в среднем через  $160.3 \pm 2.8$  секунд) после окончания аудиогенного приступа.



**Рис. 29.** Односторонняя SWD-подобная активность, записанная до (ref) и после аудиогенных судорог (через 3, 4 и 9 мин после их окончания), вызывавших в коре левого полушария волну РД. Приведены фрагменты ЭЭГ, записанные в симметричных точках левого (L) и правого (R) полушарий одной крысы. Приведены записи всех разрядов, записанных в первые 10 минут постиктального периода. Внизу каждого фрагмента отмечено время, прошедшее после окончания аудиогенных судорог.

## Обсуждение

### *Возникновение корковой волны РД при повторных аудиогенных судорогах у крыс WAG/Rij с двумя формами генерализованной эпилепсии*

Проведенное исследование показало, что у крыс WAG/Rij (1) повторение коротких эпизодов стволовых судорог (двигательного возбуждения) может вызывать прогрессивную эпилептическую активацию коры с развитием низкочастотного эпилептиформного разряда (AD), то есть формирование киндлинга; (2) самым ранним корковым проявлением аудиогенного киндлинга, предшествующим эпилептической активации коры, является односторонняя волна РД; (3) возникающая при аудиогенных судорогах волна РД в значительной степени определяет постиктальные эффекты аудиогенных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии.

Как и у крыс Wistar, у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии односторонняя волна РД была самой ранней электрографической реакцией коры на повторные аудиогенные судороги. Корковая РД регулярно возникала, как у киндлинг-чувствительных, так и киндлинг-резистентных крыс. При этом

традиционный индикатор киндлинга, корковый эпилептиформный разряд (AD), появлялся или значительно позже (у киндлинг-чувствительных крыс) или не развивался вообще (у киндлинг-резистентных крыс). Таким образом, РД является не только самым ранним, но и самым стабильным проявлением коркового эпилептогенеза при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij. Одностороннее возникновение волны РД в коре на ранних этапах киндлинга указывает на одновременное вовлечение коры двух полушарий в эпилептическую сеть АС. Данный вопрос будет рассмотрен более подробно в главе 4.

***Роль корковой волны РД в постиктальных эффектах аудиогенных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами генерализованной эпилепсии***

Ранее высказывалось предположение о том, что РД может лежать в основе постиктальной депрессии, следующей за конвульсивными судорогами (Van Harreveld and Stamm, 1955). Действительно, после волны РД, вызванной прямой стимуляцией коры, наблюдается длительное торможение корковых эпилептиформных разрядов (Bures et al., 1974; Gloor et al., 1979; Vergnes, Maresaux, 1992; Kelly et al., 1999). Более того, судорожная активация мозга, вызванная системным введением PTZ, инициирует в ряде структур мозга волну РД, которая быстро тормозит вызвавшую ее эпилептическую активность (Королева и др., 1993).

Отсутствие существенного влияния *первых* эпизодов аудиогенных судорог (без РД и АД) на возникновение SWD, описанное нами, согласуется с гипотезой о независимом функционировании судорожных сетей ствола и переднего мозга (Browning et al., 1985, 1999). Как известно, однократные АС генерируются стволовыми сетями (Крушинский, 1960; Browning et al., 1985, 1999; Faingold, 1999), а неконвульсивные судороги (SWD) отражают таламокортикальные осцилляции (Gloor, Fariello, 1988; Meeren et al., 2002; Coenen, van Luijtelaar, 2003).

Однако *повторные* аудиогенные судороги, в экспрессию которых уже вовлекаются и структуры переднего мозга, оказывают значительное влияние на спонтанную неконвульсивную судорожную активность крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии. Как показали результаты наших экспериментов,

критическим событием, определяющим постиктальную динамику SWD, является возникновение в коре волны РД. Аудиогенные судороги, вызывающие интенсивную эпилептическую активацию коры (с развитием АД) в отсутствие волны РД, приводят к резкому усилению абсансных судорог в постприступный период (рис. 28), что отражает гипервозбудимое состояние коры на поздних стадиях киндлинга. Но возникновение в коре волны РД радикально меняет паттерн постиктальной активности, вызывая длительное торможение SWD. На поздних стадиях киндлинга волна РД возникает в коре обоих полушарий, и тогда, несмотря на интенсивную эпилептическую активацию коры с высокоамплитудным АД и сильными моторными судорогами, наблюдается полное и длительное постиктальное подавление абсансных разрядов.

То, что именно корковая волна РД определяет постиктальное торможение абсансных судорог после АС, подтверждается результатами наших недавних экспериментов на крысах WAG/Rij (Samotaeva et al., 2013). Одиночная унилатеральная корковая РД, вызванная локальной механической стимуляцией коры, полностью блокировала пик-волновые разряды абсансной эпилепсии у этих крыс в течение 8 мин и значительно снижала частоту SWD в течение, по крайней мере, 90 мин. У крыс GAERS, другой линии крыс с генетической абсансной эпилепсией, также показано ослабление спонтанных SWDs в течение 1-2 часов после односторонней корковой волны РД (Vergnes, Marescaux, 1992).

Торможение абсансной судорожной активности при функциональном выключении коры с помощью РД было ранее показано на фармакологической модели абсансной эпилепсии (Gloor et al., 1979). Но такое торможение SWD наблюдали на фоне множественных волн РД, вызываемых локальной аппликацией хлористого калия. В наших опытах подавление абсансных разрядов наблюдали после одиночной волны РД, возникающей в ответ на синаптическую активацию коры.

Механизмы длительной (до одного часа) инактивации пик-волновой активности (абсансных судорог) после одной волны РД, описанной в наших экспериментах, остаются неясными. Известно, что корковая РД вызывает депрессию ЭЭГ на 2-3 мин и подавление спонтанной активности нейронов коры на 5-7 мин (Bures et al., 1974). То есть, 8-минутная депрессия SWD после судорог с корковой РД может быть связана с прямой инактивацией коркового

пейсмекера SWD в соматосенсорной области коры. Однако более длительное торможение разрядов на период от 20 мин до 1 часа предполагает активацию дополнительных механизмов, длительно подавляющих спонтанную генерацию SWD у крыс WAG/Rij. Природа механизмов, лежащих в основе этого длительного эффекта, неясна. Можно предположить участие глобальных нейрохимических изменений, вызываемых волной РД, например, усиление экспрессии тормозных ряда нейропептидов (Arabia et al., 1998; van Bree et al., 1995).

Интересным явлением, связанным с возникновением корковой волны РД при аудиогенном киндлинге у крыс WAG/Rij, является односторонняя SWD-подобная пачка, появляющаяся в определенный период времени после аудиогенного приступа в коре недепрессированного полушария. Пространственно-временные характеристики этой кратковременной активации предполагают ее тесную связь с волной РД. Известно, что развитию волны РД предшествует кратковременное интенсивное возбуждение нейронов (Bures et al., 1974; Herreras, Somjen, 1993). При одностороннем развитии РД этот залп возбуждения может активировать транскаллозальные волокна и корковые нейроны противоположного полушария. Так как кора крыс WAG/Rij содержит области, особенно чувствительные к генерации SWD (Meeren et al., 2002), и их активация в недепрессированном полушарии может инициировать SWD-подобную активность.

Таким образом, электрографические данные с регистрацией сверхмедленной активности коры показали, что РД регулярно возникает в коре больших полушарий при повторных рефлекторных аудиогенных судорогах у крыс Wistar и WAG/Rij. Короткий эпизод аудиогенного бега является мощным триггером односторонней корковой РД у этих крыс. Волна РД является самой ранней и стабильной реакцией коры на повторные аудиогенные судороги у бодрствующих крыс, в значительной степени определяющим характер постиктальной корковой активности. Однако возникновение РД обычно не учитывается при исследовании эпилептогенеза из-за фильтрации сверхмедленных сдвигов потенциала при стандартной регистрации ЭЭГ. Поскольку анализ ЭЭГ в стандартном диапазоне частот часто не позволяет понять причины значительных различий в постиктальных изменениях,

вызываемых судорогами с идентичным поведенческим и электрографическим паттерном, возможность возникновения РД должна учитываться при интерпретации этих различий.

### **3.4. Асимметрия ранних проявлений аудиогенных судорог и аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij**

Латеральная асимметрия электрографических проявлений судорожной активности является важным клиническим показателем при диагностике эпилепсии: односторонняя эпилептиформная активность со стойкой латерализацией в одном полушарии указывает на фокальную патологию, а билатеральные эпилептические разряды на ЭЭГ считаются маркерами генерализованной эпилепсии. Однако в последнее время появляется все больше данных о несостоятельности жесткого дихотомического деления эпилепсий на фокальные и генерализованные формы. При первично генерализованной эпилепсии в начале судорожного приступа часто наблюдаются латерально асимметричные электрографические и моторные проявления, указывающие на возможное фокальное начало даже первично генерализованных судорог (Myslobodsky, Rosen, 1979; Blume 1998). Так у пациентов с первично генерализованной идиопатической эпилепсией описаны судороги с ярко выраженной латеральной асимметрией ЭЭГ, ранними латерализованными моторными нарушениями (поворотом глаз, головы или тела в одну сторону) (Gastaut et al., 1986; Casaubon et al., 2003; Blume, 1998), а также обнаружены значительные межполушарные различия возбудимости коры (Aguglia et al., 2000). На основании клинических наблюдений было высказано предположение, что даже первично генерализованная судорожная активность может начинаться с одностороннего возбуждения и быстро распространяться в другое полушарие (Blume, 2010).

Аудиогенные судороги считаются адекватной экспериментальной моделью первично генерализованных тонико-клонических судорог человека. Интенсивные аудиогенные судороги у крыс с высокой судорожной чувствительностью имеют симметричный паттерн и отражают билатеральную эпилептическую активацию стволовых отделов мозга. Повторение таких билатерально симметричных судорог вызывает бисинхронное вторичное рекрутирование коры в эпилептическую сеть АС и формирование аудиогенного киндлинга (Simler et al., 1999). Поэтому в исследованиях аудиогенного киндлинга, традиционно использующих повторный вызов интенсивных

аудиогенных судорог, реакции обоих полушарий *a priori* считаются идентичными.

Однако отмечалось, что первая локомоторная фаза АС, отражающая самое раннее эпилептическое возбуждение ствола, может иметь асимметричный паттерн (Pierson, 1992; Garcia-Cairasco et al., 1993). В нашей мягкой парадигме аудиогенного киндлинга (с повторным вызовом минимальных аудиогенных судорог) были получены данные, указывающие на асимметричный паттерн вторичной эпилептической активации коры: одностороннее возникновение волны РД указывало на неодновременное вовлечение коры полушарий в сеть АС (глава 3). Эти данные побудили нас провести отдельный анализ судорожных ответов коры каждого полушария при повторном вызове аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij, а также подробно исследовать латеральную симметрию моторных судорожных реакций этих крыс на звук.

## **Результаты**

### ***3.4.1. Индивидуальная асимметрия аудиогенного бега и электрографических ответов коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij***

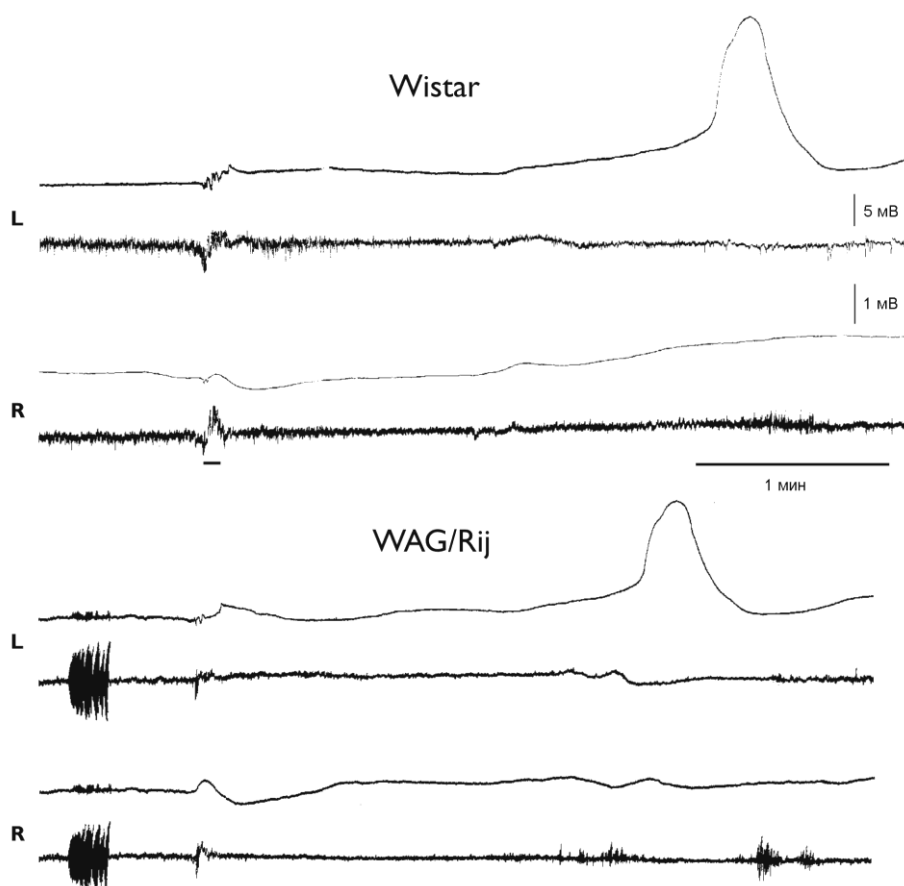
Короткий бинауральный звук вызывал у «аудиогенных» крыс Wistar и WAG/Rij двигательное возбуждение, которое имело выраженный асимметричный паттерн. Оно начиналось с поворота головы и/или вращения, которое переходило в однонаправленный бег по периметру камеры в одном доминирующем направлении. У большинства животных направление бега оставалось неизменным при повторном тестировании. После повторных аудиогенных судорог в коре начинали регистрировать волну РД, а затем у киндлинг-чувствительных крыс появлялся и эпилептиформный послеразряд (AD). Первые корковые волны РД были односторонними, и их латерализация тесно коррелировала с направлением вызвавшего ее аудиогенного бега: РД всегда возникала в коре, ипсилатеральной направлению бега (таблица 15, рис. 30).



**Таблица 15.** Латерализация аудиогенного бега, первых корковых РД и АД у крыс Wistar и WAG/Rij

Линия/ направление аудиогенного бега	N	РД			АД		
		L	L+R	R	L	L+R	R
<b>Wistar</b>							
Влево	11	91	9	0	46	18	0
Вправо	6	0	0	100	0	0	0
<b>WAG/Rij</b>							
Влево	5	100	0	0	20	40	0
Вправо	6	0	0	100	0	60	20

Приведен процент крыс, у которых первые волны РД и первые АД возникали в коре левого (L), правого (R) или обоих (L+R) полушарий. Приведены данные для крыс с вживленными электродами и стабильным судорожным ответом на звук



**Рис. 30.** Односторонняя волна РД, записанная в коре крыс Wistar и WAG/Rij после эпизода аудиогенного бега влево (в 10-м и 13-м тестах, соответственно). Медленные сдвиги потенциала (верхние кривые) и ЭЭГ (нижние кривые) были записаны в симметричных точках коры левого (L) и правого (R) полушарий. Периоды бега обозначены линиями внизу. Высокоамплитудный разряд перед эпизодом аудиогенного бега у крысы WAG/Rij – спонтанный разряд абсансного типа (SWD).

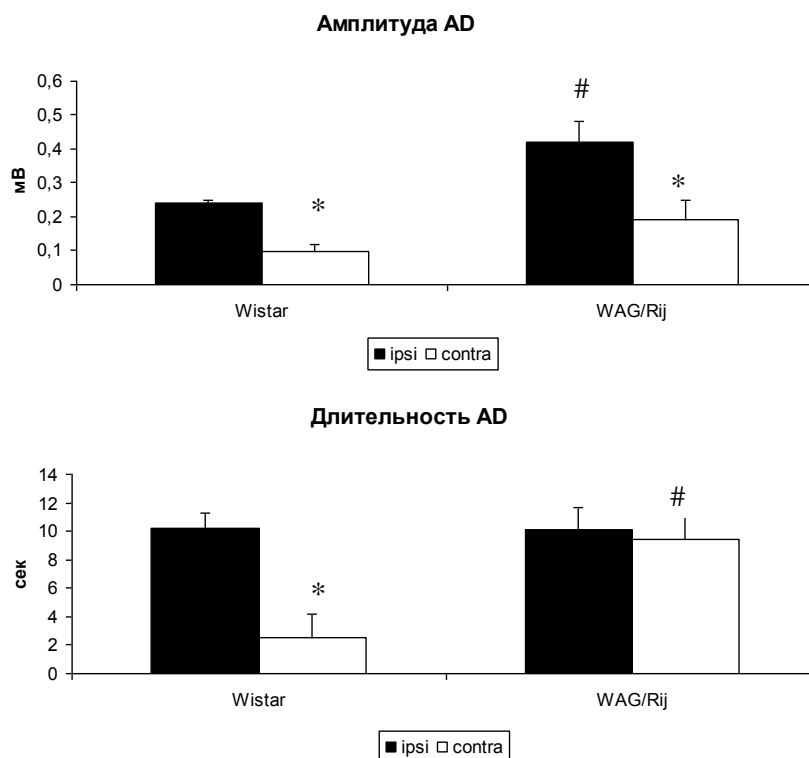
Волна РД всегда сначала появлялась в коре полушария, ипсилатерального направлению бега (с  $11.7 \pm 1.1$  теста у крыс Wistar и с  $13.7 \pm 0.7$  теста у крыс WAG/Rij), и продолжая регулярно возникать в повторных опытах в том же полушарии. Волна РД оставалась односторонней до конца тестирования у 10 из 17 крыс Wistar и 5 из 11 крыс WAG/Rij. У остальных крыс волна РД становилась двусторонней, но происходило это на поздних стадиях киндлинга после развития в коре высокоамплитудных билатеральных эпилептиформных разрядов. У этих крыс волна РД появлялась достоверно позже в коре полушария, контралатерального направлению бега, по сравнению с ипсилатеральной корой (Таблица 16). Среди всех исследованных крыс обеих линий только у одной крысы Wistar волна РД была билатеральной уже при первом возникновении, но это была единственная крыса, у которой РД появилась только на поздних стадиях киндлинга одновременно с развитием в коре высокоамплитудного билатерального эпилептического разряда (AD).

Кроме этой единственной крысы Wistar, у всех животных, подвергнутых процедуре аудиогенного киндлинга, эпилептиформные разряды (AD) появлялись в коре значительно позже, чем волна РД. Первые AD имели выраженный асимметричный паттерн и даже могли быть односторонними. Вновь, как и в случае РД, доминировала кора, ипсилатеральная направлению бега, и никогда не отмечалось доминирования контралатерального полушария. У крыс Wistar амплитуда и длительность первого эпилептиформного разряда были выше в коре полушария, ипсилатерального направлению бега (рис. 31). У крыс WAG/Rij первые разряды (AD), появившиеся в ходе киндлинга, были асимметричны по амплитуде, но не по длительности. У крыс этой линии амплитуда AD была выше, чем у крыс Wistar.

**Таблица 16.** Число повторных аудиогенных судорог, необходимых для инициации РД и AD в коре полушария, ипсилатерального (*ipsi*) и контралатерального (*contra*) направлению бега.

Линия	РД		AD	
	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>	<i>ipsi</i>	<i>contra</i>
<b>Wistar</b>	$11.5 \pm 1.1^*$ (n=17)	$19.1 \pm 1.8$ (n=7)	$15.1 \pm 1.7^*$ (n=7)	$16.4 \pm 1.6$ (n=7)
<b>WAG/Rij</b>	$13.7 \pm 0.7^*$ (n=11)	$20.8 \pm 2.2$ (n=6)	$17.0 \pm 2.2$ (n=8)	$18.5 \pm 2.2$ (n=8)

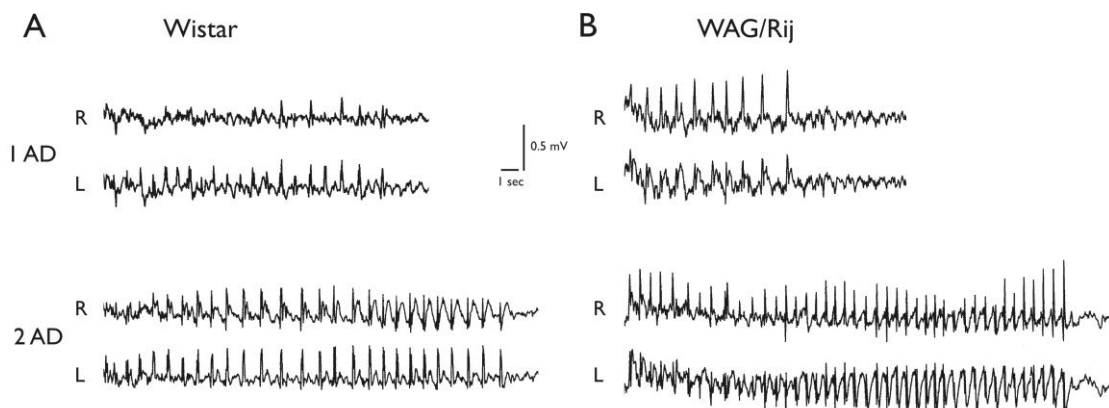
\* - достоверное отличие от контралатеральной коры;  $p < 0.05$ .



**Рис. 31.** Средняя амплитуда и длительность первых эпилептических разрядов (AD), развившихся в ходе киндлинга в коре полушария, ипсилатерального (ipsi) и контралатерального (contra) направлению бега у крыс Wistar и WAG/Rij. \* - достоверное межполушарное различие ( $p < 0.05$ ), # - достоверное межлинейное различие ( $p < 0.05$ ).

На рисунке 32 приведены типичные примеры первых двух эпилептических разрядов (AD), зарегистрированных в симметричных точках коры левого и правого полушарий, после левостороннего аудиогенного бега у крысы Wistar (A) и правостороннего аудиогенного бега у крысы WAG/Rij (B). У крысы Wistar в коре левого полушария спайки появились сразу после окончания бега, тогда как справа была записана только abortивная эпилептическая активность (несколько отставленных спайков длительностью менее 5 сек). У крысы WAG/Rij первый эпилептический разряд, следующий за бегом в правую сторону, был билатеральным, но с правосторонним доминированием по амплитуде. Несмотря на такой асимметричный паттерн первых корковых разрядов, они быстро (после 1-3 повторений) становились билатерально симметричными, что указывало на эффективное межполушарное распространение судорожной активности на корковом уровне. Сравнение латентности появления AD в коре каждого из полушарий (т.е. числа повторных эпизодов аудиогенного бега до первого появления AD в коре данного полушария) показало, что у крыс Wistar эпилептический разряд появляется,

хотя незначительно, но достоверно раньше в коре, ипсилатеральной направлению бега, чем в коре противоположного полушария (Таблица 16). У крыс WAG/Rij не было найдено таких межполушарных различий: у них уже первые корковые разряды, развившиеся в ходе киндлинга, были билатеральными (см. таблицы 15, 16).



**Рис. 32.** Первые эпилептические разряды, записанные в симметричных точках коры левого (L) и правого (R) полушарий у двух крыс - крысы Wistar (A) и крысы WAG/Rij (B). Начало фрагментов совпадает с окончанием аудиогенного бега – у крысы Wistar в левую сторону, у крысы WAG/Rij – в правую сторону.

Типичным поведенческим проявлением первых корковых AD был уни/билатеральный клонус ушей. При дальнейшей стимуляции у части крыс (киндинг-чувствительных) происходила прогрессивная интенсификация этих клонических судорог до максимальной степени выраженности - стадии 5 (Racine, 1972), тогда как у других (киндинг-резистентных) крыс эти клонические судороги или не развивались вовсе или оставались слабыми (не превышающими стадий 1-2) до конца тестирования. Профиль аудиогенного киндинга у крыс Wistar и WAG/Rij с разным направлением бега исследовался более подробно у интактных крыс без вживления электродов (см. раздел 4.3.2).

Общая длительность абсансных судорог у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии варьировала от 5 до 260 секунд за 20-минутный период. Средние значения этого показателя составили  $35.5 \pm 8.2$  сек для крыс, развивших вторичные эпилептические разряды (AD) в коре, и  $115.7 \pm 74.0$  сек для крыс, у которых не было зарегистрировано корковых AD (нет достоверных различий).

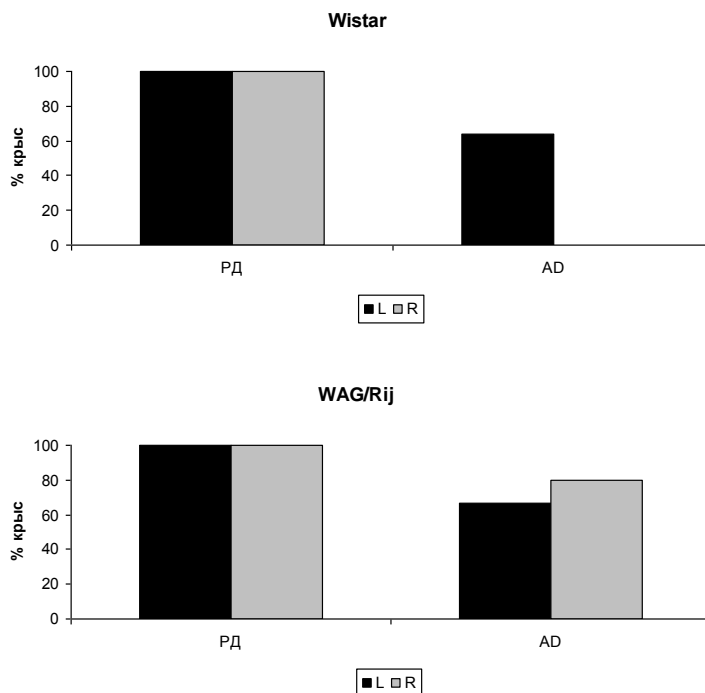
### 3.4.2. Популяционная асимметрия поведенческих и электрографических проявлений аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij

Несмотря на существование стойкой индивидуальной асимметрии аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij, на популяционном уровне не было обнаружено доминирования определенной направленности двигательного возбуждения: у крыс обеих линий звук вызывал левосторонний и правосторонний бег с одинаковой вероятностью (Таблица 17).

**Таблица 17.** Частота возникновения и длительность левостороннего и правостороннего аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij.

	<i>бег влево</i>	<i>бег вправо</i>
<b>Wistar rats</b>		
процент (число) крыс	48 (12/25)	52 (13/25)
длительность бега (сек)	5.3±0.6	5.3±0.7
<b>WAG/Rij rats</b>		
процент (число) крыс	47 (7/15)	53 (8/15)
длительность бег (сек)	5.6±0.6	5.3±0.8

Для проверки связи между латерализацией стволовых судорог и их способностью к вторичной генерализации в кору было проведено сравнение частоты возникновения корковых РД и АД у крыс с право- и левосторонним аудиогенным бегом (рис. 33). Несмотря на одинаково высокую частоту возникновения корковой РД (независимо от линии и направления бега), развитие в коре эпилептических разрядов (АД) резко отличалось у крыс Wistar и WAG/Rij, а также у особей с лево- и правосторонним бегом. Среди крыс Wistar корковые АД были зарегистрированы только после левостороннего аудиогенного бега. Такой закономерности не было найдено у крыс WAG/Rij, у которых корковые АД возникали с примерно равной частотой у особей с двигательным возбуждением, направленным влево и вправо.

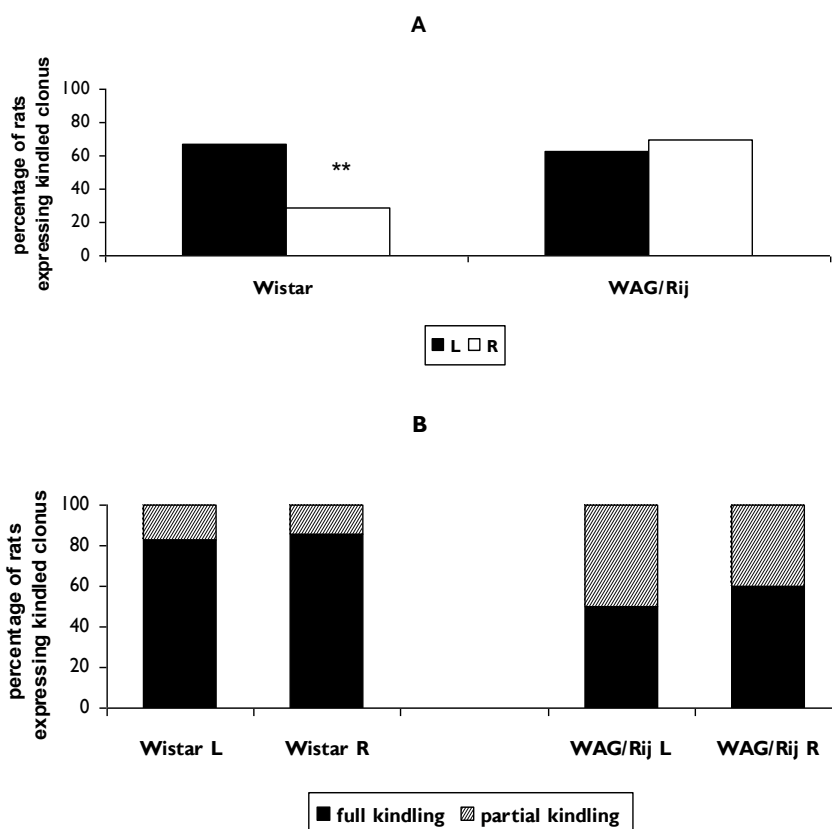


**Рис. 33.** Возникновение РД и эпилептических разрядов (AD) в коре крыс с Wistar (n=17) и WAG/Rij (n=11) с левосторонним (L) и правосторонним (R) направлением аудиогенного бега. Ордината – процент крыс с данным направлением бега.

Чтобы далее исследовать эти межлинейные и внутрилинейные различия в динамике вторичной генерализации судорог у крыс с разной латерализацией аудиогенного бега, было проведено сравнение частоты развития лимбического клонуса (поведенческого коррелята коркового AD) в больших популяциях интактных крыс (100 Wistar и 50 WAG/Rij) без вживленных электродов. Так как для инициации аудиогенного киндлинга используется только физиологическая сенсорная стимуляция, а поведенческие фенотипы стволовых и вторично генерализованных корковых судорог резко отличаются, развитие киндлинга и связанную с ним вторичную генерализацию судорог из ствола в передний мозг можно легко наблюдать по изменению поведенческого паттерна AC у интактных крыс. Появление лимбического клонического компонента припадка использовали как маркер распространения судорог из ствола в передний мозг, а последующая интенсификация клонуса до стадии 5 была показателем полного развития киндлинга и широкой генерализации в пределах переднего мозга.

Данные, полученные на интактных крысах, полностью согласуются с результатами, описанными для крыс с вживленными электродами. Бег в левую

и правую сторону возникал примерно с одинаковой частотой: среди крыс Wistar – у 48% (48/100) и 52% (52/100), соответственно, среди крыс WAG/Rij – у 42 % (21/50) и 58 % (29/50), соответственно. Как корковые эпилептические разряды (AD) у крыс с вживленными электродами, связанные с этими AD клонические судороги лимбического типа у интактных крыс Wistar возникали в два раза чаще после бега влево, по сравнению с бегом в правую сторону ( $p < 0.005$ ). Однако такие различия отсутствовали у крыс WAG/Rij (Рис. 34А).



**Рис. 34.** Развитие клонических судорог лимбического типа (формирование аудиогенного киндлинга) при повторном вызове левостороннего (L) и правостороннего (R) аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij. Приведен общий процент крыс, у которых развились клонические судороги (A), и процент крыс, которые продемонстрировали полное (full kindling) или частичное (partial kindling) развитие аудиогенного киндлинга (B) при повторном возникновении аудиогенного бега определенной направленности. \*\* - достоверное отличие между крысами Wistar с разным направлением бега ( $p < 0.005$ ).

### 3.4.3. Динамика аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij с разной направленностью аудиогенного бега

После появления в составе АС вторично генерализованного клонуса лимбического типа последующее развитие киндлинга было связано с

прогрессивной интенсификацией этих клонических судорог. У киндлинг-чувствительных крыс они усиливались до максимальной 5 стадии, тогда как у киндлинг-резистентных крыс лимбические судороги не развивались вовсе или оставались слабыми (не превышающими стадии 2).

Среди особей с вживленными электродами, у большинства крыс Wistar (6 из 7) клонус усилился до максимальной стадии 5, а у большинства крыс WAG/Rij корковые судороги оставались слабыми (не выше 2 стадии) без последующей интенсификации до конца эксперимента. Сходное различие в динамике развития лимбических судорог при аудиогенном киндлинге наблюдали у интактных крыс этих линий (Рис. 35Б). У крыс Wistar лимбические судороги обычно прогрессировали к своей максимальной степени выраженности (полное развитие киндлинга), а у крыс WAG/Rij лимбический клонус развивался относительно легко, но в повторных тестах чаще всего оставался слабым (частичное развитие киндлинга). Среди крыс WAG/Rij примерно половина животных показала такой парциальный киндлинг (до 2 стадии), что было значительно выше, чем доля крыс Wistar с парциальным киндлингом ( $p < 0.05$ ).

Интересно, что у крыс с лево- и правонаправленным бегом, которые резко отличались по скорости появления первых лимбических судорог (рис. 34А), последующая интенсификация этих судорог (т.е. полное развитие киндлинга) происходила одинаково (рис. 34В).

#### ***3.4.4. Латерализация аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij с приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам***

Некоторые крысы Wistar (32% (8/25) оперированных крыс с вживленными электродами и 33% (33/100) интактных крыс) и WAG/Rij (27% (4/15) оперированных крыс и 28% (14/50) интактных крыс) показали нестабильный судорожный ответ на повторную звуковую стимуляцию и утратили чувствительность к аудиогенным судорогам к 20-му тесту. Большинство этих крыс с приобретенной устойчивостью к аудиогенным судорогам демонстрировали правосторонний бег в ответ на звуковую стимуляцию – 88% (7/8) оперированных крыс Wistar, 64% (24/33) интактных крыс Wistar и 64% (9/14) интактных крыс WAG/Rij.



## **Обсуждение**

Таким образом, моторная асимметрия является характерной чертой самой ранней фазы аудиогенных судорог - начального двигательного возбуждения, отражающего эпилептическую активацию ствола. У крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией повторная инициация этих асимметричных стволовых судорог вызывает вторичную эпилептическую активацию коры больших полушарий, которая также развивается асимметрично.

### ***Моторная асимметрия аудиогенного бега у крыс Wistar и WAG/Rij.***

Развернутый аудиогенный приступ максимальной интенсивности, характерный для крыс с высокой чувствительностью к АС, представляет собой симметричные генерализованные тонико-клонические судороги. Однако любой аудиогенный приступ начинается с эпизода бега, который отражает начальное фокальное возбуждение ствола (Garcia-Cairasco et al., 1993; Faingold, 2004; Jobe, Browning, 2006 a,b). У крыс с высокой судорожной чувствительностью, таких как крысы КМ, это фокальное начало аудиогенных судорог может быть замаскировано стремительной билатерализацией эпилептической активности в стволовых сетях (Faingold, 1999; Simler et al., 1999). У крыс Wistar и WAG/Rij, обладающих низкой чувствительностью к АС, звук вызывает слабый и растянутый во времени судорожный припадок, начинающийся двухфазным двигательным возбуждением с паузой между двумя эпизодами бега. Наше исследование показало, что самый первый эпизод двигательного возбуждения имеет асимметричный паттерн, свидетельствующий об асимметричном возбуждении стволовых судорожных субстратов в начале аудиогенного приступа.

Двухфазный характер аудиогенного бега и асимметричный паттерн его первой фазы были ранее описаны для судорог, вызванных моноауральной звуковой стимуляцией грызунов с генетической аудиогенной эпилепсией или подвергнутых акустическому праймингу (Ward, 1971; Ward and Collins, 1971; Pierson, 1992). При этом направленность первого эпизода бега была единственным параметром, отличающим судороги, вызываемые моноауральной стимуляцией левого и правого уха (Pierson, 1992). Такие моноаурально вызванные АС полностью блокировались окклюзией стимулируемого уха (контралатерального направлению бега) или унилатеральным разрушением

нижнего двухолмия (ипсилатерального направлению бега) (Ward, 1971; Servit, 1960). Эти эксперименты показали, что аудиогенные судороги могут развиваться как латерализованный процесс уже на уровне ствола, и направленность начального бега является индикатором латерализации стволового фокуса (бег направлен в сторону активированного звуком НД). Это предположение согласуется с данными нейровизуализации судорожного процесса, вызванного односторонней электрической или фармакологической стимуляцией НД (Bagri et al., 1989; McCown et al., 1991, 1995). Во время локомоторного возбуждения (бега), вызванного такой стимуляцией, наблюдается односторонняя активация ствола, а билатерализация судорожной активности происходит только при переходе от бега к генерализованным тонико-клоническим судорогам.

В наших опытах асимметричный бег у крыс Wistar и WAG/Rij развивался в ответ на бинауральную звуковую стимуляцию. То есть моторная асимметрия аудиогенных судорог определялась внутренними факторами, а не внешней латерализацией стимула. Механизмы такого асимметричного судорожного ответа на симметричную эпилептогенную стимуляцию (бинауральный звук) могут включать латеральные различия в чувствительности периферических слуховых путей, во внутренней возбудимости сетей НД или в механизмах контроля судорог со стороны других структур мозга.

Таким образом, асимметричный характер аудиогенного судорожного бега отражает существование латеральных различий в уровне стволового эпилептического возбуждения, а направленность бега может служить показателем локализации стволовых судорог на стороне, ипсилатеральной направлению бега. Высокая стабильность индивидуальной асимметрии аудиогенного бега в повторных тестах (у крыс Wistar и WAG/Rij) предполагает устойчивую латерализацию стволового эпилептического фокуса у данного животного. С другой стороны, число животных, у которых звуковая стимуляция вызывала бег влево и вправо, было одинаковым в исследованных популяциях, что указывает на отсутствие асимметрии в реактивности стволовых субстратов АС на популяционном уровне у крыс Wistar и WAG/Rij.

Так как аудиогенные судороги широко используются как модель первично генерализованной эпилепсии, полученные нами данные о

латерализации самой ранней фазы этих судорог могут представлять интерес для понимания механизмов ранних латерализованных моторных симптомов, наблюдающихся у пациентов с первично генерализованной идиопатической эпилепсией (Gastaut et al., 1986; Casaubon et al., 2003).

***Асимметрия электрографических проявлений аудиогенного киндлинга у крыс Wistar и WAG/Rij.***

В традиционной модели аудиогенного киндлинга повторение интенсивных развернутых аудиогенных приступов ведет к развитию в переднем мозге билатерально симметричной судорожной активности, отражающей синхронное вовлечение обоих полушарий в эпилептический процесс (Marescaux et al., 1987; Simler et al., 1999). В нашей модели «мягкого» аудиогенного киндлинга, вызываемого повторением минимальных судорог (эпизода асимметричного бега), вторичная активация коры двух полушарий происходит асинхронно, причем латерализация самых ранних проявлений этой вторичной корковой активации тесно коррелирует с моторной асимметрией аудиогенного бега (т.е. первичных стволовых судорог). Электрографические проявления гипервозбудимости коры (РД и АД) сначала появляются в полушарии, ипсилатеральном направлению бега. Так как РД и эпилептический разряд (АД) развиваются в коре в результате активации восходящих проекций из ствола в передний мозг, то этот результат предполагает, что аномальное возбуждение при «мягком» аудиогенном киндлинге сначала распространяется в кору, ипсилатеральную направлению бега, указывая на ведущую роль этого полушария во вторичной генерализации судорог.

Поскольку начальный аудиогенный бег направлен в сторону активированного нижнего двухолмия (Ward, 1971; Servit, 1960), то опережающее развитие РД и эпилептической активности в коре того же полушария (ипсилатерального направлению бега) означает, что сначала происходит активация коры, гомолатеральной стволовым судорогам. А так как у крыс нижнее двухолмие связано со своими мишенями в переднем мозге перекрестными связями (Malmierca, Marchan, 2004), то полученные данные предполагают, что распространение стволовых судорог в кору при киндлинге происходит сначала в пределах одного полушария. Сходные результаты были получены на модели электрического киндлинга нижнего двухолмия и

миндалины. Повторный судорожный бег, вызванный односторонней стимуляцией нижнего двухолмия, также сначала активизирует гомолатеральную кору (McCown et al., 1991, 1997). При амигдалярном киндлинге в первую очередь рекрутируются ипсилатеральные сети переднего мозга и только затем судорожные разряды распространяются в контралатеральное полушарие (Racine, 1972; Kelly et al., 1999).

Быстрая билатерализация повторных эпилептиформных разрядов после их появления в коре предполагает эффективное межполушарное распространение судорожной активности на корковом уровне (в отличие от корковой волны РД, которая долго остается односторонней). Скорее всего, такая быстрая генерализация судорожной активности в коре обеспечивается мощными транскаллозальными связями. Но неясно, почему эти связи не обеспечивают такое же быструю синаптическую билатерализацию корковой РД.

Согласно классификации Международной Лиги по Борьбе с Эпилепсией (ИЛАЕ), стабильная индивидуальная латерализация ранних моторных и ЭЭГ появлений конвульсивной эпилепсии у человека является отличительной чертой фокальных судорог с вторичной генерализацией и служит важным показателем латерализации эпилептического фокуса (Engel, 2006). Полученные нами данные о стабильной индивидуальной асимметрии ранних моторных проявлений аудиогенных судорог указывают на фокальное начало этих судорог на стволовом уровне. А асимметрия первых корковых электрографических проявлений аудиогенного киндлинга свидетельствует о латерализованной вторичной генерализации судорог из стволового фокуса в кору при повторении минимальных аудиогенных судорог у крыс Wistar и WAG/Rij. Таким образом, проведенное исследование указывает на возможность латерализованных эпилептогенных изменений при аудиогенном киндлинге, что может быть использовано для изучения межполушарной асимметрии в условиях патологии ЦНС.

Хотя большинство клиницистов связывают развитие эпилепсии с патологическими процессами, происходящими главным образом в коре, данные, полученные в последнее время с использованием методов нейровизуализации, указывают на важную роль подкорковых структур и корково-подкорковых взаимодействий в патогенезе многих форм эпилепсии, особенно генерализованных (Blumenfeld et al., 2009; Siniatchkin et al., 2011). Аудиогенный

киндлинг может быть одним из экспериментальных подходов к изучению патологической реорганизации корково-подкорковых отношений при эпилептогенезе и возможной роли функциональной межполушарной асимметрии в этих процессах.

***Межполушарные различия в чувствительности к вторичной генерализации судорожной активности из ствола в кору***

Одной из самых удивительных находок нашей работы является обнаружение у крыс Wistar взаимосвязи между латерализацией стволовых судорог (аудиогенного бега) и их способностью к вторичной генерализации в кору. У крыс Wistar эпизоды аудиогенного бега с разной направленностью одинаково регулярно инициируют корковую волну РД, но резко отличаются по способности вызывать эпилептическую активацию коры. У этих крыс клонические судороги лимбического типа и корковый эпилептиформный разряд развиваются значительно реже после правостороннего аудиогенного бега, чем после левостороннего. То есть крысы Wistar, у которых звук вызывает бег вправо (то есть правостороннее стволовое возбуждение), более устойчивы к вторичной генерализации судорог в кору, чем крысы с бегом влево и крысы WAG/Rij с абсансной и аудиогенной эпилепсией. Интересно, что волна РД, другое проявление аудиогенного киндлинга в коре, возникала с одинаковой частотой у всех исследованных крыс, независимо от направления бега и линии.

Сходная длительность и одинаковая частота возникновения лево- и правосторонних побегов в ответ на звук в исследованных популяциях крыс Wistar до начала формирования киндлинга говорят об отсутствии исходных латеральных различий в эпилептической чувствительности стволовых субстратов аудиогенных судорог. Следовательно, найденные нами популяционные отличия в развитии корковых судорог при киндлинге видимо определяются межполушарной асимметрией процесса *вторичной генерализации* судорог из ствола в передний мозг. В ходе аудиогенного киндлинга выделяют два основных этапа, отражающих прогрессивную эпилептизацию мозга. Первый этап определяется распространением эпилептической активности из ствола в лимбические отделы переднего мозга (прежде всего миндалину). Поведенческим выражением этого процесса является изменение фенотипа моторных судорог с переходом от короткого эпизода бега (стволовые судороги)

к бегу с последующим слабым (стадии 1-2) лимбическим клонусом (лимбико-стволовым судорогам). На следующем этапе аудиогенного киндлинга судорожная активность распространяется из лимбических структур в другие отделы переднего мозга (прежде всего, в моторную кору), что определяет усиление лимбических клонических судорог до максимальной интенсивности (стадии 3-5) и полное развитие киндлинга (Simler et al., 1999; Jobe, Browning, 2006).

Наши данные показывают, что крысы Wistar с лево- и правосторонним аудиогенным бегом отличаются только по частоте возникновения ранних лимбических судорог, но не по динамике их последующего усиления при киндлинге. Другими словами, если в коре появлялась судорожная активность, ее дальнейшая интенсификация (до стадии 5) происходила, независимо от латерализации стволовых судорог (направленности аудиогенного бега) у данной особи. Следовательно, у крыс Wistar латеральная асимметрия при формировании аудиогенного киндлинга наблюдалась только на его первом этапе (т.е. при распространении судорог из ствола в кору), но не при последующей генерализации судорог в пределах переднего мозга на поздних этапах киндлинга.

Как показали наши эксперименты, лидирующую роль при аудиогенном киндлинге играет полушарие, ипсилатеральное направлению бега. И тогда более редкое развитие корковых судорог после правостороннего аудиогенного бега означает затрудненную каудо-ростральную генерализацию судорог в правом полушарии. Это может быть связано, например, с нейрохимической асимметрией, многократно описанной у крыс Wistar (Glick, Ross, 1981). Так, у этих крыс активность дофаминергической системы в правом полушарии выше, чем в левом (Thiel, Schwarting, 2001; Sullivan, 2004). Так как в полушарии с повышенным уровнем дофамина скорость формирования киндлинга ниже (Mintz, Herberg, 1986), то такая дофаминовая асимметрия может быть одной из причин повышенной устойчивости правого полушария к киндлинг-эпилептогенезу. Кроме того, у крыс Wistar найдено более высокое содержание ГАМК в черной субстанции правого полушария, по сравнению с левым (Starr, Kilpatrick, 1981). Так как нигральные ГАМКергические механизмы играют ключевую роль в распространении эпилептической активности при киндлинге

(Iadarola, Gale, 1982), в том числе, в генерализации стволовых судорог в кору при аудиогенном киндлинге (Deransart et al., 2001), усиление ГАМКергической передачи в правой SN может определять устойчивость правого полушария крыс Wistar к вторичной генерализации судорог. Поскольку у крыс с генетической абсансной эпилепсией описан конститутивный дефицит нигральных ГАМКергических механизмов (Deransart, Depaulis, 2002), отсутствие латеральной асимметрии и облегченная вторичная генерализация судорог при аудиогенном киндлинге у крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии также может отражать недостаточную активность этих ГАМКергических механизмов.

Повышенная чувствительность левого полушария к АК эпилептогенезу у крыс Wistar напоминает клинические данные о более высокой эпилептогенности этого полушария у людей (Брагина, Доброхотова, 1988; Болдырева и др., 2000; Карлов и др., 1992; Dean et al., 1997; Labar et al., 2001) и более тесных связях ретикулярной формации ствола с корой левого полушария (Брагина, Доброхотова, 1988). Высказывались предположения, что два полушария по-разному контролируют генерализацию судорог в головном мозге (Брагина, Доброхотова, 1988; Карлов и др., 1992), но механизмы этих различий до сих пор остаются неясными. Хотя мы понимаем недопустимость прямой экстраполяции данных, полученных на крысах, на клинические особенности нейропатологии у людей, результаты данной работы могут быть полезны для моделирования межполушарных различий в чувствительности к эпилептогенезу и для поиска эндогенных механизмов контроля чувствительности мозга к эпилептическому возбуждению.

### ***Особенности индивидуальной и популяционной асимметрии аудиогенного киндлинга у крыс WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией***

Сравнение индивидуальной и популяционной асимметрий при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar с аудиогенной эпилепсией и у крыс WAG/Rij с двумя формами (аудиогенной и абсансной) эпилепсией позволило оценить влияние чувствительности к первично генерализованным абсансным судорогам на латерализацию эпилептогенеза при аудиогенном киндлинге.

Идентичные паттерны аудиогенных судорог у крыс Wistar и WAG/Rij предполагают независимое функционирование таламокортикальных сетей,

генерирующих абсансные судороги, и стволовых сетей, управляющих аудиогенными судорогами (глава 1). Однако на модели электрического киндлинга ранее была показана устойчивость крыс с генетической абсанс эпилепсией к вторичной генерализации лимбических судорог (Eskazan et al., 2002). На основании этих данных был сделан вывод об антагонистических отношениях между таламокортикальными и лимбическими судорожными сетями. С другой стороны, у крыс с абсансной эпилепсией была показана более широкая билатеральная активация переднего мозга на ранних стадиях электрического киндлинга миндаины, по сравнению с неэпилептическими крысами (Carcak et al., 2008).

Наши эксперименты показали, что, по сравнению с крысами Wistar, у крыс WAG/Rij с абсансной эпилепсией наблюдаются менее выраженная индивидуальная асимметрия корковых эпилептиформных разрядов и их облегченное развитие при повторных аудиогенных судорогах. Кроме того, у крыс WAG/Rij не было найдено популяционной межполушарной асимметрии в чувствительности к аудиогенному киндлингу, описанной у крыс Wistar.

Слабая латерализация корковых разрядов у крыс WAG/Rij может, с одной стороны, указывать на аномалии межполушарного взаимодействия (легкая билатерализация) у особей, чувствительных к абсансным судорогам. Билатерализация как абсансных (Vergnes et al., 1989), так и корковых судорог, вызванных киндлингом (Kelly et al., 1999), происходит через corpus callosum, главную комиссуру переднего мозга, изменения толщины которой инверсно коррелируют со степенью мозговой асимметрии (Rosen et al., 1989). Крысы с генетической абсанс эпилепсией, в том числе крысы WAG/Rij, демонстрируют структурные аномалии в corpus callosum (Chahboune et al., 2009) и более широкую билатеральную активацию переднего мозга на ранних стадиях амигдаларного киндлинга (Carcak et al., 2008).

С другой стороны, слабо выраженная латеральная асимметрия корковых судорог, развивающихся при аудиогенном киндлинге у крыс WAG/Rij, может отражать менее выраженную латерализацию процесса вторичной генерализации стволовых судорог в кору, чем у крыс Wistar. Так как на ранних стадиях аудиогенного киндлинга корковые судороги у крыс WAG/Rij возникают легче, чем у крыс Wistar, это поднимает вопрос о возможном дефекте у крыс WAG/Rij механизмов, определяющих генерализацию судорог из ствола в передний мозг.



Действительно, у крыс GAERS с генетической абсансной эпилепсией был описан конститутивный дефицит нигральных ГАМКергических механизмов (Deransart, Depaulis, 2002). Так как эти же механизмы участвуют в контроле распространения судорог из ствола в кору при аудиогенном киндлинге (Deransart et al., 2001), этот дефект может определять облегченное и слабо латерализованное развитие эпилептической активности в коре крыс WAG/Rij при аудиогенном киндлинге.

Интересно, что, несмотря на легкое возникновение лимбического клонуса у крыс WAG/Rij, он часто не интенсифицируется в повторных тестах и остается слабым (не превышающим стадий 1-2). Так как интенсификация лимбических судорог в ходе киндлинга определяется распространением эпилептической активности из лимбических отделов в другие структуры переднего мозга, полученные нами данные свидетельствуют об относительной резистентности переднего мозга этих крыс к вторичной судорожной генерализации. Это согласуется с данными о затрудненном развитии электрического киндлинга миндалины и гиппокампа у крыс с генетической абсансной эпилепсией (Eskazan et al., 2002). Результаты, полученные нами на модели аудиогенного киндлинга, показывают, что крысы с абсансной эпилепсией более устойчивы к генерализации судорог *в пределах переднего мозга*, хотя распространение судорог *из ствола в передний мозг* у них может быть даже облегчено. Это позволяет сделать вывод о дисфункции внутри- и межполушарного взаимодействия у крыс WAG/Rij с генетической абсансной эпилепсией.

Таким образом, стабильная индивидуальная асимметрия начального компонента аудиогенных судорог у крыс Wistar и WAG/Rij предполагает латерализованное начало этих судорог на уровне ствола. Более того, асинхронное вторичное вовлечение коры при повторении этих асимметричных ствольных судорог указывает на латерализованный паттерн вторичного распространения судорог из ствола в кору. Учитывая хорошо известное влияние ствола на корковую возбудимость и растущие свидетельства вовлечения ствола в патогенез генерализованной эпилепсии (Blumenfeld et al., 2009; Siniatchkin et al., 2011), можно предположить, что латерализованные клинические черты

некоторых форм генерализованной эпилепсии могут отражать латерализованные кортико-стволовые взаимодействия.

## ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Корково-подкорковые взаимодействия играют важную роль в патогенезе генерализованной эпилепсии (Norden, Blumenfeld, 2002; Meeren et al., 2002; Depaulis, van Luijelaar, 2005), проведенное нами исследование показывает, что аудиогенный киндлинг является ценным экспериментальным подходом к исследованию этих взаимодействий. В данной модели эпилептическая активация переднего мозга и развитие судорог лимбического типа является результатом распространения судорожной активности по восходящим путям из первичного стволового очага возбуждения (Крушинский, 1960; Marescaux et al., 1987; Faingold, 2004; Jobe and Browning, 2006).

Важнейшим преимуществом модели рефлекторной аудиогенной эпилепсии является то, что судороги возникают в ответ на сенсорную стимуляцию и сила такого ответа определяется, с одной стороны, характером внешнего воздействия, а с другой стороны, врожденной предрасположенностью к эпилептическому возбуждению. Наши эксперименты показали, что одинаковая звуковая стимуляция вызывает судороги максимальной интенсивности у крыс КМ с высокой судорожной чувствительностью и судороги минимальной интенсивности у крыс Wistar и WAG/Rij с низкой предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии.

Уникальной особенностью аудиогенных судорог, отличающей их от других видов судорожной активности у экспериментальных животных, является то, что они всегда начинаются с двигательного возбуждения. Мощный короткий бег, развивающийся перед началом интенсивных клонико-тонических судорог у крыс с высокой судорожной чувствительностью, считается формой координированного клонуса конечностей, отражающего гипервозбуждение стволовых двигательных центров (McCown et al. 1984; Simler et al., 1999; Faingold, 1999). У крыс с низкой чувствительностью к аудиогенным судорогам звук вызывает слабый судорожный припадок с растянутым во времени двухфазным двигательным возбуждением. Природа первой самой ранней фазы этого возбуждения оставалась неизвестной. Одни авторы рассматривали ее как своеобразный «ложный старт» (Ross, Coleman, 2000), другие как начало эпилептического возбуждения, прерванное эндогенными тормозными механизмами (Крушинский, 1960). Наши эксперименты показали, что самая ранняя фаза аудиогенного приступа имеет конвульсивную природу и связана с

эпилептической активацией нижнего двухолмия. С помощью короткой звуковой стимуляции нам удалось инициировать у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией только эту самую раннюю фазу аудиогенных судорог, представляющую собой минимальный судорожный ответ на звук и связанную с фокальным эпилептическим возбуждением ствола. Оказалось, что при повторном вызове таких минимальных стволых судорог может формироваться киндлинг.

Традиционно аудиогенный киндлинг вызывают повторением аудиогенных судорог максимальной интенсивности с тонико-клоническими судорогами (Marescaux et al., 1987; Naritoku et al., 1992; Garcia-Cairasco et al., 1997). Мы впервые показали, что повторение аудиогенных судорог минимальной интенсивности (то есть фокальных стволых судорог) может вести к формированию аудиогенного киндлинга с появлением в коре эпилептиформных разрядов, а в составе приступа дополнительных судорог лимбического типа. В отличие от быстрого и регулярного развития аудиогенного киндлинга при повторении интенсивных судорог у крыс КМ, формирование киндлинга при повторном вызове минимальных аудиогенных судорог происходит медленнее и определяется индивидуальной чувствительностью крыс к эпилептогенезу. Описано три типа такой чувствительности: (1) высокая чувствительность к киндлингу с развитием интенсивных лимбических судорог при повторной стимуляции, (2) резистентность к аудиогенному киндлингу и (3) исчезновение судорожного ответа на повторное звуковое раздражение (то есть развитие устойчивости к аудиогенным судорогам). Такие различия в чувствительности к эпилептогенезу у экспериментальных животных хорошо моделируют клиническую ситуацию, где наблюдается высокая вариабельность в течении заболевания - от быстрой ремиссии у одних пациентов до прогрессивного учащения и утяжеления повторных приступов у других (Blume, 2006а).

В наших экспериментах впервые показано участие эндоканнабиноидной сигнализации в механизмах резистентности к киндлинг-эпилептогенезу и лимбическим судорогам. Блокирование эндоканнабиноидных рецепторов приводит к немедленному появлению лимбического клонуса у киндлинг-резистентных крыс Wistar, а однократная стимуляция этих рецепторов на

ранней стадии аудиогенного киндлинга замедляет его формирование у крыс КМ.

Нейрофармакологическое исследование аудиогенных судорог у крыс со сформированным киндлингом показало, что они являются удобной экспериментальной моделью для изучения роли разных медиаторных и модуляторных систем в патогенезе судорог разного типа, а также для тестирования активности новых антиэпилептических препаратов. Аудиогенные судороги, развивающиеся у крыс со сформированным аудиогенным киндлингом, состоят из нескольких четко различающихся по своему фенотипу моторных компонентов, генерируемых эпилептическими сетями ствола и переднего мозга. Проведенный нами анализ влияния препаратов, блокирующих деградацию ГАМК (вигабатрин) и гистамина (метоприн), на эти судороги показал, что общее повышение уровня ГАМК в мозге селективно ослабляет судороги, генерируемые переднемозговыми сетями, тогда как активация гистаминергической системы оказывает избирательное влияние на стволовые компоненты аудиогенного приступа. Антиконвульсивный препарат леветирацетам (Кеппра), связывающийся с белком синаптических везикул SV2A, эффективно подавляет развитие всех типов судорог и оказывает длительное антиэпилептогенное действие, замедляя развитие аудиогенного киндлинга у крыс КМ при однократном введении на ранних стадиях эпилептогенеза.

Электрографическое исследование аудиогенного киндлинга показало, что самым ранним и самым регулярным ответом коры на ее постепенную эпилептизацию при повторном вызове стволовых аудиогенных судорог является волна РД. На крысах WAG/Rij с двумя формами эпилепсии показано, что возникновение РД определяет паттерн постиктальной абсансной активности. Как и при фармакологическом (PTZ) киндлинге (Королева и др., 1993), при аудиогенном киндлинге корковая волна РД начинает возникать при повторных эпилептогенных воздействиях раньше, чем в новой коре развивается выраженная судорожная активность. Это предполагает чрезвычайно низкий порог синаптической инициации корковой РД и ее облегченное возникновение на ранних стадиях эпилептогенеза. Но, в отличие от фармакологического киндлинга, при котором РД возникает в коре обоих полушарий, минимальные

аудиогенные судороги регулярно вызывают *одностороннюю* волну РД. Это указывает на существование различий в динамике вторичной патологической активации коры двух полушарий при аудиогенном киндлинге.

Аудиогенные судороги традиционно используются как модель первично генерализованной эпилепсии с тонико-клоническими судорогами, для которой характерна широкая билатеральная активация сетей головного мозга. Одностороннее возникновение волны РД при повторных минимальных аудиогенных судорогах у крыс Wistar и WAG/Rij заставило нас более подробно изучить симметрию рефлекторных аудиогенных судорог и вызванного их повторением киндлинга. Обнаруженная нами стойкая индивидуальная асимметрия аудиогенного бега и ранних электрографических признаков вторичной эпилептической активации коры (волны РД и эпилептиформного разряда) при аудиогенном киндлинге указывает на асимметричное возбуждение эпилептических сетей ствола и переднего мозга при повторных минимальных аудиогенных судорогах. Тесная связь между моторной асимметрией ствольных судорог и электрографической асимметрией вторичной активации коры указывает на латерализованный характер распространения судорожной активности из ствола в кору больших полушарий при аудиогенном киндлинге. Полученные данные представляют собой первое экспериментальное свидетельство латерализованной вторичной генерализации эпилептической активности в кору при повторных аудиогенных судорогах.

Сравнение динамики развития аудиогенного киндлинга у крыс с доминированием левого и правого полушария при повторных аудиогенных судорогах показало повышенную уязвимость левого полушария к хроническому эпилептогенезу у крыс Wistar. Это напоминает клинические данные о более высокой эпилептогенности левого полушария у людей (Брагина, Доброхотова, 1988; Болдырева и др., 2000; Карлов и др., 1992; Dean et al., 1997; Labar et al., 2001), что позволило высказать предположение о большей реактивности этого полушария на патологические изменения, развивающиеся в головном мозге (Брагина, Доброхотова, 1988; Карлов и др., 1992; Болдырева и др., 2000). Результаты нашего исследования на модели аудиогенного киндлинга являются первым свидетельством существования различий в чувствительности к эпилептогенезу левого и правого полушарий у экспериментальных животных.

Хотя понятна недопустимость прямой экстраполяции данных, полученных на крысах, на клинические особенности эпилепсии у людей, результаты нашей работы могут быть полезны для экспериментального изучения механизмов межполушарных различий в реактивности головного мозга на патологические воздействия, а также поиска эндогенных механизмов контроля чувствительности мозга к эпилептическому возбуждению.

Таким образом, проведенное исследование показало, что повторный вызов минимальных аудиогенных судорог (фокальных стволовых судорог) может приводить к вторичной эпилептической активации переднего мозга с развитием в коре волны РД и эпилептиформных разрядов, то есть формированию киндлинга. Вторичная генерализация судорог из ствола в кору при аудиогенном киндлинге находится под контролем эндоканнабиноидной системы. Наши эксперименты показали стойкую индивидуальную асимметрию моторных проявлений минимальных аудиогенных стволовых судорог и первых электрографических проявлений эпилептической активации коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij, а также повышенную уязвимость левого полушария крыс Wistar к вторичной генерализации судорожной активности.

## ГЛАВА 5. ВЫВОДЫ

1. Короткая звуковая стимуляция инициирует у крыс Wistar и WAG/Rij с аудиогенной эпилепсией эпизод двигательного возбуждения - минимальные моторные судороги стволового типа, не вызывающие эпилептической активации коры больших полушарий. Эти минимальные судороги представляют собой однонаправленный бег и являются самой ранней фазой аудиогенного приступа, отражающей начальное эпилептическое возбуждение стволовых отделов мозга.
2. Повторение минимальных аудиогенных судорог может приводить к формированию киндлинга, то есть появлению вторичных эпилептических очагов в структурах переднего мозга, синаптически связанных с первичным стволовым фокусом. При этом наблюдается усложнение судорожного ответа на звук за счет появления после окончания стволовых судорог (аудиогенного бега) признаков эпилептической активации лимбической системы (лимбических клонических судорог).
3. Среди крыс Wistar и WAG/Rij выделены субпопуляции животных, чувствительных и резистентных к развитию лимбического клонуса при повторении минимальных аудиогенных судорог, что указывает на существование значительных внутрилинейных различий в предрасположенности к киндлингу.
4. Эндоканнабиноидная система вовлечена в механизмы резистентности к киндлингу: блокирование эндоканнабиноидных рецепторов (CB1) ведет к стремительному формированию аудиогенного киндлинга у резистентных крыс Wistar, а фармакологическая стимуляция этой системы замедляет киндлинг у крыс Крушинского-Молодкиной с высокой чувствительностью к аудиогенным судорогам.
5. Нейрофармакологический анализ аудиогенных судорог у крыс разных генетических линий показал, что гистаминергическая система активно участвует в регуляции стволовых компонентов аудиогенного припадка, тогда как ГАМКергические механизмы избирательно модулируют переднемозговые компоненты аудиогенного приступа, развивающиеся в ходе киндлинга.
6. Антиэпилептический препарат леветирацетам (Кеппра) оказывает длительное тормозное (антиэпилептогенное) влияние на формирование аудиогенного



киндлинга и вторичную генерализацию судорожной активности в головном мозге.

7. Анализ электрической активности коры при повторных минимальных аудиогенных судорогах у крыс Wistar и WAG/Rij показал, что развитие лимбических клонических судорог в ходе киндлинга сопровождается появлением в коре низкочастотного (1-4 Гц) эпилептиформного разряда.

8. Анализ сверхмедленных сдвигов потенциала коры при аудиогенном киндлинге у крыс Wistar и WAG/Rij показал, что волна распространяющейся депрессии (РД) является регулярной реакцией коры на повторные минимальные аудиогенные судороги. При этом корковая РД возникает, как у чувствительных, так и у резистентных к аудиогенному киндлингу животных, то есть независимо от развития в новой коре эпилептиформной активности.

9. У крыс WAG/Rij с двумя формами эпилепсии (абсансной и аудиогенной) возникновение волны РД при аудиогенных судорогах определяет развитие постиктальной депрессии абсансной судорожной активности.

10. Стойкая индивидуальная моторная асимметрия является характерной чертой минимальных стволовых аудиогенных судорог (двигательного возбуждения) при их повторном вызове у крыс Wistar и WAG/Rij. На популяционном уровне не обнаружено асимметрии этих аудиогенных судорог.

11. Вторичная патологическая активация коры больших полушарий, развивающаяся при повторении асимметричного судорожного бега, также сначала имеет асимметричный характер: эпилептиформный разряд и волна РД раньше появляются в коре одного полушария (всегда ипсилатерального направлению аудиогенного бега).

12. Тесная взаимосвязь ранних асимметричных проявлений первичных стволовых судорог (направленности аудиогенного бега) и вторичной активации коры (латерализации первых односторонних волн РД и эпилептических разрядов) при аудиогенном киндлинге свидетельствует о существовании межполушарной асимметрии в скорости вторичной генерализации судорожной активности из ствола в передний мозг.

13. У крыс Wistar левое полушарие более уязвимо к эпилептогенезу: в этом полушарии легче протекает вторичная генерализация судорог из ствола в новую кору при аудиогенном киндлинге.

## Список литературы

Акуличев А.В., Иванова Н.В., Семихина А.Ф., Рысков А.П. Дифференциальная экспрессия гена c-fos в клетках мозга крыс с аудиогенной эпилепсией. Докл. АН СССР 1990 (312) 23-27.

Барыкина Н.Н., Чугуй В.Ф., Прокудина О.И., Плюснина И.З., Колпаков В.Г. Подтверждение генетического родства между маятникообразными движениями, аудиогенной эпилепсией, каталепсией и «нервностью» у крыс. Генетика 2007 (43) 987-993.

Батуев А.С., Брагина Т.А., Александров А.С., Рябинская Е.А. Аудиогенная эпилепсия: морфофункциональный анализ. Журн. высш. нервн. деят. 1997 (47) 431-438.

Болдырева Г.Н., Шарова Е.В., Добронравова И.С. Роль регуляторных структур мозга в формировании ЭЭГ человека. Физиология человека 2000 (25) 19-34.

Брагина Н.Н., Доброхотова Т.А. Функциональные асимметрии человека. М., 1988.

Ватаев С.И. Влияние многократных аудиогенных судорожных припадков на организацию сна у крыс. Росс.физиол.журнал 2005 (91) 740-750.

Ватаев С.И. Феномен сниженной судорожной готовности у крыс Крушинского-Молодкиной после множественных аудиогенных припадков. Росс.физиол.журнал 2007 (92) 967-974.

Васильева В.М. Изменение электрической активности коркового отдела двигательного анализатора у белых крыс во время рефлекторного эпилептиформного припака. Бюлл.эксп.биол.и мед. 1957 (44) 57-61.

Виноградова О.С. Гиппокамп и память. М., Наука, 1975, 333 с.

Гусельникова К.Г. Некоторые данные о механизме эпилептиформного звукового припака у крыс. Научн.докл.высш.школы. Биол.науки. 1959 (4) 69-75.

Зорина З.А., Флесс Д.А. О происхождении тормозной фазы в аудиогенной эпилепсии. Научн.докл.высш.школы. Биол. Науки. 1968 (9) 34-39.

Карлов В.А., Гнездицкий В.В. Абсансная эпилепсия у детей и взрослых. 2005, М. Издательский дом «Пресссервис», 63 с.

Карлов В.А., Селицкий Г.В., Свидерская Н.Е. Триггерная роль левого полушария головного мозга в генерализации эпилептической активности. Журн.невропатол.псиатр. 1992 (92) 49-57.

Ким К.Х., Зайцев А.В., Лаврентьева В.В., Жабко Е.П., Ватаева С.И., Лукомская Н.Я., Магазаник Л.Г. Влияние антагониста ионотропных глутаматных рецепторов на вызванные пентилентетразолом судороги у крыс Крушинского-Молодкиной. Физиол.журн. 2012 (98) 1520-1529.

Королева В.И., Горелова Н.А., Виноградова Л.В. Депрессия Лео в структурах головного мозга. М.: Наука, 1993. 144 с.

Косачева У.С., Кудрин В.С., Федотова И.Б., Семиохина А.Ф., Раевский К.С. Влияние карбамазепина на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс с аудиогенной эпилепсией. Эксп.клин.фармакология 1998 (61) 25-27.

Котляр Б.И. О локализации клонических судорог эпилептического припадка. Научн. докл. высшей школы. Биол. науки. 1959 (2) 73.

Крушинский Л.В. Новое в изучении экспериментальной эпилепсии и физиологических механизмов, лежащих в ее основе. Успехи соврем.биологии 1949 (28) 108-133.

Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М.: Из-во МГУ, 1960, 265 с.

Крушинский Л.В., Коржов В.А., Молокина Л.Н. Влияние электрошока на патологические состояния, вызванные звуковым раздражителем у крыс. ЖВНД 1958 (8) 95-102.

Кузнецова Г.Д. Аудиогенные судороги у крыс разных генетических линий. ЖВНД. 1998 (48) 143-151.

Маликова Л.А., Федотова И.В., Полетаева И.И., Раевский К.С. Антиконвульсивное влияние леветирацетама на аудиогенные судорожные припадки у крыс Крушинского-Молодкиной. Эксп.клин.фармакол. 2007 (70) 3-5.

Молодкина Л.Н. Физиологический анализ экспериментального двигательного невроза, получаемого методом звуковых раздражений. Автореф.дисс. канд.биол.наук. М.: МГУ, 1956, 24 стр.

Оганесян Г.А., Ватаев С.И. Влияние генерализованных припадков на структуру суточного цикла бодрствование-сон и ЭЭГ крыс с наследственной предрасположенностью к аудиогенным судорогам. Физиол.журнвл им. И.М.Сеченова 1995 (81) 1-8.

Орловский Г.Н. Электрическая активность в стволе мозга и нисходящих путях при управляемой локомоции. Физиол. журн. СССР 1969 (55) 437-444.

Прокопец И.М. Физиологический анализ экспериментального эпилептического состояния, вызванного звуковым стимулом. Москва: МГУ. 1958. 256 с.

Раевский К.С., Башкатова В.Г., Кудрин В.С., Маликова Л.А., Косачева Е.С., Вицкова Г.Ю., Семиохина А.Ф., Федотова И.Б. Содержание нейромедиаторных аминокислот и продуктов перекисного окисления липидов в мозге крыс, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам. Нейрохимия 1995 (12) 47-55.

Рябинская У.А., Коротун С.Ю. Влияние систематической экспозиции к звуку на уровень судорожной готовности у крыс линии КМ. Бюлл.эксп.биол.мед. 1983 (96) 10-12.

Семиохина А.Ф. Электрофизиологическое исследование слухового и двигательного анализаторов на модели экспериментального двигательного невроза ЖВНД 1958 (8) 278-284.

Семиохина А.Ф. О корково-подкорковых взаимоотношениях при распространяющейся депрессии неокортекса. ЖВНД 1969 (19) 143-148.

Семиохина А.Ф., Цурита П. Электрофизиологическое исследование запредельного торможения на модели аудиогенной эпилепсии. Физиол. Фурн. СССР 1974 (9) 695-701.

Семиохина А.Ф., Федотова И.Б., Полетаева И.И. Крысы линии Крушинского-Молодкиной: исследования аудиогенной эпилепсии, сосудистой патологии и поведения. ЖВНД 2006 (56) 298-316.

Семиохина А.Ф., Рфтькин А.Э., Федотова И.Б., Кузнецова Л.М., Костына З.А., Сотская М.Р., Чебыкина Л.И. Модель аудиогенной эпилепсии – крысы линии Крушинского-Молодкиной. Доказательство генетической однородности. ЖВНД 1996 (46) 592-596.

Семьянов А.В., Моренков Э.Д., Калеменин С.В., Ярошенко В.П., Годухин О.В. Повышение порога развития эпилептиформной активности в поле СА1 срезов гиппокампа крыс линии Крушинского-Молодкиной как адаптивный защитный механизм. Росс.физиол.журн. 1998 (84) 450- 458.

Федотова И.Б., Семиохина А.Ф. Аудиогенная эпилепсия и миоклонус в онтогенезе крыс линии КМ. ЖВНД 2002 (52) 261-265.

Федотова И.Б., Сурина Н.М., Маликова Л.А., Раевский К.С., Полетаева И.И. Исследование изменений мышечного тонуса (каталепсии), наступающих у крыс после аудиогенного судорожного припадка. ЖВНД 2008 (58) 620-627.

Шандра А.А., Годлевский Л.С., Семенюк Н.Д. Формирование генерализованной судорожной активности у мышей при ежедневном введении коразола в подпороговых дозах. Бюлл.эксп.биол.мед. 1983 (94) 20-22.

Шик М.Л., Северин Ф.В., Орловский Г.Н. Структуры мозгового ствола, ответственные за вызванную локомоцию. Физиол. журн. СССР 1967 (53) 1126-1132.

Шубина Л.В., Кичигина В.Ф. Протекторное влияние агониста СВ1-рецепторов WIN 55.212-2 при развитии судорожной активности в мозге на моделях височной эпилепсии *in vivo*. ЖВНД 2011 (61) 94-101.

Шубина Л.В., Кичигина В.Ф. Эндогенная каннабиноидная система мозга: роль в регуляции судорожной активности. Успехи физиологических наук 2012 (43) 21-37.

Aguglia U, Gambardella A, Qartarone A, Girlanda P, Le Piane E, Messina D, Oliveri RL, Zappia M, Quattrone A. Interhemispheric threshold differences in idiopathic generalized epilepsies with versive or circling seizures determined with focal magnetic transcranial stimulation. *Epilepsy Res.* 2000 (40) 1-6.

Akcali D., Sayin A., Sara Y., Bolay H. Does single cortical spreading depression elicit pain behavior in freely moving rats? *Cephalgia* 2010 (30) 1195-1206.

Aker RG, Yananli HR, Gurbanova AA, Ozkayanakci AE, van Luijtelaar G, Onat FY Amygdala kindling in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Epilepsia* 2006 (47) 33-40.

Alger B.E. Endocannabinoids and their implication for epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2004 (4) 169-173.

Alger B.E. Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J. Physiol.* 2012 (590) 2203-2212.

Arabia A.-M., Shen P.-J., Gundlach A.L. Increased striatal proenkephalin mRNA subsequent to production of spreading depression in rat cerebral cortex: activation of corticostriatal pathways? *Molec.Brain Res.* 1998 (61) 195-202.

Araujo B.H.S., Torres L.B., Cossa A.C., Naffah-Mazzacoratti M.G., Cavalheiro E.A. Hippocampal expression and distribution of CB1 receptors in the Amazonian rodent *Proechimys*: An animal model of resistance to epilepsy. *Brain Res.* 2010 (1335) 35-40.

Armstrong G.A.B., Rogers C.I., Money T.G.A., Robertson R.M. Suppression of spreading depression-like events in locusts by inhibition of the NO/cGMP/PKG pathway. *J.Neurosci.* 2009 (29) 8225-8235.

Avanzini G, Manganotti P, Meletti S, Moshe SL, Panzica F, Wolf P, Capovilla G. The system epilepsies: a pathophysiological hypothesis. *Epilepsia* 2012 (53) 771-778.

Avoli M, Gloor P Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges in feline generalized penicillin epilepsy. *Exp. Neurol.* 1982 (76) 196-217.

Avoli M., Louvel J., Pumain R., Kohling R. Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Progr. Neurobiol.* 2005 (77) 166-200.

Bagri A, Sandner G, Di Scala G. Effects of unilateral microinjections of GABAergic drugs into the inferior colliculus on auditory evoked potentials and on audiogenic seizure susceptibility. *Exp. Neurol.* 1989 (104) 82-87.

Bagri A., Sandner G., Di Scala G. Aversive effects elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus in normal and audiogenic seizure susceptible rats. *Neurosci. Lett.* 2005 (379) 180-184.

Batini C., Teillet M.-A., Naquet R., Le Douarin N.M. Brain chimeras in birds: Application to the study of a genetic form of reflex epilepsy. *TINS* 1996 (19) 246-252.

Ben-Ari Y. Seizures Beget Seizures. *Epilepsia* 2005 (46, S8) 1–5.

Ben-Menachem E. Mechanism of action of vigabatrin: correcting misperception. *Acta Neurol. Scan.* 2011 (192S) 5-15.

Berger M., Speckman E.-J., Pape H.C., Gorji A. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. *Cephalalgia* 2008 (28) 558-562.

Bernasconi R, Klein M, Martin P, Christen P, Hafner T, Portet C, Schmutz M. Gamma-vinyl GABA: comparison of neurochemical and anticonvulsant effects in mice. *J. Neural. Transm.* 1988 (72) 213-233.

Bertram E.H. Why does surgery fail to cure limbic epilepsy? Seizure functional anatomy may hold the answer. *Epilepsy Res.* 2003 (56) 93-99.

Bhaskaran M.D., Smith B.N. Cannabinoid-mediated inhibition of recurrent excitatory circuitry in the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *PLoS ONE* 2010 (5) e10683.

Bidaut-Russell M., Devane W.A., Howlett A.C. Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J. Neurochem.* 1990 (55) 21-26.

Blume W.T. Hemispheric epilepsy. *Brain* 1998 (121) 1937-1949.

Blume W.T. Focal and generalized: both here and there. *Epilepsy Curr.* 2010 (10) 115-117.

Blume W.T. The progression of epilepsy. *Epilepsia* 2006a (47 S1) 71-78.

Blume W.T. Systems and network in tonic seizures and epilepsies in humans. In: *Generalized Seizures: From Clinical Phenomenology to Understanding System and Networks* (Hirsch E, Andermann F, Chauvel P, Engel J, Lopes da Silva F, Luders H, eds), 2006b, pp. 53-67. Montrouge: John Libbey Eurotext.

Blume WT, Young GB, Lemieux JF. EEG morphology of partial epileptic seizures *EEG Clin Neurophys.* 1984 (57) 295-302.

Blumenfeld H, Varghese GI, Purcaro MJ, Motelow JE, Enev M, McNally KA, Levin AR, Hirsch LJ, Tikofsky R, Zubal IG, Paige AL, Spencer SS Cortical and subcortical networks in human secondarily generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 2009 (132) 999-1012.

Boido D, Farisello P, Cesca F, Ferrea E, Valtorna F, Benfenati F, Baldeli P. Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam. *Neuroscience* 2010 (171) 268-283.

Booker JG. Dailey JW, Jobe PC, Lnet JD. Cerebral cortical GABA and benzodiazepine binding sites in genetically seizure prone rats. *Life Sci.* 1986 (39) 799-806.

Bouwman BM, van Rijn CM. Effects of levetiracetam on spike and wave discharges in WAG/Rij rats. *Seizure* 2004 (13) 591-594.

Bowyer SM, Aurora SK, Moran JE, Tepley N, Welch KMA. Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann Neurol.* 2001 (50) 582-587.

Braakman H.M.H., Van Oostenbrugge R.J., Van Kranen-Mastenbroek V.H.J.M., De Krom M.C.T.F.M.. Rimonabant induces partial seizures in a patient with a history of generalized epilepsy *Epilepsia* 2009 (50) 2171–2172.

Bragin A., Wilson C.L., Engel J. Increased afterdischarge threshold during kindling in epileptic rats. *Exp.Brain Res.* 2002 (144) 30-37.

Brennan, T.J., Seeley, W.W., Kilgard, M. Sound-induced seizures in serotonin 5-HT<sub>2c</sub> receptor mutant mice. *Nature Genet.* 1997 (16) 387-390.

Browning R.A. Neuroanatomical localization of structures responsible for seizures in the GEPR: lesion studies. *Life Sci.* 1986 (39) 857-867.



Browning RA, Nelson DK, Mogharreban N, Jobe PC, Laird HE Effect of midbrain and pontine tegmental lesions on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 1985 (26) 175-183.

Browning RA, Wade DR, Marcinczyk M, Long GL, Jobe PC Regional brain abnormalities in norepinephrine uptake and dopamine beta-hydroxylase activity in the genetically epilepsy-prone rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989 (249) 229-235.

Browning R.A., Wang C., Nelson D.K., Jobe P.C. Effect of precollicular transection on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Exp. Neurol.* 1999 (155) 295-301.

Browning R.A. Anatomy of generalized convulsive seizures. In: Malafosse A., Genten P., Hirsch E., Marescaux C., Broglin D., Bernasconi R., eds. *Idiopathic Generalized Epilepsies: Clinical, Experimental and Genetic Aspects*. London, Libbey. 1994. P. 399-413.

Bures J., Buresova O., Krivanek J. The mechanism and applications of Leao's spreading depression of EEG activity N.Y.: Academic Press. 1974.

Burchfiel JL, Applegate CD Stepwise progression of kindling: perspectives from the kindling antagonism model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1989 (13) 289-299.

Buzsaki G, Kennedy B, Solt VB, Ziegler M Noradrenergic control of thalamic oscillation: the role of alpha-2 receptors. *Eur. J. Neurosci.* 1991 (3) 222-229.

Cannals S., Makarova I., Lopez-Aguado L., Largo C., Ibarz J.M., Herreras O. Longitudinal depolarization gradients along the somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: a novel feature of spreading depression. *J. Neurophysiol.* 2005 (94) 943-951.

Carcak N, Ferrandon A, Koning E, Aker RG, Ozdemir O, Onat FY, Nehlig A Effect of stage 2 kindling on local cerebral blood flow rates in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* 2008 (50) 33-43.

Causabon L, PohlmannEden B, Khosrovani H, Carsen PL, Wennberg R. Video-EEG evidence of lateralized clinical features in primary generalized epilepsy with tonic-clonic seizures. *Epileptic Disord.* 2003 (5) 149-156.

Chahboune H, Mishra AM, DeSalvo MN, Staib LH, Purcaro M, Scheinost D, Papademetris X, Fyson SJ, Lorincz ML, Crunelli V, Hyder F, Blumenfeld H DTI abnormalities in anterior corpus callosum of rats with spike-wave epilepsy. *Neuroimage* 2009 (47) 459-466.

Chakravarty D.N., Faingold C.L. Increased responsiveness and failure of habituation in neurons of the external nucleus of inferior colliculus associated with audiogenic seizures of the genetically epilepsy-prone rat. *Exp. Neurol.* 1986 (141) 280-286.

Chen K., Neu A., Howard A.L., Foldy C., Echegoyen J., Hilgenberg L., Smith M., Mackie K., Soltesz I. Prevention of plasticity of endocannabinoid signaling inhibits persistent limbic hyperexcitability caused by developmental seizures. *J. Neurosci.* 2007 (27) 46-58.

Citraro R, Russo E, Ngomba RT, Nicoletti F, Scicchitano F, Whalley BJ, Calignano A, De Sarro G. CB1 agonists, locally applied to the cortico-thalamic circuit of rats with genetic absence epilepsy, reduced epileptic manifestations. *Epilepsy Res.* 2013 (106) 74-82.

Clough RW, Eells JB, Browning RA, Jobe PC. Seizures and proto-oncogene expression of *fos* in the brain of adult genetically epilepsy-prone rats. *Exp.Neurol.* 1997 (146) 341-353.

Coenen A.M.L., Drinkenburg W.H.I.M., Inoue M., Van Luijtelaar E.L.J.M. Genetic models of absence epilepsy with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Res.* 1992 (12) 75-86.

Coenen AML, van Luijtelaar ELJM. Genetic animal models of absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav. Genet.* 2003 (33) 635-655.

Coffey LL, Reith MEA, Chen N, Mishra PK, Jobe PC Amygdala kindling of forebrain seizures and the occurrence of brainstem seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 1996 (37) 188-197.

Coppola G., Pierelli F., Schoenen J. Is the cerebral cortex hyperexcitable or hyperresponsive in migraine? *Cephalalgia* 2007 (27) 1429-1439.

Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progr. Neurobiol.* 1998 (55) 27-57.

Dean A, Solomon G, Harden C, Papakostas G, Labar D. Left-hemisphere dominance of epileptiform discharges. *Epilepsia* 1997 (38) 503-505.

Debler E.A., Lipovac M.N., Lajtha A., Zlokovic B.V., Jacobson A.E., Rice K.C., de Costa B., Reith M.E.A. Metaphit, an isothiocyanate analog of PCP, induced audiogenic seizure in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1989 (165) 155-159.

Dedeurwaerdere S, Boon P, De Smedt T, Claeys P, Raedt R, Bosman T, Van Hese P, Van Maele G, Vonck K. Chronic levetiracetam treatment early in life decreases epileptiform events in young GAERS, but does not prevent the expression of spike and wave discharges during adulthood. *Seizure* 2005 (14) 403-411.

de Paula H.M.G., Hoshino K. Correlation between the fighting rates of REM sleep-deprived rats and susceptibility to the "wild running" of audiogenic seizures. *Brain Res.* 2002 (926) 80—85.

de Paula H.M.G., Hoshino K., Potentiation of panic-like behaviors of the rat by subconvulsive doses of strichnine. *Physiol Behav* 2004 (80) 459-464.

Depaulis A., van Luijtellar G. Genetic models of absence epilepsy in the rat. In: Models of Seizures and Epilepsy (Eds. A.Pitkanen, P. Shchwartzkroin, S. Moshe) 2005, pp. 233-247.

Deshpande LS, Blair RE, Ziobro JM, Sombati S, Martin BR, DeLorenzo RJ. Endocannabinoids block status epilepticus in cultured hippocampal neurons. *Eur.J.Pharmacol.* 2007 (558) 52-59.

Deransart C, Depaulis A. The control of seizures by the basal ganglia? A review of experimental data. *Epileptic Disord* 2002 (4) S61-S72.

Deransart C., Le-Pham B.-T., Hirsch E., Marescaux C., Depaulis A. Inhibition of substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: evidence for seizures specificity of the nigral control. *Neuroscience* 2001 (105) 203-211.

Doretto MC, Burger R, Mishra PK, Garcia-Cairasco N, Dailey JW, Jobe PC. A microdialysis study of amino acid concentration in the extracellular fluid of the substatia nigra of freely behaving GEPR-9s: relationships to seizure predisposition. *Epilepsy Res.* 1994 (17) 157-165.

Doretto V.C., Cortes-de-Oliveira J.A., Rosetti F., Garcia-Cairasco N. Role of the superior colliculus in the expression of acute and kindled audiogenic seizures in Wistar audiogenic rats. *Epilepsia* 2009 (50) 2563-2574.

Dreier J.P. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature Medicine* 2011 (17) 439-447.

Dreier J.P., Woitzik J., Fabricius M., et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depression. *Brain* 2006 (129) 3224-3237.

Duch S.D., Bowers S.W., Nichol, C.A. Elevation of brain histamine levels by diaminopyrimidine inhibitors of histamine N-methyl-transferase. *Biochem. Pharmacol.* 1978 (27) 1507-1509.

Ebert U, Wlaz P. Loscher W. High susceptibility of the anterior and posterior cortex to induction of convulsions by bicuculline. *Eur.J.Neurosci.* 2000 (12) 4195-4205.

Echegoyen J., Armstrong C., Morgan R.J., Soltesz I. Single application of a CB1 receptor antagonist rapidly following head injury prevents long-term hyperexcitability in a rat model. *Epilepsy Res.* 2009 (85) 123-127

Eells JB, Clough RW, Browning R.A, Jobe PC. Comparative Fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience* 2004 (123) 279-292.

Engel J. Can we replace the terms “focal” and “generalized”? In: *Generalized Seizures: From Clinical Phenomenology to Understanding System and Networks* (Hirsch E, Andermann F, Chauvel P, Engel J, Lopes da Silva F, Luders H, eds), 2006, pp. 305-325. Montrouge: John Libbey Eurotext.

Engel JJ, Wolfson I, Brown L. Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid kindling. *Ann. Neurol.* 1978 (3) 538-544.

Eskazan E, Onat FY, Aker R, Oner G Resistance to propagation of amygdaloid kindling seizures in rats with genetic absence epilepsy. *Epilepsia* 2002 (43) 1115-1119.

Evans MS, Viola-McCabe KE, Caspary DM, Faingold CL. Loss of synaptic inhibition during repetitive stimulation in genetically epilepsy-prone rats (GEPR) *Epilepsy Res.* 1994 (18) 97-105.

Fabricius M., Fuhr S., Willumsen L., Dreier J.P., et al., Association of seizures with cortical spreading depression and peri-infarct depolarizations in the acutely injured human brain. *Clin. Neurophysiol.* 2008 (119) 1973-1984.

Faingold C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rat. *Adv. Neurol.* 1999 (79) 311-321.

Faingold, C.L. Role of GABA abnormalities in the inferior colliculus pathophysiology – audiogenic seizures. *Hear. Res.* 2002 (168) 223-237.

Faingold, C.L. Emergent properties of CNS neuronal networks as targets for pharmacology: application to anticonvulsant drug action. *Prog. Neurobiol.* 2004 (72) 55-85.

Faingold CL, Randall ME. Pontine reticular formation neurons exhibit a premature and precipitous increase in acoustic responses prior to audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Brain Res.* 1995 (704) 218-226.

Faingold CL, Randall ME. Neurons in the deep layers of superior colliculus play a critical role in the neuronal network for audiogenic seizures: mechanisms for production of wild running behavior. *Brain Res.* 1999 (815) 250-258.

Faingold CL, Marcinczyk MJ, Casebeer DJ, Randall ME, Arneric SP, Browning RA. GABA in the inferior colliculus plays a critical role in control of audiogenic seizures. *Brain Res.* 1994 (640) 40-47.

Faingold CL, Gehlbach G, Caspary DM. Decreased effectiveness of GABA-mediated inhibition in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. *Exp. Neurol.* 1986 (93) 145-159.

Faingold CL., N’Gouermo P., Riaz A. Ethanol and neurotransmitter interactions – from molecular to integrative effects. *Prog. Neurobiol.* 1998 (55) 509-535.

Falenski K.W., Carter D.S., Harrison A.J., Martin B.R., Blair R.E. DeLorenzo R.J. Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB1 receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 2009 (1262) 64-72.

Feng H.J., Faingold C.L. Modulation of audiogenic seizures by histamine and adenosine receptors in the inferior colliculus. *Exp.Neurol.* 2000 (163) 264-270.

Feng H-J, Faingold CL. Repeated generalized audiogenic seizures induce plastic changes on acoustically evoked neuronal firing in the amygdala. *Brain Res.* 2002a (932) 61-69.

Feng H-J, Faingold CL. Synaptic plasticity in the pathway from the medial geniculate body to the lateral amygdala is induced by seizure repetition. *Brain Res.* 2002b (946) 198-205.

Feng H.-J., Naritoku DK, Randall ME, Faingold CL. Modulation of audiogenically kindled seizures by  $\gamma$ -aminobutyric acid-related mechanisms in the amygdala. *Exp.Neurol.* 2001 (182) 477-481.

Fifkova E., Syka J. Relationship between cortical and striatal spreading depression in rat, *Exp. Neurol.* 1964 (9) 355-366.

French J. Refractory epilepsy: one size does not fit all. *Epilepsy Curr.* 2006 (6) 177-180.

Friedman D, French JA. Effects of intermittent levetiracetam dosing in a patient with refractory daily seizures. *Neurology* 2006 (66) 590-591.

Frings M., Frings H. Audiogenic seizures in the laboratory mouse. *J.Mammal.* 1952 (33) 1.

Frye GD, McCown TJ, Breese GR Differential sensitivity of ethanol withdrawal signs in the rat to gamma-aminobutyric acid (GABA) mimetics: blockade of audiogenic seizures but not forelimb tremor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1983 (226) 720-725.

Fuks B, Gillard M, Michel Ph, Lynch B, Vertongen P, Leprince P, Klitgaard H, Chatelain P. Localization and proaffinity labelling of the levetiracetam binding site in rat brain and certain cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 2003 (478) 11-19.

Futamachi KJ, Mutani R, Prince DA. Potassium activity in rabbit cortex. *Brain Res.* 1974 (75) 5-25.

Gale K, Iadarola MJ. Seizure protection and increased nerve-termina GABA:delayed effects of GABA transaminase inhibition. *Science* 1980 (208) 288-291.

Galvis-Alonso OY, Cortes de Oliveira JA, Garcia-Cairasco N Limbic epileptogenity, cell loss and axonal reorganization induced by audiogenic and amygdala kindling in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Neuroscience* 2004 (125) 787-802.

Garcia-Cairasco N., Terra V.C., Doretto M.C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. *Behav. Brain Res.* 1993 (58) 57-67.

Garcia-Cairasco N., Wakamatsu H., Oliveira J.A.C., Gomes E.L.T., Del Bel E.A., Mello L.E.A.M. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res.* 1996 (26) 177-192.

Garcia-Cairasco N., Rosetti F., Oliveira J.A.C., de Furtado M. Neuroethological study of status epilepticus induced by systemic pilocarpine in Wistar audiogenic rats (WAR strain). *Epilepsy and Behavior* 2004 (5) 455-463.

Garcia-Cairasco N A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. *Hear. Res.* 2002 (168) 208-222.

Garcia-Rill E. The basal ganglia and the locomotor regions. *Brain Res.* 1986 (396) 47-63.

Gastaut H, Aguglia U, Tinuper P. Benign versive or circling epilepsy with bilateral 3-cps spike-and-wave discharges in late childhood. *Ann Neurol* 1986 (19) 301-303.

Gellman RL, Kalianos JA, McNamara JO. Alpha-2 receptors mediate an endogeneous noradrenergic suppression of kindling development. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1987 (241) 891-898.

Gillard M, Fuks B, Michel P, Vertongen P, Massingham R, Chatelain P. Binding characteristics of [3H]ucb 30889 to levetiracetam binding sites in rat brain. *Eur.J.Pharmacol.* 2003 (478) 1-9.

Glick SD, Ross DA. Lateralization of function in the rat brain. *Trends Neurosci* 1981 (4) 196-199.

Glien M, Brandt C, Potschka H, Loscher W. Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2002 (43) 350-357.

Gloor P., Fariello R.G. Generalized epilepsy: some of its cellular mechanisms differ from those of focal epilepsy, *Trends Neurosci.* 1988 (11) 63-68.

Gloor P., Pellegrini A., Kostopoulos G.K.. Effects of change in cortical excitability upon the epileptic bursts in generalized penicillin epilepsy of the cat. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1979 (46) 274-289.

Goadsby P.J. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2007 (13) 39-44.

Goddard G. The kindling model of epilepsy. *TINS.* 1983. 275-279.

Goddard G., McIntyre D., Leech C. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 1969 (25) 295-330.

Goffin K., Van Paesschen W., Van Laere, K. In vivo activation of endocannabinoid system in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain* 2011 (134) 1033-1040.

Gorji A., Speckmann E.-J. Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur.J.Neurosci.* 2004 (19) 3371-3374.

Gower AJ, Noyer M, Verloes R, Gobert J, Wulfert E. Ucb L059, a novel anti-convulsant drug: pharmacological profile in animals. *Eur. J. Neurosci.* 1992 (22) 193-203.

Gower AJ, Hirsch E, Boehrer A, Noyer M, Marescaux C. Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 1995 (22) 207-213.

Grafstein B. Mechanism of spreading cortical depression. 1956 (19) 154-171.

Gu J, Lynch BA, Anderson D, Klitgaard H, Lu S, Elashoff M, Ebert U, Potschka H, Loscher W. The antiepileptic drug levetiracetam selectively modifies kindling-induced alterations in gene expression in the temporal lobe of rats. *Eur. J.Neurosci.* 2004 (19) 334-345.

Guggenhuber S., Monory K., Lutz B., Klugmann M. AAV vector-mediated overexpression of CB1 cannabinoid receptor in pyramidal neurons of the hippocampus protects against seizure-induced excitotoxicity. *Plos ONE* 2010 (5) e15707 (1-8).

Hablitz J.J., Heinemann U.. Alterations in the microenvironment during spreading depression associated with epileptiform activity in the immature neocortex. *Dev. Brain Res.* 1989 (46) 243-252.

Hadjikhani N., del Rio M.S., Wu O. et al.. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *PNAS* 2001 (98) 4687-4692.

Hanaya R., Koning E., Ferrandon A., Nehlig A. The role of the inherited genetic background on the consequences of lithium-pilocarpine status epilepticus: study in genetic absence epilepsy rats from Strasbourg and Wistar audiogenic rats. *Neurobiology of Disease* 2008 (31) 451-458.

Harada C., Hirai T., Fujii Y., Harusawa S., Kurihara T., Kamei C. Intracerebroventricular administration of histamine H3 receptor antagonists decreases seizures in rat models of epilepsy. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004 (26) 263-270.

Hayashi M. Neuropathology of the limbic system and brainstem in West syndrome. *Brain Dev.* 2001 (23) 516-522.

Henry K.R. Audiogenic seizure susceptibility induced in C57BL-6J mice by prior auditory exposure. *Science* 1967 (158) 938-940.

Herreras O., Somjen G.G. Propagation of spreading depression among dendrites and somata of the same cell population, *Brain Res.* 1993 (610) 276-282.

Herreras O., Largo C., Ibarz J.M., Somjen G.G., Martin del Rio R. Role of neuronal synchronizing mechanisms in the propagation of spreading depression in the in vivo hippocampus. *J. Neurosci.* 1994 (14) 7087-7098.

Hirsch E., Danover L., Simler S., Pereira de Vasconcelos A., Maton B., Nehlig A., Marescaux C., Vergnes M. The amygdale is critical for seizure propagation from brainstem to forebrain. *Neuroscience.* 1997 (77) 975-984.

Hofmann M.E., Frazier C.J. Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* 2011 (244) 43-50.

Holland KD, McKeon AC, Canney DJ, Covey DF, Ferrendelli JA. Relative anticonvulsant effects of GABA mimetic and GABA modulatory agents. *Epilepsia* 1992 (33) 981-986.

Holmes G.L., McKeever M., Adamson M. Absence seizures in children: clinical and electroencephalographic features. *Ann. Neurol.* 1987 (21) 268-273.

Hough L.B., Khandelwal J.K., Green J.P. Inhibition of brain histamine metabolism by metoprine. *Biochem. Pharmacol.* 1986 (35) 307-310.

Hunter B.E., Boast C.A., Walker D.W., Zornetzer S.F. Alcohol withdrawal syndrome in rats: neural and behavioral correlates. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1973 (1) 719-725.

Iadarola MJ, Gale K. Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science* 1982 (218) 1237-1240.



Iida K, Sas M, Serikawa T, Noda A, Ishihara K, Akimitsu T, Hanaya R, Arita K, Kurisu K. Induction of convulsive seizures by acoustic priming in a new genetically defined model of epilepsy (Noda epileptic rat: NER). *Epilepsy Res.* 1998 (30) 115-126.

Iinuma K, Yokoyama H, Ootuki T, Yanai K, Watanabe T, Ido T, Itoh M. Histamine H1 receptors in complex partial seizure. *Lancet* 1993 (341) 238.

Inagaki N., Toda K., Taniuchi I., Panula P., Yamatodai A., Toyama M., Watanabe T., Wada H. An analysis of histaminergic efferents of the tuberomammillary nucleus to the medial preoptic area and inferior colliculus of the rats. *Exp. Brain Res.* 1990 (80) 374-380.

Ishida Y., Nakahara D., Hashiguchi H., Nacamura M., Ebihara K., Takeda R., Nishimori T., Niki H. Fos expression in GABAergic cells and cells immunopositive for NMDA receptors in the inferior and superior colliculi following audiogenic seizures in rats. *Synapse* 2002 (46) 100-107.

Ishikawa T., Takechi K., Rahman MA., Ago J., Matsumoto N., Murakami A., Kamei C. Influences of histamine H1 receptor antagonists on maximal electroshock seizure in infant rat. *Biol Pharm Bull* 2007 (30) 477-480.

Ishimoto, T., Omori, N., Mutoh, F., Chiba, S. Convulsive seizures induced by N-methyl-D-aspartate microinjection into the mesencephalic reticular formation in rats. *Brain Res.* 2000 (881) 152-158.

Itoh Y., Oishi R., Nishibori M., Saeki, K. Characterization of histamine release from the rat hypothalamus as measured by in vivo microdialysis. *J. Neurochem.* 1991 (56) 769-774.

Ji-qun C, Ishihara K, Nagayama T, Serikawa T, Sasa M. Long-lasting antiepileptic effects of levetiracetam against epileptic seizures in the spontaneously epileptic rat (SER): differentiation of levetiracetam from conventional antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2005 (46) 1362-1370.

Jobe PC, Browning RA. Mammalian models of genetic epilepsy characterized by sensory-evoked seizures and generalized seizure susceptibility. In Pitkanen A, Schwartzkroin PA, Moshe SL (eds.) *Models of seizures and epilepsy*, 2006a, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 261-271.

Jobe PC, Browning RA From brainstem to forebrain in generalized animal models of seizures and epilepsies. In: *Generalized Seizures: From Clinical Phenomenology to Understanding System and Networks* (Hirsch E, Andermann F, Chauvel P, Engel J, Lopes da Silva F, Luders H, eds), 2006b, pp. 33-52. Montrouge: John Libbey Eurotext.

Jobe PC, Dailey JW. Genetically epilepsy-prone rats (GEPRs) in drug research. *CNS Drug Rev.* 2000 (6) 241-260.

Jobe PC, Picchioni AL, Chin L. Role of brain norepinephrine in audiogenic seizures in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1973 (184) 1-10.

Jung MJ, Lippert B, Metcalf BW, Bohlen P, Schechter PJ. Gamma-Vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice. *J Neurochem.* 1977 (29) 797-802.

Kalichman MW, Burnham WM, Livingston KE. Pharmacological investigation of gamma-aminobutyric acid (GABA) and fully developed generalized seizures in the amygdala-kindled rat. *Neuropharmacology* 1982 (21) 127-131.

Kamei, C. Involvement of central histamine in amygdaloid kindled seizures in rats. *Behav. Brain Res.* 2001 (124) 243-250.

Kamei C., Ishizawa K., Kakinoku H., Fukunaga M. Histaminergic mechanisms in amygdaloid-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res* 1998 (30) 187-194.

Kaminski RM, Gillard M, Leclercq K, Hanon E, Lorent G, Dassel D, Matagne A, Klitgaard H. Proepileptic phenotype of SV2A-deficient mice is associated with reduced anticonvulsant efficacy of levetiracetam. *Epilepsis* 2009 (50) 1729-1740.

Karlocai MR, Toth K., Watanabe M., Ledent C., Juhász G., Freund TF, Maglóczy Z. Redistribution of CB1 cannabinoid receptors in the acute and chronic phases of pilocarpine-induced epilepsy. *PloS* 2011 (6) e27196

Kasteleijn-Nolst Trenite DG, Marescaux C, Stodieck S et al., Photosensitive epilepsy: a model to study the effects of antiepileptic drugs. Evaluation of piracetam analogue, levetiracetam. *Epilepsy Res.* 1996 (25) 225-230.

Katona, I., Freund, T.F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Ann. Rev. Neurosci.* 2012 (35) 529-58.

Katona I., Rancz EA, Acsády L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci.* 2001 (21) 95056-9518.

Kelly J.B., Masterton B. Auditory sensitivity of the albino rat. *J. Compar. Physiol. Psychol.* 1977 (91) 930-936.

Kelly M.E., Battye R.A., McIntyre D.C. Cortical spreading depression reversibly disrupts convulsive motor seizure expression in amygdala-kindled rats. *Neuroscience* 1999 (91) 305-313.

Kiesmann M., Marescaux C., Vergnes M., Micheletti G., Depaulis A., Warter J.M. Audiogenic seizures in Wistar rats before and after repeated auditory stimuli: clinical, pharmacological and electroencephalographic studies. *J.Neural.Transm.* 1988 (72) 235-244.

Kimura A., Donishi T., Sakoda T., Hazama M., Tamai Y. Auditory thalamic nuclei projections to the temporal cortex of the rat. *Neuroscience* 2003 (117) 1003-1016.

Klemm WR Physiological and behavioral significance of hippocampal rhythmic slow activity (theta rhythm). *Prog.Neurobiol.* 1976 (6) 23-47.

Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wulfert E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 1998 (353) 191-206.

Kohling R., Koch U.R., Hagemann G., et al. Differential sensitivity to induction of spreading depression by partial disinhibition in chronically epileptic human and rat as compared to native rat neocortical tissue. *Brain Res.* 2003 (975) 129-134.

Kokaia Z., Gido G., Ringstedt T., Bengson J., Kokaia M., Siesjo B.K., Persson H., Lindvall O. Rapid increase of BDNF mRNA levels in cortical neurons following spreading depression: regulation by glutamatergic mechanisms independent of seizure activity. *Mol.Brain Res.* 1993 (19) 277-286.

Kolb B., Tees R.C. *The cerebral cortex of the rat.* 1990, MIT Press, Cambridge.

Koroleva V.I., Bures J. Cortical penicillin focus as a generation of spike-triggered waves of spreading depression in rats. *Exp. Brain. Res.* 1983 (51) 291-297.

Koroleva V.I., Vinogradova L.V., Bures J. Reduced incidence of cortical spreading depression in the course of pentylenetetrazol kindling in rats. *Brain Res.* 1993 (608) 107-114.

Kohsaka S, Mizukami S, Kohsaka M, Shiraiishi H, Kobayashi K. Widespread activation of the brainstem preceding the recruiting rhythm in human epilepsies. *Neuroscience* 2002 (115) 697-706.

Kramis R, Vanderwolf CH, Bland BH. Two types of hippocampal rhythmical slow activity in both the rabbit and the rat: relations to behavior and effects of atropine, diethyl ether, urethane and pentobarbital. *Exp Neurol.* 1975 (49) 58-85.

Kutrz BSW, Lehman J, Garlick P, Amberg J, Mishra PK, Dailey JW, Weber R, Jobe PC. Penetrance and expressivity of genes involved in the development of epilepsy in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *J. Neurogenet.* 2001 (15) 233-244.

Labar D, Dilone L, Solomon G, Harden C. Epileptogenesis: left or right hemisphere dominance? Preliminary findings in a hospital-based population. *Seizure* 2001 (10) 570-572.

Lado F.A., Moshe S.L. Role of subcortical structures in the pathogenesis of infantile spasms: what are possible subcortical mediators? *Int.Rev. Neurobiol.* 2002 (49) 115-140.

Lado F.A., Moshe S.L. How do seizures stop? *Epilepsia* 2008 (49) 1651-1664.

Lambert G.A., Zagami A.S. The mode of action of migraine triggers: a hypothesis. *Headache* 2009 (49) 253-275.

Lannes B, Vergnes M, Marescaux C, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM, Kempf E Lesions of noradrenergic neurons in rats with spontaneous generalized non-convulsive epilepsy. *Epilepsy Res.* 1991 (9) 79-85.

Lauritzen M. Cortical spreading depression as a putative migraine mechanism. *Trends Neurosci.* 1987 (10) 8-13.

Leao A.A.P. Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 1944 (7) 359-390.

Leao A.A.P., Morrison R.S. Propagation of spreading cortical depression. *J Neurophysiol.* 1945 (8) 33-45.

LeDoux J.E., Ruggiero D.A., Reis D.J. Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1985 (242) 182-213.

Lin J.S., Hou Y., Sakai K., Jouvét M. Histaminergic descending input to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J. Neurosci.* 1996 (16) 1523-1537.

Liu Z, Seiler N, Marescaux C, Depaulis A, Vergnes M. Potentiation of  $\gamma$ -vinyl GABA (vigabatrin) effects by glycine. *Eur.J.Pharmacol.* 1990 (182) 109-115.

Loscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2002 (50) 105-123.

Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 2011 (20) 359-368.

Loscher W, Honack D. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in models of partial and generalized epilepsy in mice and rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1993 (232) 147-58.

Loscher W, Cramer S, Ebert U Differences in kindling development in seven outbred and inbred rat strains. *Exp.Neurol.* 1998a (154) 551-559.

Loscher W, Honack D, Rundfeldt C. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant levetiracetam (ucb L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1998b (284) 474-479.

Loscher W, Honak D, Gramer M. Effect of depth electrode implantation with or without subsequent kindling on GABA turnover in various rat brain regions. *Epilepsy Res.* 1999 (37) 95-108.

Loscher W, Jackel R, Muller F. Anticonvulsant and proconvulsant effects of inhibitors of GABA degradation in the amygdala-kindling model. *Eur.J.Pharmacol.* 1989 (163) 1-14.

Ludanyi, A., Eross, L., Czirjak, S., Vaida, J., Halasz, P., Watanabe, M., Palkowits, M., Magloczky, Z., Freund, T.F., Katona, I. Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J. Neurosci.* 2008 (28) 2976-2990.

Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 (101) 9861-9866.

Ludvig N, Moshe S. Cyclic AMP derivatives injected into the inferior colliculus induce audiogenic seizure-like phenomena in normal rats. *Brain Res.* 1987 (437) 193-196.

Ludvig N, Moshe S. Different behavioral and electrographic effects of acoustic stimulation and dibutiril cyclic AMP injection into the inferior colliculus in normal and in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsy Res.* 1989 (3) 185-190.

Luhman H.J., Mittman T., Van Luijtelaaar G., Heinemann U. Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res.* 1995 (22) 43-51.

Lutz, B. On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem. Pharmacol.* 2004 (68) 1691-1698.

Macedo CE, Angst M-J, Guiberteau T, Brasse D, O'Brien TJ, Sander G. Acoustic hypersensitivity in adult rats after neonatal ventral hippocampus lesions. *Behav. Brain Res.* 2010 (207) 161-168.

Main, A., Dowson, A., Gross, M. Photophobia and phonophobia in migraineurs between attacks. *Headache* 1997 (37) 492-495.

Malmierca MS, Merchán M. Auditory system. In: *The Rat Nervous System* (Paxinos G, ed), 2004, pp. 997-1082. San Diego: Elsevier Academic Press.

Manning J.P., Richards D.A., Leresche N., Crunelli V., Bowery N.G. Cortical area-specific block of genetically determined absence seizures by ethosuximide. *Neuroscience* 2004 (123) 5-9.

Marescaux C, Vergnes M, Kiesmann M, Depaulis A, Micheletti G, Varter GM. Kindling of audiogenic seizures in Wistar rats: an EEG study. *Exp. Neurol.* 1987 (97) 160-168.

Marshall W.H. Spreading cortical depression of Leao. *Physiol.Rev.* 1959 (39) 239-279.

Marsiano G, Goodenough S, Monory K. et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defence against excitotoxicity. *Science* 2003 (302)84-88.

Mason C.R., Cooper R.M. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentyleneterazol. *Epilepsia* 1972 (13) 663-674.

Maxon SC, Cowen JS. Electroencephalographic correlates of the audiogenic seizure response of inbred mice. *Physiology & Behavior* 1976 (16) 623-629.

McCown T.J., Greenwood R.S., Frye G.D., Breese G.R. Electrically elicited seizures from the inferior colliculus: a potential site for the genesis of epilepsy? *Exp. Neurol.* 1984 (86) 527-542.

McCown TJ, Greenwood RS, Breese GR. Inferior collicular interactions with limbic seizure activity. *Epilepsia* 1987 (28) 234-241.

McCown TJ, Edgar PP, Schwartz RD, Breese GR Unilateral kindling of the inferior collicular cortex does not transfer to the contralateral seizure sensitive site or alter [3H]flunitrazepam and [35S]TBPS binding. *Epilepsy Res* 1991 (9) 132-138.

McCown, T. J., Duncan, G.E., Johnson, K.B., Breese, G.R. Metabolic and functional mapping of the neural network subserving inferior collicular seizure generalization. *Brain Res.* 1995 (701) 117-128.

McCown TJ, Knapp DJ, Crews FT. Inferior collicular seizure generalization produces site-selective cortical induction of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Brain Res* 1997 (767) 370-374.

McIntyre DC, Kelly ME, Dufresne C FAST and SLOW amygdala kindling rat strains: comparison of amygdala, hippocampal, piriform and perirhinal cortex kindling. *Epilepsy Res.* 1999 (35) 197-209.

McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* 2002 (50) 79-92.

McIntyre DC, Giugno L Effect of clonidine on amygdala kindling in normal and 6-hydroxydopamine-pretreated rats. *Exp. Neurol.* 1988 (99) 96-106.

Medvedev A, Mackenzi L, Hiscock JJ, Willoughby JO. Kainic acid induces distinct types of epileptiform discharge with differential involvement of hippocampus and neocortex *Brain Res Bull* 2000 (52) 89-98.

Meeren HKM, Pijn JP, Van Luijckeljaer ELJM, Coenen AML, Lopes da Silva FH. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J.Neurosci.* 2002 (22) 1480-1495.

Merkler D., Klinker F., Jurgens T., Glaser R., Paulus W., Brinkmann B.G., Sereda M.W., Stadelmann-Nessler C., Guedes R.C., Bruck W., Liebetanz D. Propagation of spreading depression inversely correlates with cortical myelin content. *Ann.Neurol.* 2009 (66) 355-365.

Merrill MA, Clough RW, Jobe PC, Browning RA. Role of the superior colliculus and the intercollicular nucleus in brainstem seizure circuitry of the genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia.* 2003 (44) 305-314.

Merrill M., Clough R., Jobe PC., Browning R. Brainstem seizure severity regulates forebrain seizure expression in the audiogenic kindling model. *Epilepsia* 2005 (46) 1380-1388.

Michelucci R, Tassinari CA. Response to vigabatrin in relation to seizure type. *Br.J.Pharmacol.* 1989 (27S) 119S-124S.

Millan MH, Meldrum BS, Faingold CL. Induction of audiogenic seizures susceptibility by focal infusion of excitant amino acid or bicuculline into the inferior colliculus of normal rats. *Exp.Neurol.* 1986 (91) 634-639.

Millan MN, Meldrum BS, Boersma CA, Faingold CL. Excitant amino acids and audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rat. II. Efferent seizure propagating pathway. *Exp. Neurol* 1988 (99) 687-698.

Mintz M, Herberg LJ. Endogeneous dopaminergic asymmetry affects development of seizures kindled in the rat amygdala. *Exp Neurol* 1986 (93) 253-260.

Mody I., Lambert J.D., Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J.Neurophysiol.* 1987 (57) 869-888.

Moeller F., Siebner H.R., Wolff S., Muhle H., Granert O., Jansen O., Stephani U., Siniatchkin M. Mapping brain activity on the verge of electrically induced generalized tonic-clonic seizure. *Epilepsia* 2009 (50) 1632-1637.

Monory K., Massa F., Egertova M., Eder M., Blaudzun H., Westernbroek R., Kelsch W., Jacob W., Marsch R., Ekker M., Long J., Rubenstein J.L., Goebbels S., Nave K.A., Doring M., Klugmann M., Wolfel B., Dodt H.U., Zeiglgansberger W., Wotjak C.T., Mackie K., Elphick M.R., Marsiano G., Lutz B. The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* 2006 (51) 455-466.

Moraes M.F., Galvis-Alonso O.Y., Garcia-Cairasco N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res.* 2000 (39) 251-259.

Moraes MFD, Mishra PK, Jobe PC, Garcia-Cairasco N. An electrographic analysis of the synchronous discharge pattern of GEPR-9s generalized seizures. *Brain Res.* 2005 (1046) 1-9.

Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progr. Neurobiol.* 2004 (73) 1-60.

Moskowitz MA. The neurobiology of vascular pain. *Ann Neurol.* 1984 (16) 157-168.

Moskowitz M.A., Nozaki K., Kraig R.P. Neocortical spreading depression provokes the expression of C-fos protein-like immunoreactivity within the trigeminal nucleus caudalis via trigemino-vascular mechanisms. *J Neurosci.* 1993 (13) 1167-1177.

Mucha R.F., Pinel F.J.. Postseizure inhibition of kindled seizures. *Exp. Neurol.* 1977 (54) 266-282.

Myslobodsky M, Rosen J Hemispheric asymmetry of pentamethyleneterazol-induced wave-spike discharges and motor imbalance in rats. *Epilepsia* 1979a (20)377-386.

Myslobodsky MS, Ackermann RF, Engel Jr. Effects of  $\gamma$ -acetylenic GABA and  $\gamma$ -vinyl GABA on metrzol-activated and kindled seizures. *Pharmacol.Biochem.Behav.*1979b (11) 265-271.

Naritoku D.K., Mecozzi L.B., Aiello M.T., Faingold C.L. Repetition of audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats induces cortical epileptiform activity and additional seizure behaviors. *Exp. Neurol.* 1992 (115) 317-324.

Nedergaard M., Hansen A.J. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res.* 1988 (449) 395-398.

Nehlig A., Vergnes M., Hisch E., Boyet S., Koziel V., Marescaux C. Mapping of cerebral blood flow changes during audiogenic seizures in Wistar rats: effect of kindling. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1995 (2) 259-269.

N'Gouermo P., Faingold C.L. Periaqueductal gray neurons exhibit increased responsiveness associated with audiogenic seizures in the genetically epilepsy-prone rats. *Neuroscience* 1998 (84) 619-625.

N'Gouermo P, Faingold CL. The periaqueductal grey is a critical site in the neuronal network for audiogenic seizures: modulation by GABA(A), NMDA and opioid receptors. *Epilepsy Res.* 1999 (35) 39-46.

N'Gouermo P., Faingold C.L. Phenytoin administration reveals a differential role of pontine reticular formation and periaqueductal gray neurons in generation of the convulsive behaviors of audiogenic seizures. *Brain Res.* 2000 (859) 311-317.



N'Gouemo P, Faingold CL, Morad M. Calcium channel dysfunction in the inferior colliculus neurons of the genetically epilepsy-prone rat. *Neuropharmacology* 12009 (56) 665-675

Neumann P.E., Collins R.L. Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991 (88) 5408-5412.

Noebels JL A single gene error of noradrenergic axon growth synchronizes central neurons. *Nature* 1984 (310) 409-411.

Norden A.D., Blumenfeld H. The role of subcortical structures in human epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 2002 (3) 219-231.

Nozari A., Diekoz E., Sukhotinsky I., Stein T., Eikermann-Haerter K., Liu C., Wang Y., Frosch M.P., Waeber C., Ayata C., Moscovitz M.A. Microemboli may link spreading depression, migraine aura and patent foramen ovale. *Ann.Neurol.* 2010 (67) 221-229.

Obrenovitch T.P., Godukhin O.V., Chazot P.L. Repetitive spreading depression induces nestin protein expression in the cortex of rats and mice. Is this upregulation initiated by N-methyl-d-aspartate receptors? *Neurosci.Lett.* 2002 (320) 161-163.

Onat FY, Eskazan E, Aker R Experimental absence versus amygdaloid kindling. In Corcoran ME, Moshe SL (eds) *Kindling*, Springer, 2005, pp.37-47.

Overstreet LS, Westbrook GL. Paradoxical reduction of synaptic inhibition by vigabatrin. *J.Neurophysiol.* 2001 (86) 596-603.

Pan X, Ideda SR, Lewis DL. SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents by reversal of tonis CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol.Pharmacol.* 1998 (54) 1064-1072.

Panula, P., Pirvia, U., Auvinen, S., Airakisinen, M.S. Histamine-immunoreactive nerve fibers in the rat brain. *Neuroscience* 1989 (28) 585-610.

Passaro D, Rana G, Piscopo M, Viggiano E, de Luca B, Fucci L. Epigenetic chromatin modifications in the cortical spreading depression. *Brain Res.* 2010 (1329) 1-9.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. N.Y.: Academic Press. 1986.

Pierson M. Audiogenic seizures in unilaterally sensitized and monoaurally stimulated Wistar rats. *Epilepsy Res* 1992 (11)17-25.

Pirreda S, Gale K. A crucial epileptogenic site in the deep prepiriform cortex. *Nature* 1985 (317) 623-625.

Pirreda S, Pavlick M, Gale K. Anticonvulsant effects of GABA elevation in the deep prepiriform cortex. *Epilepsy Res.* 1987 (1) 102-106.

Pitkanen A., Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in

symptomatic epilepsy. *Epilepsy and Behavior* 2009 (14, S1) 14-25.

Pomper J.K., Haack S., Petzold G.C., Buchheim K., Gabriel S., Hoffmann U., Heinemann U. Repetitive spreading depression-like events result in cell damage in juvenile hippocampal slice cultures maintained in normoxia. *J.Neurophysiol.* 2006 (95) 355-368.

Post R.M., Putnam F., Contel N.R., Goldman B. Electroconvulsive seizures inhibit amygdala kindling: implications for mechanisms of action in affective illness. *Epilepsia* 1984 (25) 234-239.

Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *EEG a. Clin. Neurophysiol.* 1972 (32) 281-294.

Racine RJ, McIntyre Burnham W, Gartner GC, Levitan D Rates of motor seizure development in rats subjected to electrical brain stimulation: strain and inter-stimulation interval effects. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1973 (35) 553-556.

Racine RJ, Steingart M, McIntyre DC Development of kindling-prone and kindling resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies. *Epilepsy Res.* 1999 (35) 183-195.

Raisinghani M., Faingold CL. Identification of the requisite brain sites in the neuronal network subserving generalized clonic audiogenic seizures. *Brain Res.* 2003 (967) 113-122.

Raisinghani M, Feng HJ, Faingold CL Glutamatergic activation of the amygdala differentially mimics the effects of audiogenic seizure kindling in two substrains of genetically epilepsy-prone rats. *Exp. Neurol.* 2003 (183) 516-522.

Reese NB, Garcia-Rill E, Skinner RD. The pedunculopontine nucleus – auditory input, arousal and pathophysiology. *Progr. Neurobiol.* 1995 (42) 105-133.

Reid KH, Young C, Schurr A, Tseng M, Payne RS, Keelen P., Miller J, Iyer V. Audiogenic seizures following global ischemia induced by chest compression in Long-Evans rats. *Epilepsy Res.* 1996 (23) 195-209.

Reigel C.E., Dailye J.W., Jobe P.C. The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. *Life Sci.* 1986 (39) 763-774.

Rey E, Pons G, Olive G. Vigabatrin –clinical pharmacokinetics. *Clin.Pharmacokinetics* 1992 (23) 267-278.

Ribak CE, Byun MY, Ruiz GT, Reiffenstein RJ. Increased level of amino acid neurotransmitters in the inferior colliculus of the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res.* 1988 (2) 9-13.

Richter F, Bauer R, Lehmenkuhler A, Schaible H-G. Spreading depression in the brainstem of the adult rat: electrophysiological parameters and influences on regional brainstem blood flow. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 2008 (28) 984-994.

Rizzo V, Ferraro G, Carletti F, Lonobile G, Cannizzaro C, Sardo P. Evidences of cannabinoids-induced modulation of paroxysmal events in an experimental model of partial epilepsy in the rat. *Neurosci. Lett.* 2009 (462) 135-139.

Robinson TE, Vanderwolf CH. Electrical stimulation of the brain stem in freely moving rats: II. Effects on hippocampal and neocortical electrical activity and relations to behavior. *Exp. Neurol* 1978 (61) 485-515.

Rodgers-Garlick C.I., Armstrong G.A., Robertson R.M. Metabolic stress modulates motor patterning via AMP-activated protein kinase. *J.Neurosci.* 2011 (31) 3207-3216.

Rogawski MA, Loscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Rev Neurosci.* 2004 (5) 553-564.

Romanova L.G., Zorina Z.A., Korochkin L.I. A genetic, physiological and biochemical investigation of audiogenic seizures in rats. *Behav. Genet.* 1993 (23) 483-489.

Romcy-Pereira RN, Garcia-Cairasco N Hippocampal cell proliferation and epileptogenesis after audiogenic kindling are not accompanied by mossy fiber sprouting of Fluoro-Jade staining. *Neuroscience* 2003 (119) 533-546.

Rosen GD, Sherman GF, Galaburds AM. Interhemispheric connections differ between symmetrical and asymmetrical brain regions. *Neuroscience* 1989 (33) 525-533.

Ross K.C., Coleman J.R. Development and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000 (24) 639-653.

Ross KS, Coleman J.R., Jone L.S. Antiepileptiform effects of audiogenic seizure priming on in vitor kindling in rat hippocampus. *Nurosci. Lett.* 2001 (299) 234-238.  
Routenberg A., Kramis R.C. Hippocampal correlates of aversive midbrain stimulation. *Science* 1968 (160) 1363-1365.

Rundfeldt C, Loscher W. Development of tolerance to the anticonvulsant effect of vigabatrin in amygdala-kindled rats. *Eur.J.Pharmacol.* 1992 (213) 351-366.

Samotaeva I.S., Tillman N., van Luijtelaa G., Vinogradova L.V. Intracortical microinjections may cause spreading depression and suppress absence seizures. *Neuroscience* 2013 (230) 50-55.

Savage DD, Reigel CE, Jobe PC Angular bundle kindling is accelerated in rats with a genetic predisposition to acoustic stimulus-induced seizures. *Brain Res.* 1986 (376) 412-415.

Scarlattelli-Lima A.V., Magalhaes L.H.M., Doretto M.C., Moraes M.F.D. Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenetetrazole and pilocarpine. *Brain Res.* 2003 (960) 184-189.

Scherkl, R., Hashem, A., Freg, H.-H. Histamine in brain – its role in regulation of seizure susceptibility. *Epilepsy Res.* 1991 (10) 111-118.

Semyanov A., Morenkov E., Godukhin O. The decreased susceptibility to the development of in vitro kindling-like state in hippocampal CA1 slices of rats sensitive to audiogenic seizures. *Neurosci. Lett.* 1997 (230) 187-190.

Servit Z. The role of subcortical acoustic centers (colliculi inferiores, laminae quadr.) in seizure susceptibility to an acoustic stimulus and in symptomatology of audiogenic seizures in the rat. *Physiol Bohemoslov* 1960 (9) 42-47.

Shen P.-J., Larm J.A., Gundalch A.L. Expression and plasticity of galanin systems in cortical neurons, oligodendrocyte progenitors and proliferative zones in normal brain and after spreading depression. *Eur.J.Neurosci.* 2003 (18) 1362-1376.

Shin RS, McIntyre DC Differential noradrenergic influence on seizure expression in genetically Fast and Slow kindling rat strains during massed trial stimulation of the amygdala. *Neuropharmacology* 2007 (52) 321-332.

Shin RS, Anisman H, Merali Z, McIntyre DC Amygdala amino acid and monoamine levels in genetically Fast and Slow kindling rat strains during massed amygdala kindling: a microdialysis study. *Eur. J. Neurosci.* 2004 (20) 1-11.

Shin C, Rigsbee LC, McNamara JO. Anti-seizure and anti-epileptogenic effect of  $\gamma$ -vinyl  $\gamma$ -aminobutyric acid in amygdaloid kindling. *Brain Res.* 1986 (398) 370-374.

Shneker B.F., Fountain N.B. *Epilepsy. Disease-a-Month* 2003 (19) 426-278.

Sills GJ, Butler E, Forrest G, Ratnaraj N, Patsalos PN, Bridie MJ. Vigabatrin, but not gabapentin or topiramate, produces concentration-related effects on enzymes and intermediates of the GABA shunt in rat brain and retina. *Epilepsia.* 2003 (44) 886-892.

Simler S., Hirsch E., Danober L., Motte J., Vergnes M., Marescaux C. C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* 1994 (175) 58-62.

Simler S., Vergnes M., Marescaux C. Spatial and temporal relationships between c-fos expression and kindling of audiogenic seizures in Wistar rats. *Exp. Neurol.* 1999 (157) 106-119.

Siniatchkin M, Coropceanu D, Moeller F, Boor R, Stephani U. EEG-fMRI reveals activation of brainstem and thalamus in patients with Lennox-Gastaut syndrome. *Epilepsia* 2011 (52) 766-774.

Sitnikova E, van Luijckelaar ELJM Reduction of adrenergic neurotransmission with clonidine aggravates spike-wave seizures and alters activity in the cortex and the thalamus in WAG/Rij rats. *Brain Res. Bull.* 2005 (64) 533-540.

- Skinner R.D., Garcia-Rill E. The mesencephalic locomotor region (MLR) in the rat. *Brain Res* 1984 (323) 385-389.
- Skradski SL, Clark AM, Jiang H, White HS, Fu YH, Ptacek LJ. A novel gene causing a mendelian audiogenic mouse epilepsy. *Neuron* 2001 (31) 537-544.
- Snodgrass SR. GABA and epilepsy: their complex relationship and the evolution of our understanding. *J. Child. Neurol.* 1992 (7) 77-86.
- Somjen GG Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 2001 (81) 1065-1096.
- Somjen GG, Cheh G. Pathophysiology of the spinal cord studied in vitro. *J. Neurosci. Methods* 1989 (28) 35-46.
- Somjen G.G., Aitken P.G., Czeh G.L., Herreras O., Jing J., Young J.N. Mechanisms of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992 (70) S248-254.
- Spenser S.S. Neural networks in human epilepsy: evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 2002 (43) 219-227.
- Steriade M. Neuronal substrates of sleep and epilepsy, 2003 Cambridge University Press, Cambridge.
- Stevens JR, Phillips I, de Beaurepaire R. Gamma-vinyl-GABA in endopiriform area suppresses kindled amygdala seizures. *Epilepsia* 1988 (29) 404-411.
- Starr MS, Kilpatrick IC. Bilateral asymmetry in brain GABA function. *Neurosci Lett* 1981 (25) 167-172.
- Stratton SC, Large LH, Cox B, Davies G, Hagan RM. Effects of lamotrigine and levetiracetam on seizure development in a rat amygdala kindling model. *Epilepsy Research* 2003 (53) 95-106.
- Strauss U., Kole M.N., Brauer A.U. et al. An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2004 (19) 3048:3058.
- Sturman G., Freeman P., Meade H.M., Seeley N.A. Modulation of the intracellular and H3-histamine receptors and chemically-induced seizures in mice. *Agents Actions* 1994 (41) C68-C69.
- Sullivan RM Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress* 2004 (7) 131-143.
- Syka J. Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function and during learning. *Physiol. Rev.* 2002 (82) 601-636.
- Takano T., Tian G.F., Peng W., Lou N., Lovatt D., Hansen A.J., Kasischke K.A., Nedergaard M. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat. Neurosci.* 2007 (10) 754-762.

Tamura Y., Kataoka Y., Yamada H. Cellular proliferation in the cerebral cortex following neural excitation in rats. *Neurosci.Res.* 2004 (50) 129-133.

Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., et al. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature* 1995 (374) 542-546.

Thiel CM, Schwarting RKW. Dopaminergic lateralization in the forebrain: relations to behavioral asymmetries and anxiety in male Wistar rats. *Neuropsychobiology* 2001 (43) 192-199.

Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998 (83) 393-411.

Tuomisto L., Tacke U. Is histamine an anticonvulsive inhibitory transmitter? *Neuropharmacology* 1986 (25) 955-958.

Tuomisto L., Tacke U., Willman, A. Inhibition of sound-induced convulsions by metoprine in the audiogenic susceptible rats. *Agents Actions* 1987 (20) 252-254.

Tuomisto L., Lozeva V., Valjakka A., Lecklin A. Modifying effects of histamine on circadian rhythms and neuronal excitability. *Behav. Brain Res.* 2001 (124) 129-135.

Tupal S., Faingold C.L. Precipitous induction of audiogenic kindling by activation of adenylyl cyclase in the amygdala. *Epilepsia* 2010a (51) 354-361.

Tupal S., Faingold C.L. Inhibition of adenylyl cyclase in amygdala blocks the effect of audiogenic seizure kindling in genetically epilepsy-prone rats. *Neuropharmacology* 2010b (59) 107-111.

Turski WA, Cavalheiro EA, Calderazzo LS, Kleinrok Z, Czuczwar SJ, Turski L. Injections of picrotoxin and bicuculline into the amygdala complex of the rat: An EEG, behavioral and morphological analysis. *Neuroscience* 1985 (14) 37-53.

Tzounopoulos T. Mechanisms of synaptic plasticity in the dorsal cochlear nucleus: plasticity-induced changes that could underlie tinnitus. *Am J Audiol.* 2008 (17) S170-S175.

Urbach A., Redecker C., Witte O.W. Induction of neurogenesis in the adult dentate gyrus by cortical spreading depression. *Stroke* 2008 (39) 3064-3072.

Valdizan EM, Armijo JA. Relationship between platelet and brain GABA-transaminase inhibition by single and multiple doses of vigabatrin in rats. *Epilepsia* 1991 (32) 735-742.

Valdizan EM, Garcia AP, Armijo JA. Time course of the GABAergic effects of vigabatrin: is the time course of brain GABA related to platelet GABA-transaminase inhibition? *Epilepsia* 1999 (40) 1062-1069.

van Bree L., Zhang F., Schiffmann S.N., Halleux P., Mailleux P., Vanderhaeghen J.-J. Homolateral cerebrocortical changes in neuropeptide and receptor expression after minimal cortical infarction. *Neuroscience* 1995 (69) 847-858.

van Harreveld A., Stamm J.S. Cortical responses to Metrazole and sensory stimulation in the rabbit. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1955 (7) 363-370.

van Harreveld A, Stamm JS, Christensen E. Spreading depression in rabbit, cat and monkey. *Am.J.Physiol.* 1956 (184) 312-320.

van Luijtelaar E.L.J.M., Coenen A.M.L. The WAG/Rij model of generalized absence seizures. *Adv. Epilept.* 1989 (17) 78-83.

Van den Maagdenberg A.M.J.M , Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S. Broos AM, Cesetti T, van de Ven RCG, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ, Fraints RR, Ferrari MD. A Cacna1a knock-in migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 2004 (41) 701-710.

van Rijn C.M., Gaetani S., Santolini I., Badura A., Gabova A., Fu, J., Watanabe M., Cuomo V., van Luijtelaar G., Nicoletti F., Ngomba R.T. WAG/Rij rats show a reduced expression of CB1 receptors in thalamic nuclei and respond to the CB1 receptor agonist, R(+)-WIN55,212-2 with a reduced incidence of spike-wave discharges. *Epilepsia* 2010 (51) 1511-1521.

van Rijn C.M., Perescis M.F.J., Vinogradova L., van Luijtelaar G. The endocannabinoid system protects against cryptogenic seizures. *Pharmacol. Rep.* 2011 (63) 165-168.

van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Boer K, Gorter JA, Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia* 2009 (50) 422-433.

Velazquez JLP, Carlen PL. Gap Junctions, synchrony and seizures. *TINS* 2000 (23) 68-74.

Vergnes M., Kiesmann M., Marescaux C., Depaulis A., Micheletti G., Warter J.M. Kindling of audiogenic seizures in the rat. *Int. J. Neurosci.* 1987 (36) 167-176.

Vergnes M., Marescaux C. Cortical and thalamic lesions in rats with genetic absence epilepsy. *J.Neural. Transm.* 1992 (35) 71-83.

Vergnes M, Marescaux C, Lannes B, Depaulis A, Micheletti G, Warter JM Interhemispheric desynchronization of SWDs by corpus callosum transection in rats with petit mal epilepsy. *Epilepsy Res* 1989 (4) 8-13.

Verma-Ahujja S, Evans MS, Espinosa JA. Evidence of increased excitability in GEPR hippocampus preceding development of seizure susceptibility. *Epilepsy Res.* 1998 (31) 161-173.

Vinogradova, L.V. Audiogenic kindling in Wistar and WAG/Rij rats: kindling-prone and kindling-resistant subpopulations. *Epilepsia* 2008 (49) 1665-1674.

Wada Y., Shiraishi J., Nakamura M., Koshino Y. Biphasic action of the histamine precursor L-histidine in the rat kindling model of epilepsy. *Nurosci. Lett.* 1996 (204) 205-208.

Wallace M.J., Martin B.R., DeLorenzo R.J. Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur. J. Pharmacol.* 2002 (452) 295-301.

Wallace M.J., Blair R.E., Falenski K.W., Martin B.R., DeLorenzo R.J. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003 (307) 129-137.

Ward R (1971) Unilateral susceptibility to audiogenic seizure impaired by contralateral lesions of the inferior colliculus. *Exp. Neurol* 32:313-316.

Ward R, Collins RL Asymmetric audiogenic seizures in mice: a possible analogue of focal epilepsy. *Brain Res.* 1971 (31) 207-210.

Wasterlain C., Morin A., Jonec V. Interactions between chemical and electrical kindling of the rat amygdala. *Brain Res.* 1982 (247) 341-346.

Welch K.M.A., D'Andrea G., Tepley N., et al. The concept of migraine as a state of central neuronal hyper excitability. *Headache* 1990 (8) 817-828.

Wendt H., Soerensen J., Wotjak C.T., Potschka H. Targeting the endocannabinoid system in the amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy in mice. *Epilepsia* 2011 (52) e62-65.

Westmark C.J., Westmark P.R., Malter J.S. Alzheimer's disease and Down syndrome rodent models exhibit audiogenic seizures. *J. Alzheimers Dis.* 2010 (20) 1009-1013.

Wieraszko A., Seyfried TN. Influence of audiogenic seizures on synaptic facilitation in mouse hippocampal slices is mediated by N-methyl-D-aspartate receptor. *Epilepsia* 1993 (34) 979-984.

White H.S., Smith-Yockman M., Srivastava A., Wilcox K.S. Therapeutic assays for the identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In:



Models of seizures and epilepsy (Eds. Pitkenen A., Schawartzkroin P.A., Moshe S.) 2006, p. 539-549.

Whishaw IQ, Vanderwolf CH. Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav. Biol.* 1973 (8) 461-484.

Wolf P. Basic principles of the ILAE syndrome classification. *Epilepsy Res.* 2006 (70 S1) 20-26.

Woods, R.P., Laciboni, M., Mazziota, J.C. Bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *New Engl J Med.* 1994 (331) 1689-1692.

Wu DC, Zhu-Ge ZB, Yu CY, Fang Q, Wang S, Jin CL, Zhang SH, Chen Z. Low-frequency stimulation of the tuberomammillary nucleus facilitates electrical amygdaloid-kindling acquisition in Sprague-Dawley rats. *Neurobiol Dis.* 2008, 32(1)151-156.

Wu Y, Wang W, Richerson GB. Vigabatrin induces tonic inhibition via GABA transporter reversal without increasing vesicular GABA release. *J.Neurophysiol.* 2003 (89) 2021-2034.

Yan HD, Ji-qun C, Ishihara K, Nagayama T, Serikawa T, Sasa M. Separation of antiepileptogenic and antiseizure effects of levetiracetam in the spontaneously epileptic rats (SER). *Epilepsia* 2005 (46) 1170-1177.

Yang L., Long C., Faingold C.L. Audiogenic seizure susceptibility is induced by termination of continuous infusion of  $\gamma$ -aminobutyric acid or an N-methyl-D-aspartic acid antagonist into the inferior colliculus. *Exp. Neurol.* 2001 (171) 147-152.

Yavich L., Hlinen A. Spreading depression in the cortex differently modulates dopamine release in rat mesolimbic and nigrostriatal terminal fields. *Exp.Neurol.* 2005 (196) 47-53.

Yokoyama H., Onodera K., Maeyama K., Yanai K., Imuma K., Tuomisto L., Watanabe T. Histamine levels and clonic convulsions of electrically-induced seizure in mice: the effects of alpha-fluoromethylhistidine and metoprine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1992 (346) 40-45.

Zhao D.Y., Wu X.P., Pei y.Q., Zuo Q.H. Long-term effect of febrile convulsion on seizure susceptibility in P77PMC rat resistant to acoustic stimuli but susceptible to kainate-induced seizure. *Exp.Neurol.* 1985 (88) 688-695.

Zhao Y., Rubio M.E., Tzounopoulos T. Distinct functional and anatomical architecture of the endocannabinoid system in the auditory brainstem. *J. Neurophysiol.* 2009 (101) 2434-2446.