
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ НА ВВЕДЕНИЕ КОНВУЛЬСАНТА
ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА У КРЫС С ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ
МОДЕЛЮ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ**

© 2025 г. М. Р. Субханкулов¹, О. Е. Зубарева^{1, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ZubarevaOE@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2025 г.

После доработки 28.07.2025 г.

Принята к публикации 30.07.2025 г.

Эпилепсия – тяжелое неврологическое заболевание, при этом 30% пациентов резистентны к терапии. Литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии (TLE) у крыс воспроизводит ключевые особенности болезни, однако длительный мониторинг спонтанных судорог трудоемок, что требует поиска дополнительных маркеров эпилептогенеза. В клинике электроэнцефалограмма (ЭЭГ), особенно анализ интериктальных эпилептиформных паттернов, играет ключевую роль в диагностике эпилепсии. Провокационные пробы (депривация сна, фотостимуляция и др.) повышают выявляемость патологических паттернов. В эксперименте аналогичный эффект могут дать низкие дозы конвульсантов, например пентилентетразола (ПТЗ), однако такие методы применяются редко. Цель работы – изучить влияние низких доз ПТЗ на эпилептиформную активность в литий-пилокарпиновой модели TLE у крыс и сравнить этот метод с методом максимального электрошока (МЭШ). Модель TLE индуцировали у самцов крыс Вистар (эксперимент – пилокарпин после LiCl; контроль – физраствор). Через 6 месяцев после развития спонтанных рецидивирующих судорог на поверхности черепа устанавливали ЭЭГ-электроды. Регистрацию ЭЭГ проводили в два этапа: в фоне и после введения ПТЗ (40 мг/кг). Через 3 недели оценивали судорожную готовность с помощью МЭШ. Показано, что при фоновой регистрации ЭЭГ различия между группами отсутствуют. При введении ПТЗ выявлено четкое различие между группами: у контрольных крыс преобладали регулярные всплески высокоамплитудных острых волн (4–8 Гц), у крыс с моделью эпилепсии доминировали одиночные интериктальные спайки и спайк-волны. При этом при проведении теста максимального электрошока контрольные и экспериментальные крысы не различались по пороговым значениям тока, необходимого для экстензии задних конечностей. Таким образом, провокационная проба с применением низких доз ПТЗ представляет собой высокочувствительный метод выявления эпилептиформной активности в модели TLE, превосходящий по информативности МЭШ-тестирование. Полученные результаты подтверждают перспективность данного подхода для доклинических исследований.

Ключевые слова: височная эпилепсия, литий-пилокарпиновая модель, электроэнцефалограмма, эпилептиформная активность, пентилентетразол, провокационные пробы, максимальный электрошок

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия – широко распространенное нервно-психическое заболевание, связанное с развитием спонтанных рецидивирующих судорог (СРС) и коморбидных когнитивных нарушений. Около 30% людей, страдающих эпилепсией, имеют фармако-резистентную форму болезни, что делает актуальным поиск новых лекарственных препаратов и новых методов лечения [1]. При проведении доклинических исследований одной из наиболее часто используемых является литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии (TLE), так как она воспроизводит большинство клинических и невропатологических особенностей височной эпилепсии человека [2]. В частности, в данной модели, как и при человеческой патологии, после индуцирующего события (в модели – введение конвульсанта пилокарпина) сначала имеет место латентный период, когда судороги не проявляются, в дальнейшем, в хронический период модели, у большинства крыс развиваются спонтанные рецидивирующие судороги. Наличие СРС является основным показателем формирования эпилепсии в модели TLE. При этом частота СРС у экспериментальных животных может сильно варьировать – от нескольких припадков в день до одного приступа в неделю. Высокая вариабельность частоты СРС делает ее оценку очень трудоемкой задачей, особенно при выполнении масштабных фармакологических экспериментов, так как требуется проведение много-часовых наблюдений за поведением экспериментальных животных. Сложность оценки частоты СРС делает актуальным поиск дополнительных показателей, которые бы позволяли четко дифференцировать группы контрольных и экспериментальных животных и оценивать тяжесть неврологических нарушений в модели TLE.

В практике золотым стандартом оценки состояния больного эпилепсией является электроэнцефалографическое (ЭЭГ) исследование, при котором особое внимание уделяется анализу эпилептиформных паттернов (ЭП) – спайков и спайк-волн, регистрируемых не только в иктальный, но и в интериктальный период. Интериктальные ЭП – это транзиторные, аномальные нейронные разряды длительностью 40–200 мс, наблюдаемые на записях ЭЭГ в периоды между припадками. Они являются результатом синхронных пароксизмальных деполяризаций нейронов, вызывающих быструю последовательность потенциалов действия [3].

ЭП редко встречаются у здоровых людей (2.2% в популяции), в то время как у больных эпилепсией рутинная ЭЭГ выявляет интериктальную эпилептиформную активность примерно у 50% пациентов при однократной регистрации и у 90% больных при трех записях ЭЭГ [4], поэтому наличие ЭП на ЭЭГ является достаточным основанием для подозрения о наличии эпилепсии. Вероятность обнаружения ЭП на ЭЭГ больных эпилепсией увеличивается при использовании провокационных проб, таких как депривация сна, фотостимуляция и гипервентиляция. Эти методы позволяют усилить процессы возбуждения в мозге и выраженность эпилептиформной активности [5]. С той же целью при работе с животными в экспериментальных моделях может быть использовано введение низких доз конвульсантов, например пентилентетразола (ПТЗ) [6].

Анализ интериктальных ЭП важен не только для постановки диагноза эпилепсии. Предполагается, что интериктальные спайки – особенно частые и/или регистрируемые в гиппокампе (в экспериментальных условиях) – могут оказывать негативное влияние на когнитивные функции, нарушая процессы обучения и памяти (особенно рабочей) в состоянии бодрствования, а также консолидацию памяти во время сна [7, 8].

Оценка интериктальных ЭП проводилась в некоторых фармакологических исследованиях, выполненных с использованием литий-пилокарпиновой модели [9]. При этом ряд исследователей указывают на методическую проблему: в отличие от людей, при фоновой регистрации ЭЭГ у крыс различных линий эпилептиформная активность регистрируется достаточно часто в контрольных группах (без индуцированного эпилептогенеза). В частности, было показано, что 19% интактных самок крыс Sprague-Dawley

в возрасте 2–3 месяцев спонтанно демонстрировали спайк-волновые разряды [10]. В исследовании, ранее проведенном нами на крысах Вистар, было показано, что при фоновой регистрации ЭЭГ в контрольной группе животных встречаются одиночные интериктальные спайки, и их частота лишь незначительно отличается от наблюдаемых у крыс с TLE (литий-пилокарпиновая модель) [10]. С учетом описанной выше клинической практики мы предположили, что использование активирующих методов, в частности введения ПТЗ, позволит надежнее различать группы экспериментальных и контрольных животных в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии. Таким образом, основной целью данного исследования явилось изучение особенностей реакции на введение ПТЗ крыс с литий-пилокарпиновой TLE по поведенческим и ЭЭГ показателям и поиск параметров, позволяющих наилучшим образом дифференцировать экспериментальных и контрольных животных в данной экспериментальной модели. Мы также оценили реактивность тех же контрольных и экспериментальных крыс в модели максимального электрошока (МЭШ) – метода, который широко применяется для оценки порогов судорожной готовности в фармакологических экспериментах [11]. Это исследование было проведено для сравнения эффектов двух использованных провокационных воздействий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и схема эксперимента

Исследование проводилось на 34 самцах крыс линии Wistar (выжило 18). Животные имели свободный доступ к воде и корму, соблюдался 12-часовой цикл дня (8:00–20:00 – день, 20:00–8:00 – ночь). В возрасте 8 недель у крыс индуцировали литий-пилокарпиновую модель TLE. Животным предварительно вводился хлорид лития (LiCl, в/б, 127 мг/кг). Далее через сутки производились инъекции (-)-скопаламин-метилбромида для предотвращения периферических эффектов пилокарпина (в/б, 1 мг/кг). Через час осуществлялись инъекции пилокарпина (в/б, от 20 до 40 мг/кг, дробное введение по 10 мг/кг с временным интервалом 30 мин) до развития судорог 4-й стадии по шкале Racine. Пилокарпин-индуцированный эпилептический статус купировали через 75 мин введением диазепама (10 мг/кг). Если после введения 40 мг/кг пилокарпина у крысы не развивались судороги 4-й стадии и выше, данное животное исключалось из эксперимента. В качестве контрольных животных было выбрано 7 крыс из тех же пометов, что и экспериментальные животные. Контрольным животным производились те же инъекции, однако вместо пилокарпина они получали физиологический раствор (0.9%-ный раствор NaCl). Смертность среди экспериментальных животных составила 60% (выжило 11 из 27), крысы умирали в первую неделю после введения пилокарпина. Для уменьшения гибели экспериментальных крыс кормили влажным кормом и поили водой из пипетки. Основные эксперименты проводились через 6 месяцев после индукции модели.

Сначала в течение 48 ч проводили видеорегистрацию экспериментальных крыс для выявления СРС. Далее проводились операции по установке платформы. Через 5 дней после операции осуществлялась запись ЭЭГ в фоновых условиях и видеорегистрация поведения в течение 1 ч. На следующий день животным вводилось 40 мг/кг антагониста ГАМК_A-рецепторов конвульсанта пентилентетразола (ПТЗ). За 10 мин до введения ПТЗ и в течение часа после осуществлялась запись ЭЭГ и видеорегистрация поведения. Дозы ПТЗ были подобраны по данным литературы [12] и апробированы в предварительном эксперименте как пороговые для индукции слабых судорог у 50–70% интактных животных. Через неделю после введения ПТЗ крыс тестировали в тесте МЭШ.

Методика малоинвазивной операции и беспроводной записи ЭЭГ

В данной работе использовалась оригинальная малоинвазивная методика регистрации ЭЭГ, подробно описанная ранее [13]. Электроды устанавливались на поверхности черепа с помощью специальной платформы, которая закреплялась на мышечках черепа. 4 регистрирующих электрода располагались над сенсомоторными и теменными областями коры, референтный электрод и электрод заземления располагались над обонятельными луковицами. Операции проводились под изофлурановым наркозом. Для беспроводной записи ЭЭГ к платформе присоединялся передатчик, работающий на литий-ионной батарее. Передатчик отправлял сигнал ЭЭГ и акселерометра приемнику через Bluetooth.

Методы обработки ЭЭГ

Очищенная от артефактов запись ЭЭГ была отфильтрована от частот меньше 1 и больше 40 Гц с помощью преобразования Фурье. При обработке мы учитывали только спайки и спайк-волны, одновременно фиксируемые на всех 4 регистрирующих электродах (по типу пароксизмальной активности), поэтому при обработке 4-го канала ЭЭГ усреднялись в общий канал, для которого рассчитывалось среднее и среднеквадратичное отклонение амплитуды. Оценка интериктальной и иктальной активности производилась отдельно, в два этапа. Для иктальной активности рассчитывалась ее длительность и латентный период развития после введения ПТЗ. Перед анализом интериктальной активности из ЭЭГ удалялась иктальная активность. Спайки и спайк-волны (далее спайки) считались вместе как эпилептиформные разряды, резко отличающиеся от фоновой активности по амплитуде и длящиеся от 40 до 200 мс. С помощью программы, разработанной нами на языке программирования Python3, определялись все точки ЭЭГ, которые отличались от среднего значения амплитуды за весь период регистрации более чем на 3 среднеквадратичных отклонения, они отмечались как потенциальные спайки. Далее в программе Spike2 через поиск по шаблону (в качестве эталона выбирался один из спайков на данной ЭЭГ) определялись участки длительностью от 40 до 200 мс, имеющие характерную форму эталонного спайка. Далее осуществлялся визуальный контроль спайков, автоматически обнаруженных программой, и подсчет их количества.

Индукированные введением низких доз ПТЗ комплексы высокоамплитудных острых волн автоматически детектировались по наличию минимум 3 точек на ЭЭГ, отличающихся по амплитуде от среднего значения более чем на 3 среднеквадратичных отклонения и появляющихся во временном промежутке менее 250 мс относительно друг друга. Все автоматически найденные комплексы высокоамплитудных волн контролировались визуально. Далее определялись характеристики этих комплексов (длительность).

Оценка миоклонических вздрагиваний

Подсчет числа ПТЗ-индуцированных миоклонических вздрагиваний осуществлялся вручную по зарегистрированным видеофайлам, по 10-минутным отрезкам. Общее время анализа – 1 ч после введения ПТЗ.

Максимальный электрошок (МЭШ)

Тест МЭШ [14] начинали через неделю после регистрации ЭЭГ. Определяли минимальное значение тока, необходимое для экстензии задних конечностей крысы. Ток подавался через ушные электроды с помощью генератора импульсов ЭСТ Unit 57800 (Ugo Basile, Gemonio, Италия). Использовали токи стимуляции в диапазоне от 12

до 100 мА с интервалами логарифмической шкалы шагом 0.1. Частота стимуляции составляла 150 Гц, общая продолжительность стимула – 0.8 с, а длительность каждого импульса – 0.9 мс. При отсутствии реакции ток увеличивали на 1 шаг (до 50 мА). При наличии реакции ток уменьшали на 1 ступень (до 32 мА). Тесты повторяли каждые 2–3 дня. В результатах указаны пороговые значения тока, которые были необходимы для развития экстензии задних конечностей.

Методы статистического анализа

Статистический анализ был проведен с использованием программ IBM SPSS Statistics 23 (IBM, Armonk, NY, США) и GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, США). Выбросы определялись квартильным методом. Нормальность распределения устанавливалась с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Равенство дисперсий определялось с помощью критерия Фишера. Межгрупповые сравнения проводились с использованием *t*-критерия Стьюдента для несвязанных выборок (при нормальном распределении данных) или U-критерия Манна–Уитни (для ненормально распределенных данных). Динамика частоты спайков после введения ПТЗ и миоклонических вздрагиваний анализировалась с использованием смешанного ANOVA (время × группа), апостериорные попарные сравнения проводились с помощью теста Шидака. Доли контрольных и экспериментальных крыс, у которых после введения ПТЗ развивались сильные судороги, сравнивались с помощью углового преобразования Фишера (критерий ϕ^*). Связь между частотой спайков и частотой миоклонических вздрагиваний оценивалась с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Различия считались значимыми при $p \leq 0.05$. Данные на графиках представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение при параметрической обработке данных либо медианы и межквартильного размаха при использовании непараметрических методов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ спонтанных рецидивирующих судорог

Анализ свободного поведения крыс в течение 40 ч выявил спонтанные судороги у 6 из 11 животных с TLE (54.5%). Частота спонтанных рецидивирующих судорог (CPC) варьировала от 1 до 42 эпизодов за весь период регистрации. Средняя частота CPC у крыс, у которых они были зафиксированы, составила 0.33 эпизода в час. Учитывая значительную вариабельность этого показателя, можно предположить, что при более длительной регистрации CPC могли бы быть выявлены у большего числа животных. Дальнейший анализ показал, что наличие или отсутствие CPC не было связано с достоверными различиями по изученным параметрам. В связи с этим все экспериментальные животные были объединены в единую экспериментальную группу для последующего анализа.

Показатели ЭЭГ при фоновых условиях

При часовой записи фоновой ЭЭГ у всех экспериментальных крыс выявлялись одиночные спайки и спайк-волны (далее – спайки). Отдельные спайки наблюдались и у крыс из контрольной группы, при этом частота спайков значимо не различалась у животных двух групп (контроль – 0.027 ± 0.009 спайков/с; TLE – 0.029 ± 0.004 спайков; $t = 0.23$; $p = 0.82$). Полученные результаты соответствовали данным предыдущих исследований [10] и доказывали необходимость применения провокационных проб для различения групп.

Показатели ЭЭГ после введения пентилентетразола

Характер ответа на введение ПТЗ (40 мг/кг) отличался у контрольных и экспериментальных крыс. Особенностью изменений, наблюдаемых у всех контрольных крыс, было появление большого числа однотипных комплексов высокоамплитудных острых волн (вспышек) с преобладающей частотой в диапазоне θ -ритма (4–7 Гц, рис. 1б). Такие комплексы характерны для введения низких доз ПТЗ, в литературе они описаны как *rythmic metrazol activity* (метразол – старое название ПТЗ). [12]. Такие комплексы наблюдались также у 9 из 11 экспериментальных крыс, но они были более короткими и редкими. В частности, средняя длительность комплексов составляла 1.9 ± 0.3 с у крыс в контрольной группе и 1.3 ± 0.5 с у экспериментальных животных (различия достоверны – $t = 3.57$; $p = 0.003$). В контрольной группе комплексы состояли из большего числа волн по сравнению с экспериментальной группой (соответственно 13.6 ± 1.8 и 9.7 ± 3.4 волн) ($t = 2.71$; $p = 0.017$). В целом за час наблюдения после введения ПТЗ частота этих комплексов была почти в 10 раз выше у крыс контрольной группы по сравнению с экспериментальной ($t = 6.63$; $p = 0.001$; рис. 1а). Следует отметить, что эти изменения на ЭЭГ не сопровождались судорогами на поведенческом уровне.

Особенностью изменений, наблюдаемых после введения ПТЗ у экспериментальных крыс, но не у контрольных животных, было резкое увеличение частоты одиночных спайков (рис. 1с – d; $U = 0$; $p < 0.001$). Дополнительно была проанализирована динамика ответа на введение ПТЗ по показателю частоты спайков 10-минутными интервалами (рис. 1е), первый отрезок соответствовал частоте спайков за 10 мин до введения ПТЗ. Для анализа этих результатов был использован смешанный ANOVA (время X группа). Показано, что на динамику частоты спайков достоверно повлиял фактор времени, фактор группы и их взаимодействие (соответственно $F(2,24, 31,31) = 4.19$, $p = 0.02$; $F(1, 14) = 19$, $p < 0.01$ и $F(2,24, 31,31) = 5.83$, $p < 0.01$). Апостериорные сравнения выявили, что экспериментальная группа отличалась более высокой частотой спайков, по сравнению с контролем, по соответствующим десятиминутным интервалам как до введения ПТЗ, так и после его введения (с 10-й по 60-ю мин). Максимальные межгрупповые различия ($p < 0.01$) выявлялись с 10-й по 40-ю мин. Следует также отметить, что в контрольной группе частота одиночных спайков после введения ПТЗ не отличалась от значений до введения, в то время как в экспериментальной группе она увеличивалась в 2–4 раза ($p < 0.05$; рис 1е).

Миоклонические вздрагивания после введения пентилентетразола

На поведенческом уровне введение ПТЗ вызвало появление миоклонических вздрагиваний у всех контрольных и экспериментальных животных. Общее число миоклонических вздрагиваний было больше у экспериментальной группы ($t = 2.43$, $p = 0.03$, рис. 1ф). Также оценивалась динамика частоты миоклонических вздрагиваний 10-минутными интервалами (рис. 1г), она зависела от фактора группы ($F(1, 15) = 5.46$, $p = 0.03$), однако влияние фактора времени ($F(2,4, 36,44) = 2.18$, $p = 0.12$) и взаимодействие факторов ($F(2,4, 36,44) = 0.35$, $p = 0.75$) были незначимы. Апостериорные сравнения межгрупповых различий не выявили. Латентный период до развития первых миоклонических вздрагиваний был короче у экспериментальной группы ($t = 2.61$, $p = 0.02$, рис. 1h). Миоклонические вздрагивания не были связаны с эпилептиформной активностью на ЭЭГ: не выявлено достоверной корреляции между частотой отдельных спайков и частотой миоклонических вздрагиваний ни в контрольной, ни в экспериментальной группах (соответственно – $r_s = -0.32$; $p = 0.48$ и $r_s = 0.24$; $p = 0.46$).

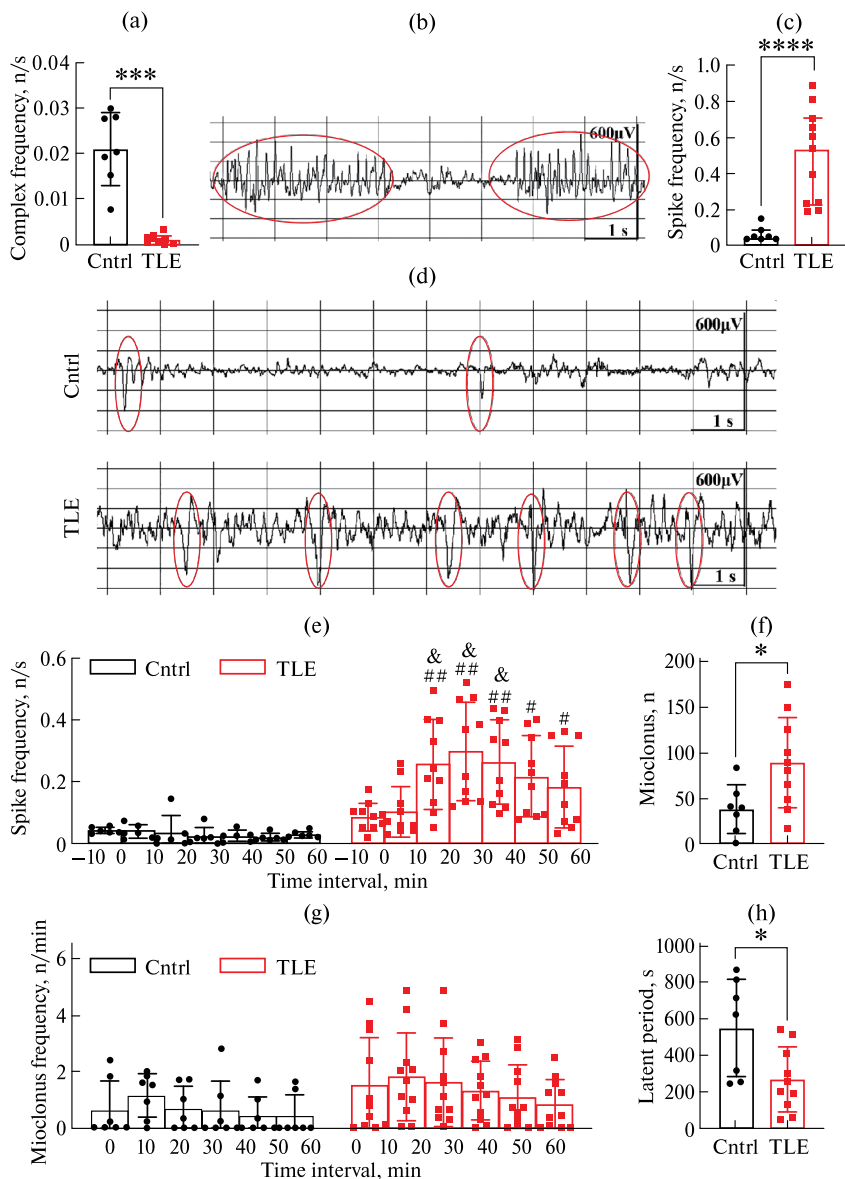


Рис. 1. Показатели ЭЭГ и миоклонические вздрагивания после введения ПТЗ у контрольных и экспериментальных животных. (а) – частота комплексов высокоамплитудных острых волн после введения ПТЗ; (б) – пример комплексов высокоамплитудных острых волн контрольных животных; (с) – частота одиночных спайков после введения ПТЗ; (д) – примеры интериктальных одиночных спайков, регистрируемых после введения ПТЗ у контрольных и TLE животных; (е) – динамика частоты спайков, регистрируемых в течение часа после введения ПТЗ (по 10-минутным интервалам); (ф) – количество миоклонических вздрагиваний за 1 ч наблюдения; (г) – динамика частоты миоклонических вздрагиваний в течение часа после введения ПТЗ; (h) – латентный период до первого миоклонического вздрагивания; Cntrl – контрольная группа, TLE – крысы с TLE. * – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$, **** – $p < 0.0001$ – достоверные межгрупповые различия, U-критерий Манна–Уитни (с) либо t -критерий Стьюдента (а, ф, h); # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$ межгрупповые отличия по соответствующим временным интервалам; & – $p < 0.05$ отличия от собственных значений за 10 мин до введения ПТЗ, апостериорный тест Шидека. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (с) либо среднего и среднеквадратичного отклонения (а, е–h). Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

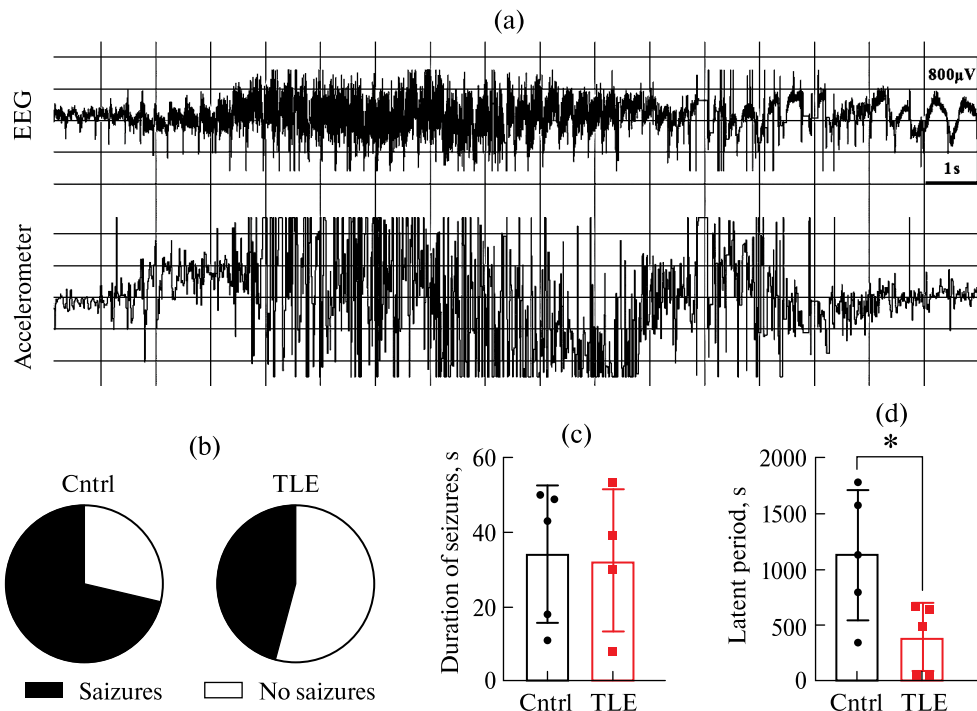


Рис. 2. Генерализованные судороги после введения ПТЗ (4-я стадия и выше по шкале Racine). (a) – пример иктальной активности во время ПТЗ-индуцированных судорог (верхний график – ЭЭГ, нижний график – показатели акселерометра); (b) – доля контрольных и экспериментальных крыс, у которых после введения ПТЗ развивались судороги; (c) – длительность ПТЗ-индуцированных судорог за 1 ч наблюдения; (d) – латентный период судорог. Cntrl – контрольная группа, TLE – экспериментальная группа; * – $p < 0.05$, t -критерий Стьюдента. Данные представлены в виде среднего и среднеквадратичного отклонения. Каждая точка соответствует показателю отдельного животного.

Иктальная активность после введения пентилентетразола

После введения ПТЗ у 71% контрольных и 45% TLE крыс отмечались короткие (10–50 с) судорожные припадки (4-я стадия и выше по шкале Racine), которые сопровождались иктальной активностью на ЭЭГ (рис. 2a–b). Практически во всех случаях имел место только один эпизод судорог (исключение – одна TLE крыса, у которой было 5 эпизодов). Длительность судорожных припадков у контрольных и экспериментальных животных достоверно не различалась ($t = 0.13$, $p = 0.9$, рис. 2c), при этом латентный период до появления судорог был короче у экспериментальных крыс по сравнению с контрольными животными ($t = 2.5$, $p = 0.037$, рис. 2d).

В целом в ходе проведенных исследований было показано, что в фоновых условиях показатели ЭЭГ существенно не различались у контрольных и экспериментальных крыс, однако их реакция на введение ПТЗ была различной: у контрольных животных развивалось большое количество комплексов высокоамплитудных острых волн, в то время как у экспериментальных крыс резко увеличивалась частота одиночных спайков. Различия на введение ПТЗ были выявлены и на поведенческом уровне: у всех крыс появились миоклонические вздрагивания, однако в экспериментальной группе их было больше, и они наступали раньше по сравнению с контрольной группой.

Максимальный электрошок

Проведение теста МЭШ показало, что контрольные и экспериментальные крысы не различались по пороговым значениям тока, необходимым для экстензии задних конечностей – значения в контроле составили: контроль – 55.9 ± 11.6 мА; TLE – 68.6 ± 11.5 мА, $t = 1.1$; $p = 0.28$.

Таким образом, проведенное исследование показало, что крысы с TLE и контрольные животные по-разному реагируют на введение ПТЗ, однако они не различаются по показателю МЭШ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе у крыс в литий-пилокарпиновой модели TLE исследованы особенности эпилептиформной активности в фоне и после введения ПТЗ. Мы показали, что в фоне животные с TLE и без нее существенно не различаются по частоте эпилептиформных паттернов (спайков и спайк-волн), однако ответ на введение ПТЗ оказался принципиально отличным у этих двух групп животных: у контрольных крыс типичным ответом явилось развитие комплексов высокоамплитудных острых волн, в то время как для крыс с моделью TLE было характерно увеличение частоты отдельных спайков и спайк-волн.

В данной работе особое внимание было уделено анализу интериктальной активности. Из клинических исследований известно, что приступы с клиническими симптомами составляют лишь небольшую часть всей аномальной электрической активности в мозге больных эпилепсией, основную часть составляют интериктальные эпилептиформные паттерны, которые включают спайки, вспышки и др. нарушения [15]. В клинической диагностике наличие интериктальных эпилептиформных паттернов на ЭЭГ является важным аргументом при постановке диагноза эпилепсии [15]. Спайки на ЭЭГ свидетельствуют о гипервозбудимости нейронов и наличии эпилептического очага. Экспериментально доказано, что иктальные и интериктальные разряды (спайки и острые волны) характеризуются сходными клеточными механизмами деполяризации мембраны, которая приводит к генерации потенциала действия [16]. При этом данные о связи выраженности спайков на ЭЭГ с иктогенезом противоречивы [17, 18]. С одной стороны, интериктальная эпилептиформная активность характерна для фокальных эпилептических расстройств, включая литий-пилокарпиновую модель [19]. Она претерпевает динамические изменения в течение латентного периода модели TLE, и некоторые авторы предполагают, что интериктальные спайки представляют собой биомаркеры эпилептогенеза [17, 20].

С другой стороны, клинические исследования не выявляют достаточно сильную корреляцию между частотой эпилептических припадков и частотой интериктальных спайков [21, 22]. Есть данные, что иктальные и интериктальные сигналы могут генерироваться различными популяциями нейронов [23]. Более того, ряд исследователей рассматривает интериктальные спайки как предохранительный клапан, служащий механизмом разрядки избыточной нейронной активности и предотвращающий его переход в полноценный эпилептический приступ. В частности, исследования, проведенные *in vitro* в модели с нулевым магнием (zero magnesium model), показывают, что усиление интериктальной активности в клетках области CA3 гиппокампа может приводить к подавлению развития иктальной активности в клетках энтериальной коры [24, 25]. Схожие данные получены в 4-аминопиридиновой *in vitro* модели эпилепсии [26].

В нашем исследовании в фоне в бодрствующем состоянии интериктальные одиночные спайки отмечались как у экспериментальных крыс, так и у контрольных животных, их частота в группах значимо не различалась. Эти результаты свидетельствуют о низкой ценности оценки данного показателя для анализа эпилептогенеза.

Более согласованной является позиция большинства исследователей в отношении негативной роли, которую интериктальная эпилептиформная активность играет в реализации когнитивных функций мозга. Было показано, что выраженная интериктальная эпилептиформная активность в медиальной и латеральной височной коре больных эпилепсией связана со снижением вербальной эпизодической памяти [27], при этом наиболее выраженная отрицательная корреляция отмечалась между показателями памяти и интериктальной эпилептиформной активностью, зарегистрированной во время медленноволнового сна (необходимого для нормальной консолидации памятных следов) [28]. Интериктальные эпилептиформные разряды связаны с низкими показателями памяти не только у больных эпилепсией, но и у пациентов с болезнью Альцгеймера [29] и при аневризматическом субарахноидальном кровоизлиянии [30], хотя в этих случаях интериктальная эпилептиформная активность не сопровождается судорогами. Эти клинические наблюдения подтверждаются экспериментальными данными. Индукция интериктальных спайков у крыс (без судорог), вызванная введением флуоротила, приводила к долговременным нарушениям их пространственной памяти [31]. Поэтому усиление интериктальной эпилептиформной активности имеет патофизиологическое значение.

В данном исследовании нами также показано, что изменения на ЭЭГ у контрольных и экспериментальных крыс, развивающиеся на введение ПТЗ, носят принципиально различный характер. У всех контрольных животных развиваются характерные, схожие комплексы спайков (ритмическая метразольная активность). Эти комплексы распадаются у TLE животных, у них отмечаются только отдельные спайки. Поскольку ритмическая метразольная активность опосредуется таламо-кортикальными взаимодействиями [32, 33], можно предположить нарушение этих путей у животных с TLE. В нашем исследовании миоклонические вздрагивания отмечались как у контрольных, так и у экспериментальных животных, но у последних они были выражены значительно сильнее, что, возможно, связано с нарушением тормозных ГАМК-эргических систем, характерных для животных с TLE [34, 35].

В отличие от реакции на введение ПТЗ, исследование пороговых значений МЭШ в нашем эксперименте не выявило различий между контрольными и экспериментальными животными. Ранее снижение порога судорожной готовности в тесте МЭШ было показано у крыс, у которых литий-пилокарпиновую модель эпилепсии индуцировали в возрасте трех недель [36]. Расхождение в результатах, вероятно, связано с тем, что в наших экспериментах использовались крысы более старшего возраста.

В целом проведенная нами работа показала, что использование введения низких доз ПТЗ может быть полезно при оценке состояния нервной системы крыс в литий-пилокарпиновой модели TLE. Данный экспериментальный подход может быть рекомендован при проведении фармакологических исследований.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О. Е. З.), сбор данных (М. Р. С.), обработка данных (М. Р. С.), написание и редактирование манускрипта (О. Е. З., М. Р. С.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 075-00263-25-00).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных и ухода за ними были соблюдены. Исследование проводилось в соответствии

с Директивой ЕС 2010/63/ЕС для экспериментов на животных и одобрено Комитетом по этике Института эволюционной физиологии и биохимии Российской академии наук (этическое разрешение № 1–16, 26 января 2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen Z, Brodie MJ, Ding D, Kwan P* (2023) Editorial: Epidemiology of epilepsy and seizures. *Front Epidemiol* 3. <https://doi.org/10.3389/fepid.2023.1273163>
2. *Ahmed Juvala II, Che Has AT* (2020) The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon* 6: e04557. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>
3. *Kleen JK, Scott RC, Holmes GL, Lenck-Santini PP* (2010) Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. *Ann Neurol* 67: 250–257. <https://doi.org/10.1002/ana.21896>
4. *Chen H, Koubeissi MZ* (2019) Electroencephalography in Epilepsy Evaluation. *Continuum (Minneapolis Minn)* 25: 431–453. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000705>
5. *Giorgi FS, Perini D, Maestri M, Guida M, Pizzanelli C, Caserta A, Iudice A, Bonanni E* (2013) Usefulness of a simple sleep-deprived EEG protocol for epilepsy diagnosis in de novo subjects. *Clin Neurophysiol* 124: 2101–2107. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2013.04.342>
6. *Drexel M, Sperk G* (2022) Seizure-induced overexpression of NPY induces epileptic tolerance in a mouse model of spontaneous recurrent seizures. *Front Mol Neurosci* 15: 974784. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.974784>
7. *Arski ON, Young JM, Smith M-L, Ibrahim GM* (2021) The Oscillatory Basis of Working Memory Function and Dysfunction in Epilepsy. *Front Hum Neurosci* 14: 612024. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.612024>
8. *Holmes GL, Lenck-Santini P-P* (2006) Role of interictal epileptiform abnormalities in cognitive impairment. *Epilepsy & Behavior* 8: 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.11.014>
9. *Behr C, Lévesque M, Ragsdale D, Avoli M* (2015) Lacosamide modulates interictal spiking and high-frequency oscillations in a model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 115: 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.05.006>
10. *Pearce PS, Friedman D, LaFrancois JJ, Iyengar SS, Fenton AA, MacLusky NJ, Scharfman HE* (2014) Spike-wave discharges in adult Sprague-Dawley rats and their implications for animal models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 32: 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.01.004>
11. *Löscher W* (2017) Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res* 42: 1873–1888. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2222-z>
12. *Tchekalarova J, Kubová H, Mareš P* (2009) Postnatal caffeine treatment affects differently two pentylenetetrazol seizure models in rats. *Seizure* 18: 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2009.04.002>
13. *Синяк ДС, Буков ГА, Сизов ВВ, Зубарева ОЕ, Амахин ДВ, Зайцев АВ* (2023) Применение малоинвазивного беспроводного метода регистрации ЭЭГ и функциональных нагрузок для оценки эпилептиформной активности у самцов крыс в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 109: 252–264. [*Sinyak DS, Bukov GA, Sizov VB, Zubareva OE, Amakhin DV, Zaitsev AV* (2023) Application of a minimally invasive wireless method of EEG registration and functional loads for the assessment of epileptiform activity in male rats in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Russian Journal of Physiology* 109: 252–264.]

- Zubareva OE, Amakhin DV, Zaitsev AV (2023) Application of a minimally invasive wireless method for recording EEG and functional loads to assess epileptiform activity in male rats in a lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Russ J Physiol* 109: 252–264. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0022093023010258>
14. Postnikova TY, Griflyuk AV, Tumanova NL, Dubrovskaya NM, Mikhel AV, Vasilev DS, Zaitsev AV (2025) Prenatal Hyperhomocysteinemia Leads to Synaptic Dysfunction and Structural Alterations in the CA1 Hippocampus of Rats. *Biomolecules* 15: 305.
<https://doi.org/10.3390/biom15020305>
 15. Karoly PJ, Freestone DR, Boston R, Grayden DB, Himes D, Leyde K, Seneviratne U, Berkovic S, O'Brien T, Cook MJ (2016) Interictal spikes and epileptic seizures: their relationship and underlying rhythmicity. *Brain* 139: 1066–1078.
<https://doi.org/10.1093/brain/aww019>
 16. Ayala GF, Dichter M, Gumnit RJ, Matsumoto H, Spencer WA (1973) Genesis of epileptic interictal spikes. New knowledge of cortical feedback systems suggests a neurophysiological explanation of brief paroxysms. *Brain Res* 52: 1–17.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90647-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90647-1)
 17. Staley KJ, White A, Dudek FE (2011) Interictal spikes: Harbingers or causes of epilepsy? *Neurosci Lett* 497: 247–250.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.03.070>
 18. Avoli M, Biagini G, de Curtis M (2006) Do Interictal Spikes Sustain Seizures and Epileptogenesis? *Epilepsy Curr* 6: 203–207.
<https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2006.00146.x>
 19. Lévesque M, Wang S, Macey-Dare ADB, Salami P, Avoli M (2023) Evolution of interictal activity in models of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 180: 106065.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106065>
 20. Chauvière L, Doublet T, Ghestem A, Siyoucef SS, Wendling F, Huys R, Jirsa V, Bartolomei F, Bernard C (2012) Changes in interictal spike features precede the onset of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 71: 805–814.
<https://doi.org/10.1002/ana.23549>
 21. Asadollahi M, Noorbakhsh M, Salehifar V, Simani L (2020) The Significance of Interictal Spike Frequency in Temporal Lobe Epilepsy. *Clin EEG Neurosci* 51: 180–184.
<https://doi.org/10.1177/1550059419895138>
 22. Gotman J (1991) Relationships Between Interictal Spiking and Seizures: Human and Experimental Evidence. *Canad J Neurol Sci* 18: 573–576.
<https://doi.org/10.1017/S031716710003273X>
 23. De Curtis M, Avanzini G (2001) Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* 63: 541–567.
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00026-5)
 24. Bragdon AC, Kojima H, Wilson WA (1992) Suppression of interictal bursting in hippocampus unleashes seizures in entorhinal cortex: a proepileptic effect of lowering $[K^+]_0$ and raising $[Ca^{2+}]_0$. *Brain Res* 590: 128–135.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91088-V](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91088-V)
 25. Avoli M (2001) Do Interictal Discharges Promote or Control Seizures? Experimental Evidence from an In Vitro Model of Epileptiform Discharge. *Epilepsia* 42: 2–4.
<https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3002.x>
 26. Avoli M, de Curtis M, Köhling R (2013) Does interictal synchronization influence ictogenesis? *Neuropharmacology* 69: 37–44.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.044>
 27. Camarillo-Rodriguez L, Leenen I, Waldman Z, Serruya M, Wanda PA, Herweg NA, Kahana MJ, Rubinstein D, Orosz I, Lega B, Podkorytova I, Gross RE, Worrell G, Davis KA, Jobst BC, Sheth SA, Weiss SA, Sperling MR (2022) Temporal lobe interictal spikes disrupt encoding and retrieval of verbal memory: A subregion analysis. *Epilepsia* 63: 2325–2337.
<https://doi.org/10.1111/epi.17334>
 28. Lambert I, Tramoni-Negre E, Lagarde S, Roehri N, Giusiano B, Trebuchon-Da Fonseca A, Carron R, Benar C, Felician O, Bartolomei F (2020) Hippocampal Interictal Spikes during Sleep Impact Long-Term Memory Consolidation. *Ann Neurol* 87: 976–987.
<https://doi.org/10.1002/ana.25744>

29. Horvath AA, Papp A, Zsuffa J, Szucs A, Luckl J, Radai F, Nagy F, Hidasi Z, Csukly G, Barcs G, Kamondi A (2021) Subclinical epileptiform activity accelerates the progression of Alzheimer's disease: A long-term EEG study. *Clin Neurophysiol* 132: 1982–1989.
<https://doi.org/10.1016/j.clinph.2021.03.050>
30. Otsuka K, Sunaga S, Jimbo H, Suzuki Y, Kohno M (2025) Effect of epileptiform discharges and hippocampal volume on cognitive dysfunction following clipping of ruptured aneurysms in the anterior circulation. *Front Surg* 12.
<https://doi.org/10.3389/fsurg.2025.1428311>
31. Khan OI, Zhao Q, Miller F, Holmes GL (2010) Interictal spikes in developing rats cause long-standing cognitive deficits. *Neurobiol Dis* 39: 362–371.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.05.002>
32. Starzl TE, Niemer WT, Dell M, Forgrave PR (1953) Cortical and Subcortical Electrical Activity in Experimental Seizures Induced by Metrazol. *J Neuropathol Exp Neurol* 12: 262–276.
<https://doi.org/10.1097/00005072-195307000-00006>
33. Panthi S, Leitch B (2021) Chemogenetic Activation of Feed-Forward Inhibitory Parvalbumin-Expressing Interneurons in the Cortico-Thalamocortical Network During Absence Seizures. *Front Cell Neurosci* 15.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.688905>
34. Houser CR, Esclapez M (2003) Downregulation of the $\alpha 5$ subunit of the GABA_A receptor in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 13: 633–645.
<https://doi.org/10.1002/hipo.10108>
35. Kumar SS, Buckmaster PS (2006) Hyperexcitability, Interneurons, and Loss of GABAergic Synapses in Entorhinal Cortex in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* 26: 4613–4623.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0064-06.2006>
36. Diespirov GP, Postnikova TY, Griflyuk AV, Kovalenko AA, Zaitsev AV (2023) Alterations in the Properties of the Rat Hippocampus Glutamatergic System in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Biochemistry (Moscow)* 88: 353–363.
<https://doi.org/10.1134/S0006297923030057>

Response Characteristics to Pentylenetetrazol Administration in Rats with the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy

M. R. Subkhankulov^a, and O. E. Zubareva^{a, *}

*^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

**e-mail: ZubarevaOE@mail.ru*

Epilepsy is a severe neurological disorder, with approximately 30% of patients being therapy-resistant. The lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy (TLE) in rats reproduces key features of the disease, but long-term monitoring of spontaneous seizures is labor-intensive, necessitating the search for additional biomarkers of epileptogenesis. In clinical practice, EEG—particularly the analysis of interictal epileptiform patterns—plays a crucial role in epilepsy diagnosis. Provocative tests (sleep deprivation, photic stimulation, etc.) enhance the detection of pathological patterns. In experimental settings, a similar effect can be achieved using low doses of convulsants, such as pentylenetetrazol (PTZ), though such methods are rarely employed. The aim of this study was to investigate the effect of low-dose PTZ on epileptiform activity in the lithium-pilocarpine TLE model in rats and compare this method with maximal electroshock (MES) testing. The TLE model was induced in male Wistar rats (experimental group: pilocarpine after LiCl; control group: saline). Six months later, after the development of spontaneous recurrent seizures, EEG electrodes were implanted on the skull surface. EEG recordings were performed in two stages: baseline and after PTZ administration (40 mg/kg). Three weeks later, seizure susceptibility was assessed using MES. The results showed that baseline EEG recordings revealed no differences between the groups. However, after PTZ administration, a clear distinction was observed: Control rats exhibited regular bursts of high-amplitude sharp waves (4–8 Hz). Epileptic model rats predominantly displayed interictal spikes and spike-wave complexes. In contrast, MES testing showed no differences in threshold currents required to induce hindlimb extension between control and experimental rats. Thus, the provocative test using low-dose PTZ is a highly sensitive method for detecting epileptiform activity in the TLE model, surpassing MES in informativeness. These findings support the potential of this approach for preclinical research.

Keywords: temporal lobe epilepsy, lithium-pilocarpine model, EEG, epileptiform activity, pentylenetetrazol, provocative tests, maximal electroshock