

# Генетическая линия крыс Крушинского–Молодкиной как уникальная экспериментальная модель судорожных состояний

И.И. Полетаева , З.А. Костына, Н.М. Сурина, И.Б. Федотова, З.А. Зорина

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Исследование генетических механизмов, лежащих в основе нормальных и патологических признаков поведения животных, важно не только для общего понимания работы центральной нервной системы (ЦНС) позвоночных, но и для благополучия человека, в частности в борьбе с заболеваниями мозга. Накопление знаний о функциях генов, экспрессирующихся в ЦНС и связанных со специфическими функциями мозга, которые сегодня определяются успехами молекулярной генетики, не делает менее актуальным исследование фенотипического проявления генетически детерминированных признаков, в особенности патологических. Эпилепсия как одно из заболеваний ЦНС занимает важное место в таких работах. Несмотря на большое количество новых противосудорожных средств, значительная доля случаев этой болезни по-прежнему не поддается лечению. В связи с этим исследование механизмов эпилептогенеза на моделях востребовано, поскольку может способствовать выявлению тех особенностей развития повышенной судорожной готовности, которые пока остаются мало изученными. Одним из четких, но непростых для генетического исследования признаков является аудиогенная эпилепсия (судороги в ответ на сильный звук), которая рассматривается в этой статье. Важное свойство аудиогенной эпилепсии как модели – возможность анализа интенсивных тонических судорог в условиях хронического эксперимента (т.е. с повторной провокацией этого состояния у одного и того же животного, что невозможно в случае фармакологических или «электрошоковых» судорог). В статье дается краткая характеристика инбредной линии крыс Крушинского–Молодкиной, первой из линий, селективированных на этот признак. Характерный «рисунок» судорожного припадка, наиболее частое проявление его у грызунов, постиктальные аномальные состояния (в частности, катаlepsия) и ряд других патологических признаков делают этот феномен важным не только как модель патологии, но и как явление общебиологической значимости. Влияние генетического фона (продемонстрированное для случаев коморбидности этих судорог с депрессией и тревожностью) может оказаться решающим фактором в определении механизмов других аномалий ЦНС. Развитие аудиогенных судорог как физиологического феномена, сопровождающего другие патологические состояния, было также предметом исследований коллег Д.К. Беляева в Институте цитологии и генетики.

Ключевые слова: генетика поведения; аудиогенная эпилепсия; крысы линии Крушинского–Молодкиной.

## The Krushinsky–Molodkina genetic rat strain as a unique experimental model of seizure states

I.I. Poletaeva , Z.A. Kostyna, N.M. Surina, I.B. Fedotova, Z.A. Zorina

Lomonosov Moscow State University, Department of Biology, Moscow, Russia

The study of genetic mechanisms, which underlie normal and abnormal behavioral traits, are important not only for fundamental knowledge of CNS function, but also for human well-being, as well as in the aspect of treatment of brain diseases. Accumulation of knowledge concerning the functions of genes, which are expressed in the CNS and are involved in the specific brain functions determined now by the success of molecular genetics, but it could not overshadow the importance of phenotype expression investigation of genetically determined traits, especially pathological ones. Epilepsy, as one of CNS diseases, occupies an important place in the row of these studies. In spite of numerous anticonvulsant drugs a significant proportion of epilepsy cases are still resistant to drug treatments. It means that the study of various aspects of epileptogenesis using animal models should be welcomed as it will help to elucidate those aspects of increased seizure proneness that are now out of scope of research attention. The distinct trait of this domain, which is not easy to analyze genetically, is audiogenic epilepsy (the seizure attack in response to loud sound). The important feature of audiogenic epilepsy is that the intense tonic seizures could be induced and analyzed repeatedly which makes it possible to induce the seizures repeatedly in the course of chronic experiments with the same animal, which is not possible in the cases of pharmacologically or electrically induced seizures. The Krushinsky–Molodkina (KM) inbred rat strain, which was the first among strains selected for audiogenic epilepsy, is briefly characterized. The specific seizure pattern, the rodent proneness for audiogenic epilepsy, as well as abnormal postictal states (catalepsy, in particular) illustrate the importance of this phenomenon not only as a model of certain brain pathology, but also as a matter of general biological importance. The importance of genetic background

factor (demonstrated in the case of study of comorbidity (audiogenic epilepsy, anxiety and depression)) could be crucial in the studies of other CNS anomalies. The audiogenic seizures as a physiological phenomenon which often accompanies several brain pathologies had been in the scope of research interests for D.K. Belyaev and his colleagues in his Institute.

Key words: behavior genetics; audiogenic epilepsy; Krushinsky–Molodkina rat strain.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Поletaева И.И., Костына З.А., Сурина Н.М., Федотова И.Б., Зорина З.А. Генетическая линия крыс Крушинского–Молодкиной как уникальная экспериментальная модель судорожных состояний. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(4):427-434. DOI 10.18699/VJ17.261

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Poletaeva I.I., Kostyna Z.A., Surina N.M., Fedotova I.B., Zorina Z.A. The Krushinsky–Molodkina genetic rat strain as a unique experimental model of seizure states. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(4):427-434. DOI 10.18699/VJ17.261

Ушедшее поколение наших учителей практически не застало эры генетически модифицированных животных. Их представления о генетических основах поведения и физиологических признаков имели фундаментом классическую генетику, которая была «незыблемым сводом правил» наследования признаков и остается таковой и сегодня. К этому поколению принадлежал и Д.К. Беляев, исследования которого шли параллельно с развитием работ Л.В. Крушинского.

Л.В. Крушинский – натуралист, кинолог, физиолог, точнее нейробиолог широкого профиля, в конце 1930-х гг. исследовал поведение (оборонительные реакции) собак, работая в питомниках служебного собаководства. После окончания аспирантуры в 1938 г. он защитил кандидатскую диссертацию на тему «Проявление и выражение оборонительных реакций у собак». Его наблюдения за формированием поведения собак-гибридов позволили ему сформулировать общебиологическую концепцию роли общей возбудимости ЦНС как модулятора экспрессии наследственно детерминированных признаков. Глубокий интерес к этой проблеме лежал и в основе его последующей экспериментальной работы с дикими и лабораторными крысами. Полученные данные привели Л.В. Крушинского и его учеников Д.А. Флесса и Л.Н. Молодкину к созданию путем селекции из аутбредной линии Вистар новой, первой в мире, линии крыс, предрасположенных к развитию эпилептиформных судорожных припадков в ответ на сильный звук. Этот феномен известен как «аудиогенная» эпилепсия (АЭ). Впоследствии линия получила название «линия Крушинского–Молодкиной (КМ)», в настоящее время поддерживается в инбредном состоянии.

В дальнейшем, но значительно позже, чем линия КМ, были селектированы и другие линии крыс с АЭ. Это две линии GEPR (Genetic Epilepsy Prone Rats), выведенные в США из линии Sprague-Dowley (Consroe et al., 1979; Reigel et al., 1986; Faingold, 1999), а также линия WAR, селектированная в Бразилии (García-Cairasco, 2002) из популяции Вистар (как линия КМ). Известны также линии мышей (Skradski et al., 1998) и хомяков (Barrera-Bailón et al., 2013), проявляющих АЭ. Следует отметить, что данную генетическую модель (линия крыс КМ), неоднократно использовали для описания эффектов целого ряда противосудорожных фармакологических агентов (Федотова и др., 1996; Раевский и др., 1998; Семиохина и др., 2006).

### Судорожные состояния человека

Примерно 70 % всех случаев эпилепсии человека не связано ни с травмой или опухолью мозга, ни с родовой травмой и т. п. Это так называемая идиопатическая эпилепсия. Ее генетическая основа либо простая (моногенная), либо сложная. В проявлении патологии при полигенном характере наследования могут играть роль внешние условия. Случаи эпилепсии с моно- и полигенным определением – это некий континуум от случаев заболевания, мало зависящего от средовых условий (моногенные) до случаев, когда болезнь определяется многими генами (Ferraro, Vuono, 2006), каждый из которых имеет небольшой эффект, и их проявление может сильно зависеть от средовых условий. Именно в таких случаях следует говорить о высокой предрасположенности к развитию эпилептических припадков или о высокой судорожной готовности. Известно, что значительная доля (до 30 %) случаев эпилепсии не поддается медикаментозному лечению. Это позволяет предположить, что в основе таких нарушений, как и при посттравматической эпилепсии, может быть аномальная возбудимость ионных каналов. Такие отклонения получили название «каналопатии» (Mulley et al., 2003; Bernard et al., 2004; Errington et al., 2005; Heron et al., 2007; Becker et al., 2008). Аномалии возбудимости ионных каналов анализируются и на генетических моделях эпилепсии, однако использование нейробиологических методов показало существование также большого числа отклонений в функции ряда нейромедиаторных систем (Поletaева и др., 2013). Характер их связи с каналопатиями остается пока неизученным.

Судорожные состояния человека связаны, таким образом, и с аномалиями мембран нейронов, и с другими, предположительно, «сетевыми» нарушениями, которые определяются взаимодействиями групп нейронов. В этом плане модели этой патологии на животных важны для понимания механизмов эпилептогенеза на «системном» уровне. Исследование генетических основ подобных нарушений в линиях грызунов с АЭ представляет как теоретический, так и практический интерес.

### Картина аудиогенного судорожного припадка и сопутствующих феноменов у крыс линии КМ

Ниже кратко перечислены основные патологические признаки, которые характерны для крыс этой линии (см. обзор Poletaeva et al., 2015).

1. Интенсивные клонико-тонические судороги, развивающиеся через 5–7 с после включения звука. Этим судорогам предшествует «фаза быстрого» или «клонического» бега. На современном этапе у крыс КМ эта фаза развивается сразу после интенсивной акустической «стартл-реакции» (через 1–3 с после включения звука). За ней следуют клонические судороги – ритмические судорожные сокращения мышц всего тела в положении животного на животе. Заключительная, тоническая, фаза – напряженный спазм всех мышц тела и конечностей – развивается после падения животного на бок. Интенсивность эпилептиформного припадка при АЭ оценивается в условных баллах (Семиохина и др., 2006).
2. Интенсивная (по выраженности и длительности) «постиктальная» катаlepsия (восковая гибкость мышц всего тела) (Федотова и др., 2008). Следует отметить, что постиктальная катаlepsия описана также у крыс WAR (проф. N. Garcia-Cairasco, личное сообщение) и не наблюдалась у крыс GEPR (проф. C. Faingold, личное сообщение). Крысы линии КМ оказались достоверно более сильно подверженными развитию рефлекторной, «щипковой», катаlepsии по сравнению с животными других генотипов (Сурина и др., 2010).
3. Появление миоклонических судорог в результате длительной (12–18 дней) ежедневной экспозиции крыс действию звука (Федотова, Семиохина, 2002; Семиохина и др., 2006). В отличие от типичных судорог при АЭ, очаг которых расположен в стволе мозга, миоклонические судороги имеют переднемозговую локализацию – в их развитии участвуют и новая кора, и структуры лимбической системы мозга. Этот феномен получил название «аудиогенный киндлинг» (Galvis-Alonso et al., 2004; Vinogradova, 2015) по аналогии с явлением подобной «раскачки» (kindling), который наблюдают при систематическом применении ритмического подпорогового электрического раздражения гиппокампа или миндалины или при регулярном введении подпороговых доз судорожных агентов (Turner et al., 1977; Coffey et al., 1996).
4. Нарушения мозгового кровообращения после длительной (15 мин) экспозиции животного действию звука. Л.В. Крушинский и его сотрудники разработали специальную схему подачи звукового раздражения для таких экспериментов (см. обзор Полетаева и др., 2013). По этому протоколу короткие (10 с) периоды подачи звука перемежаются 10-секундными паузами, а сила звука в этих коротких интервалах чередуется (120 или 60 дБ). В течение этого 15-минутного звукового воздействия почти у всех крыс линии КМ обнаруживаются нарушения движений (парезы конечностей, выражающиеся в нарушениях походки животного). Часть животных при этом погибает. «Сосудистую» природу этих нарушений движений подтверждало обнаружение субдуральных и внутрижелудочковых кровоизлияний (Власов и др., 1991).

Данный патологический синдром оказалось возможным модулировать путем изменения состава дыхательной газовой смеси (Крушинский и др., 1980), а также индукцией гипоксии (Кошелев и др., 1984, 1987; Фадюкова и др., 2013).

## Аудиогенная эпилепсия (краткий обзор)

Аудиогенная эпилепсия – это частный случай рефлекторной эпилепсии, состояния, которое обнаруживается как у животных (Ross, Coleman, 2000; Italiano et al., 2016), так и у человека (Dewhurst et al., 2015). Рефлекторная эпилепсия – развитие припадков – в ответ на зрительную стимуляцию описана у кур (Guy et al., 1992); в ответ на тактильную и вестибулярную стимуляцию – у монгольских песчанок (Cox, Lomax, 1976). Рефлекторная эпилепсия, сходная с припадками человека, индуцированными мелькающим светом, описана у павианов *Papio papio* (Naquet et al., 1995).

Эпилептиформные судорожные припадки, таким образом, можно вызвать путем экспозиции животных действию сильного звука. Этот феномен был подробно проанализирован ранее в большом, практически исчерпывающем, обзоре (Ross, Coleman, 2000).

С помощью ряда физиологических методов показано, что судорожный эпилептиформный припадок у мышей и крыс, развивающийся в ответ на включение сильного звука, связан с активацией нейронных структур ствола мозга. Электрофизиологические «знаки» эпилептиформной активности обнаруживаются при этом в продолговатом и среднем мозге, тогда как в новой коре эпилептиформной активности нет (Семиохина и др., 2006). Позднее это было подтверждено в работах, выполненных и на мышцах, и на линиях крыс GEPR (Genetic Epilepsy Prone Rats) и WAR (Wistar Audiogenic Rats) (Ross, Coleman, 2000). Экстирпация двигательной области коры не предотвращает АЭ (Семиохина и др., 2006), а электрическое раздражение задних бугров четверохолмия и медиальных колленчатых тел ее провоцирует (Флесс и др., 1970). У крыс КМ раздражение двигательной зоны коры вызывало лишь судороги отдельных мышц конечностей, а распространяющаяся депрессия (Leao) в новой коре и стриатуме не блокировала у них судороги, характерные для АЭ (Семиохина, 1969). Сходные данные по особенностям участия структур ствола мозга в генезе АЭ были получены и на крысах линий GEPR и WAR (Faingold, 1999; Faingold, Randall, 1999; Deransart et al., 2001; Garcia-Cairasco, 2002; Doretto et al., 2003; и др.), и на мышцах (Ross, Coleman, 2000). Определение уровня экспрессии раннего гена *c-fos* также показало ведущую роль ствола в генезе АЭ (Eells et al., 2004).

Тонические судороги у крыс с АЭ сохранялись после хирургического сечения ствола мозга выше уровня расположения четверохолмия (Browning et al., 1999). В то же время показано, что «запуск» механизма развития аудиогенного судорожного припадка происходит с участием нижнего двуххолмия (Cools et al., 1984; Faingold, 1999; Garcia-Cairasco, 2002). По мнению К. Файнголда (линии GEPR), иерархическое вовлечение нейронной сети в формирование аудиогенного судорожного приступа начинается с возбуждения нижнего двуххолмия, после чего следует активация глубинных отделов верхнего двуххолмия, затем ретикулярной формации моста и околводопроводного серого вещества (Faingold, Randall, 1999; Garcia-Cairasco, 2002; Raisinghani, Faingold, 2005). Показано также, что нейроны ретикулярной и латеральной частей черной субстанции проецируются в верхние и нижние холмики, причем модуляция активности верхнего

двухолмия со стороны черной субстанции происходит с участием неостриатума. У крыс КМ методом прижизненного микродиализа выявлены особенности организации ДАергической системы стриатума (Сорокин и др., 2004) в подтверждение участия ДАергической системы ствола в генерации припадков АЭ, показанного ранее на других линиях с АЭ (Ross, Coleman, 2000). Эти факты свидетельствуют о том, что аномалии мембран нейронов (и каналопатии в частности) (см. N'Gouemo et al., 2009a, b), по всей видимости, имеют разную топографию, т. е. проявление аномалии нейронов определенной нейрoхимической специфичности может быть приурочено к разным мозговым структурам. Можно также отметить, что антагонист глутаматергической системы (блокатор канала NMDA-рецептора), МК-801 (дизоцилпин), не подавляет активности нейронов ни в одном из звеньев нейронной сети генерации АЭ, но эффективно блокирует эти судороги (Faingold, 1999, 2004).

Нейрохимические исследования, проведенные на крысах с АЭ, позволили выявить многочисленные признаки, по которым эти животные отличаются от групп нормального контроля (Ross, Coleman, 2000; Faingold, 2004). Это в первую очередь особенности, которые существуют изначально, т. е. в фоне, без действия звука и развития судорог (Семиохина и др., 2006). К таким особенностям относятся отклонения в фоновых уровнях катехоламинов, а также глутамата и ГАМК в структурах ствола (Жулин, Плескачева, 1991; Косачева и др., 1998; Раевский и др., 1998; Akbar et al., 1998; Faingold, 2002; Семиохина и др., 2006). Были изменены уровни и других аминокислот – нейротрансмиттеров, причем эти изменения, видимо, имеют «общемозговой» характер, поскольку выявляются не только в структурах ствола, но и в новой коре. У крыс КМ описаны особенности сАМР- и Ca(2+)/calmodulin-зависимого фосфорилирования (Yechikhov et al., 2001), а также отклонения обмена в митохондриях не только в мозге, но и на периферии – в ткани печени (Venedictova et al., 2017). Методом прижизненного микродиализа показано, что при введении блокаторов DA-рецепторов нарастание уровня внеклеточного дофамина в стриатуме у крыс линии КМ происходит достоверно более медленно, чем у крыс Вистар (Сорокин и др., 2004), показаны также особенности связывания специфических лигандов D2 и NMDA рецепторами клеток стриатума (Фирстова и др., 2013). У крыс линии КМ оказалась более высокая, чем у Вистар, активность ERK1/2 киназ в нигростриатной системе, возможно, являющаяся одним из факторов, определяющих повышенную судорожную готовность этих животных (Дорофеева и др., 2015).

В целом генез судорог при АЭ происходит, по всей видимости, из-за снижения функции ГАМКергической системы и повышения активности глутаматергической системы. Как эти феномены связаны с существованием аномалии ионных каналов при склонности к генезу судорог, остается пока не исследованным. Следует также упомянуть о более высокой общей судорожной готовности крыс КМ. У них обнаружено достоверное преобладание судорожных припадков в ответ на однократное введение подпороговых (т. е. заведомо «не вызывающих судорог») доз пентилентетразола (Fedotova et al., 2016).

Указанные особенности нейротрансмиттерных систем животных, подверженных АЭ, имеют место в пределах структур ствола мозга, отвечающих как за моторику, так и за быструю реакцию животного на неожиданные акустические или визуальные стимулы (четверохолмие). Отметим, что АЭ как нейробиологический феномен наиболее характерна для грызунов, что может быть связано со структурно-функциональными особенностями их ЦНС. Подобные особенности должны способствовать быстрой и эффективной адаптации особей этих видов к жизни в условиях постоянной настороженности и готовности «выдать» быструю реакцию на неожиданно сильный звук, как правило, сигнализирующий об опасности. Разведение грызунов в неволе, неизбежно сопровождавшееся инбридингом и переводом в гомозиготное состояние многих генов, в частности отвечающих за такое поведение, могло способствовать формированию фенотипа, отличительной чертой которого является реакция на звук в виде сначала фазы быстрого бега, а затем и судорог. Анализ этого вопроса – одна из «точек роста» в исследовании экспериментального эпилептогенеза.

Генетическое исследование АЭ крыс наиболее подробно проведено именно на линии КМ, хотя данные по линиям GEPR и WAR тоже существуют (Романова и др., 1976; Ribak et al., 1988; Faingold, 2002; Doretto et al., 2003). Однако специального внимания этому вопросу исследователи не уделяли. В целом, в отличие от АЭ мышей, характеризующейся олигогенным наследованием (Skradski et al., 1998), у крыс это полигенный признак с выявленным эффектом генов-модификаторов, причем более подробный анализ последнего до сих пор не проводился (Федотова и др., 2005). При сравнении известных сегодня данных по фенотипическому проявлению и генетической основе АЭ крыс, можно отметить два обстоятельства. Первое – достаточно высокая «униформность» проявлений АЭ у крыс, полученных из популяций Вистар (КМ и WAR) и Спрэгг–Дули (GEPR). Это касается сходства стадий припадков, фармакологической чувствительности, характера нейрохимических аномалий, а также мозговой локализации припадков АЭ и аудиогенных миоклонических судорог. Совпадение тем более знаменательно, что данные по целому ряду особенностей крыс линии КМ (полученные примерно за 20 лет до появления информации по американским линиям GEPR) были не известны американским авторам. Второе обстоятельство – значительно более высокая судорожная готовность крыс КМ к развитию аудиогенных судорог по сравнению с картиной АЭ у линий GEPR и WAR, а также их повышенная общая судорожная готовность – реакция на подпороговую дозу конвульсанта коразола (Fedotova et al., 2016). Фаза быстрого бега и тонические судороги развиваются у крыс линии КМ стремительно («полный» припадок обнаруживается к 7–8 с после включения звука), чего не описано ни у WAR, ни у GEPR (хотя подробных публикаций о параметрах припадков АЭ у крыс этих линий не обнаружено, как нет и данных об изменениях в быстроте развития судорог по ходу селекции линий).

В настоящее время в лаборатории физиологии и генетики поведения (биологический факультет МГУ) созданы путем селекции две новые линии крыс, исследование

которых в сочетании с данными по КМ – одна из точек роста исследования АЭ в нашем коллективе. Исходной популяцией для создания этих линий были крысы-гибриды F2 (КМ × Вистар). Для этого скрещивания выбрали крыс Вистар, не обнаруживавших АЭ при трехкратной (с интервалом в несколько дней) экспозиции их действию звука. В дальнейшем проведены возвратные скрещивания гибридов F2 на родительскую линию КМ (Федотова и др., 2005) с последующим отбором на высокую интенсивность АЭ и на ее отсутствие. Таким образом, одну из линий (линия «0») селективировали на отсутствие судорог в ответ на звук (критерий – полное отсутствие АЭ при трехкратной звуковой экспозиции). Вторую линию (линия «4») селективировали на высокие показатели АЭ («4» – условный балл судорог АЭ, соответствующий ее наибольшей интенсивности). Ход селекции этих линий и ее результаты описаны отдельно (подробнее см. Федотова и др., 2012). Отметим, однако, что на уровне 30-го поколения селекции этих линий у крыс линии «0» не получено 100 % отсутствия судорог в ответ на звук, что можно рассматривать как косвенное подтверждение высказанного выше предположения о важности интенсивной реакции на звук в биологии грызунов. К настоящему времени подобных экспериментов с другими линиями крыс, предрасположенными к АЭ, не проводилось.

С вопросом генетической основы АЭ и «коморбидных» этому признаку патологических признаков связаны недавно полученные данные по реакции крыс четырех генотипов (КМ, «4», «0» и Вистар) на хроническое введение ингибитора обратного захвата моноаминов флуоксетина (Sarkisova et al., 2017). Использование в этих экспериментах линий «0» и «4» наряду с КМ и Вистар позволило показать, что наличие у крыс АЭ (КМ и «4») и ее отсутствие («0» и Вистар) не связано с различиями в проявлении тревожности и склонности к развитию подобных депрессии состояний. Введение антидепрессанта флуоксетина практически не изменило «рисунка» различий, обнаруженных у крыс этих генотипов до инъекций. Эти данные свидетельствуют о важности роли генетического фона, на котором экспрессируется патофизиологический признак в общей фенотипической картине. Отметим, что если бы в исследовании использовали только крыс линий КМ и Вистар, то было бы получено указание на существование «коморбидности» АЭ, тревожности и склонности к депрессии. Эти данные служат примером того, что в нейробиологических исследованиях, в особенности при анализе сложных признаков с полигенным определением, необходимо учитывать и общие генетические особенности, такие как сходство или различия в генетическом фоне линий, различающихся по какому-либо конкретному признаку (в нашем примере – АЭ). Это особенно важно для случаев, когда такой признак моделирует патологическое состояние ЦНС человека. Таким образом, использование триады линий (КМ, «0» и «4») достаточно перспективно в фармакологических исследованиях, например при преклинической апробации новых противосудорожных агентов. Данная проблема (поиск новых антиэпилептических средств) тем более актуальна, что у большей части больных эпилепсией припадки не поддаются коррекции современными фармакологическими воздействиями.

Использование указанных трех линий дает возможность более полного анализа аудиогенной эпилепсии как биологического феномена (анализ роли слуховой системы в реакции грызунов на опасность), и в частности исследования роли доместикационных изменений в усилении этих признаков. Изучение триады этих линий может пролить свет на природу аномалий, свойственных крысам КМ (например, нарушений мозгового кровообращения). В настоящее время достаточно проблематично исследовать эти особенности АЭ методами современной молекулярной генетики и имеющимися в лаборатории средствами. Еще один из перспективных подходов в изучении АЭ – оценка отдаленных эффектов неонатальных воздействий на ЦНС, в частности на АЭ у крыс линии КМ. Это могут быть и фармакологические, и физические агенты (Полетаева и др., 2012; Федотова и др., 2017). Отдаленные последствия в виде изменения картины судорог или модуляции их интенсивности могут быть указанием на существование эпигенетических механизмов регуляции возбудимости ЦНС, которые могут участвовать в этих процессах (Poletaeva et al., 2014).

В то же время в моделях аудиогенной эпилепсии, которые важны для понимания общих процессов эпилептогенеза, мало используются современные методы, в частности оптогенетические (Bentley et al., 2013; Paz, Huguenard, 2015). Оптогенетические исследования уже дают достаточно важные и информативные результаты при использовании других моделей эпилепсии, в частности генетической модели «малых припадков линии Wag/Rji (Wagner et al., 2015), модели status epilepticus (Sukhotinsky et al., 2013). Подобные исследования (Walker et al., 2013; Zhao et al., 2015) снова поднимают важный вопрос о роли общей возбудимости ЦНС в генезе патологических состояний, а возможности, которые может дать использование оптогенетического подхода в лечении судорог (не обязательно «эпилептического» происхождения), заставляют снова напомнить о важности общебиологического подхода к этой проблеме. Можно полагать, что именно комбинация разных подходов в использовании такой модели судорожных состояний, как АЭ (и линия крыс КМ как одна из наиболее высокоэффективных вариантов моделей тонических судорог), наиболее перспективна для дальнейших исследований. Однако такие подходы, по всей видимости, недостаточны для выявления собственно генетических основ состояния повышенной судорожной готовности.

Возвращаясь к упомянутой в начале статьи мысли о том, что общие закономерности экспрессии в фенотипе сложных признаков, какими являются признаки поведения, не всегда доступны «прямоу» генетическому исследованию. В таких случаях генетическому подходу должны предшествовать тщательный физиологический анализ и учет влияния таких (может быть, и «минорных») факторов, как особенности генетического фона линии. Эти трудности, естественно, определяются сложными взаимодействиями между структурами мозга, которые сложились в результате реализации генетически детерминированной программы его развития, между разными по химизму и размаху нормы реакции нейротрансмиттерными системами (даже в пределах одного отдела мозга), возможностью эпигенетической регуляции признаков

поведения (в нашем случае – аудиогенной эпилепсии) (Poletaeva et al., 2014).

Очертить «программу» дальнейших исследований эпилептогенеза у крыс линии КМ представляется задачей и нелегкой, и не очень благодарной. Разумеется, общий прогресс в применении современных методов анализа, в том числе и оптогенетических, может способствовать отысканию «первопричин» АЭ грызунов, в частности в выявлении участков мозга, наиболее важных для генеза припадков АЭ (т. е. тех структур, которые можно считать ключевыми) (см., например, Солюс и др., 2016). Весьма перспективны исследования связи АЭ крыс линии КМ с общими физиологическими особенностями поведения этих животных, а также более подробный анализ отдаленных последствий неонатальных воздействий, обнаруживающих модуляторное влияние на АЭ. Данные об участии генотипа в формировании повышенной судорожной готовности крыс линии КМ показывают, что нейрогенетика – одна из наиболее сложных ветвей современной нейробиологии.

В то же время в изучении этих вопросов за последние десятилетия достигнут столь значительный прогресс, а перспективы исследований представляются настолько интересными, что наши учителя были бы не только изумлены новой картиной мозга в свете роли генотипа, но, возможно, увидели бы в таком развитии наших знаний и свой вклад.

## Acknowledgments

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 15-04-01732, and State Budgeted Project N AAA-A16-11602166005-1.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Akbar M.T., Rattray M., Williams R.J., Chong N.W., Meldrum B.S. Reduction of GABA and glutamate transporter messenger RNA in the severe seizure genetically epilepsy-prone rat. *Neuroscience*. 1998; 85:1235-1251.
- Barrera-Bailón B., Oliveira J.A., López D.E., Muñoz L.J., Garcia-Cairasco N., Sancho C. Pharmacological and neuroethological studies of three antiepileptic drugs in the Genetic Audiogenic Seizure Hamster (GASH:Sal). *Epilepsy Behav.* 2013;28:413-425.
- Becker A.J., Pitsch J., Sochivko D., Opitz T., Staniek M., Chen C.C., Campbell K.P., Schoch Yaari Y., Beck H. Transcriptional upregulation of Cav3.2 mediates epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. *J. Neurosci.* 2008;28:13341-13353.
- Bentley J.N., Chestek C., Stacey W.C., Patil P.G. Optogenetics in epilepsy. *Neurosurg. Focus*. 2013;34:E4. DOI 10.3171/2013.3.FOCUS 1364.
- Bernard C., Anderson A., Becker A., Poolos N.P., Beck H., Johnston D. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science*. 2004;305:532-535.
- 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.
- Coffey L.L., Reith M.E., Chen N.H., Mishra P.K., Jobe P.C. Amygdala kindling of forebrain seizures and the occurrence of brainstem seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia*. 1996;37: 188-197.
- Consroe P., Piccioni A., Chin L. Audiogenic seizure susceptible rats. *Fed. Proc.* 1979;38:2411-2416.
- Cools A.R., Coolen J.M., Smit J.C., Ellenbroek B.A. The striato-nigro-collicular pathway and explosive running behavior: functional interaction between neostriatal dopamine and collicular GABA. *Eur. J. Pharmacol.* 1984;100:71-77.
- Cox B., Lomax P. Brain amines and spontaneous epileptic seizures in the Mongolian gerbil. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1976;263-267.
- Deransart C., Le-Pham B.T., Hirsch E., Marescaux C., Depaulis A. Inhibition of the substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: evidence for seizure specificity of the nigral control. *Neuroscience*. 2001;105:203-211.
- Dewhurst E., Novakova B., Reuber M. A prospective service evaluation of acceptance and commitment therapy for patients with refractory epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2015;46:234-241.
- Doretto M.C., Fonseca C.G., Lobo R.B., Terra V.C., Oliveira J.A., Garcia-Cairasco N. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). *Behav. Genet.* 2003; 33:33-42.
- Dorofeeva N.A., Glazova M.V., Khudik K.A., Nikitina L.S., Kirillova O.D., Chernigovskaya E.V. Comparative study of nigrostriatal systems in Wistar rats and rats prone to seizures. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2015;51:204-213. (in Russian)
- Eells J.B., Clough R.W., Browning R.A., Jobe P.C. 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.
- Errington A.S., Stohr T., Lees G. Voltage gated ion channels: targets for anticonvulsant drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005;5:15-30.
- Fadiukova O.E., Kuzenkov V.S., Krushinsky A.L., Koshelev V.B. Krysy Krushinskogo–Molodkinoy – model narusheniy mozgovogo krovoobrashcheniya: ishemicheskoe prekontsionirovanie i ustoychivost k zvukovomu stressu [Rats of the Krushinsky–Molodkina strain as a model of brain circulatory disturbances: ischemic preconditioning and acoustic stress resistance]. *Formirovanie povedeniya zhyvotnykh v norme i patologii. K 100-letiyu so dnya rozhdeniya L.V. Krushinskogo [The Development of Animal Behavior: Normal and Abnormal Aspects. On the 100<sup>th</sup> Anniversary of L.V. Krushinsky's birth]*. Moscow: Yazyki Slavianskoy Kultury Publ., 2013;392-404. (in Russian)
- Faingold C.L. Neuronal networks in the genetically epilepsy-prone rats. *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 C.L., Randall M.E. 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.
- Fedotova I.B., Kostyna Z.A., Poletaeva I.I., Kolpakov V.G., Barykina N.N., Aksenovich T.I. Genetic analysis of the predisposition to audiogenic seizure fits in Krushinsky–Molodkina rat strain. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2005;41:1487-1494. (in Russian)
- Fedotova I.B., Kostyna Z.A., Surina N.M., Poletaeva I.I. Laboratory rat selection for the trait “the absence of audiogenic seizure proneness”. *Genetika = Genetics (Moscow)*. 2012;48:685-691. (in Russian)
- Fedotova I.B., Nikolaev G.M., Kostyna Z.A., Poletaeva I.I. Remote effects of short-term neonatal hyperthermia in the Krushinsky–Molodkina rat strain prone to audiogenic seizures. *Doklady akademii nauk = Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. 2017;472: 109-111. (in Russian)
- Fedotova I.B., Semiokhina A.F. Developmental changes in audiogenic epilepsy and myoclonus in KM rats. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2002;52:261-265. (in Russian)

- Fedotova I.B., Semiokhina A.F., Fless D.F., Arkhipova G.V. The effect of difenin, valproate and phenobarbital on the development of an epileptiform seizure attack in Krushinsky–Molodkina rats. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 1996;46:1104-1108. (in Russian)
- Fedotova I.B., Surina N.M., Malikova L.A., Raevskii K.S., Poletaeva I.I. The investigation of cataleptic muscle tonus changes in rats after audiogenic seizures. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 2008;58:620-627. (in Russian)
- Fedotova I.B., Surina N.M., Nikolaev G.M., Poletaeva I.I. Subthreshold corazol doses induced generalized seizures in audiogenic seizure-prone rats. *Int. J. Neurol. Brain Disord*. 2016;3:1-6. DOI 10.15436/2377-1348.16.954.
- Ferraro T., Buono R. Polygenic epilepsy. *Adv. Neurol.* 2006;97:389-398.
- Firstova J.J., Abaimov D.A., Surina N.M., Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Kovalev G.I. Binding of specific ligands by D2- and NMDA-receptors of striatum cells in two rat strains predisposed and resistant to audiogenic seizures. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;154:196-198. (in Russian)
- Fless D.A., Zorina Z.A., Zinina C.A. The hippocampal electric excitation level is connected to the inhibition process in audiogenic epilepsy. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 1970;20:139-143. (in Russian)
- Galvis-Alonso O.Y., Cortes De Oliveira J.A., Garcia-Cairasco N. Limbic epileptogenicity, 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. 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.
- Guy N., Teillet M.A., Schuler B., Le Gal La Salle G., Le Douarin N., Naquet R., Batini C. Pattern of electroencephalographic activity during light induced seizures in genetic epileptic chicken and brain chimeras. *Neurosci. Lett.* 1992;145:55-58.
- Heron S., Scheffer I., Berkovic S., Dibbens L., Mulley J. Channelopathies in idiopathic epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2007;4:295-304.
- Italiano D., Striano P., Russo E., Leo A., Spina E., Zara F., Striano S., Gambardella A., Labate A., Gasparini S., Lamberti M., De Sarro G., Aguglia U., Ferlazzo E. Genetics of reflex seizures and epilepsies in humans and animals. *Epilepsy Res.* 2016;121:47-54.
- Kosacheva E.S., Kudrin V.S., Fedotova I.B., Semiokhina A.F., Raevskii K.S. The effect of carbamazepine on the content of monoamines and their metabolites in the brain structures of rats with audiogenic epilepsy. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*. 1998;61:25-27. (in Russian)
- Koshelev V.B., Krushinsky A.L., Riasina T.V., Lozhnikova S.M., Sotskaia M.N. Effect of short-term adaptation to hypoxia on the development of acute cerebral circulatory disorders in rats genetically predisposed to epilepsy. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1987; 103:373-376. (in Russian)
- Koshelev V.B., Krushinsky A.L., Sotskaia M.N. Protective effects of hypoxic preadaptation on animal lethality from acute circulatory disturbances developed in response to strong brain excitation. *Doklady AN SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1984;276:1274-1276. (in Russian)
- Krushinsky L.V., Efuni S.N., Demurov E.A., Fless D.A., Semiokhina A.F., Gay E.M., Tepliakov V.T. The protective effect of hyperbaric oxygenation for acute circulatory disorders in rats. *Doklady AN SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1980;255:1016-1018. (in Russian)
- Mulley J.C., Scheffer I.E., Petrou S., Berkovic S.F. Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* 2003;16:171-176.
- Naquet R., Silva-Barrat C., Menini C. Reflex epilepsy in the Papio-papio baboon, particularly photosensitive epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci.* 1995;16:119-125.
- N'Gouemo P., Faingold C.L., Morad M. Calcium channel dysfunction in inferior colliculus neurons of the genetically epilepsy-prone rat. *Neuropharmacology*. 2009a;56:665-675.
- N'Gouemo P., Yasuda R.P., Faingold C.L. Protein expression of small conductance calcium-activated potassium channels is altered in inferior colliculus neurons of the genetically epilepsy-prone rat. *Brain Res.* 2009b;1270:107-111.
- Paz J.T., Huguenard J.R. Optogenetics and epilepsy: past, present and future. *Epilepsy Curr.* 2015;15:34-38. DOI 10.5698/1535-7597-15.1.34.
- Poletaeva I.I., Fedotova I.B., Surina N.M., Kostina Z.A. Audiogennaya epilepsiya – biologicheskii fenomen i eksperimental'naya model epilepsii u cheloveka [Audiogenic epilepsy: biological phenomenon and experimental model of human epilepsy]. *Formirovaniye povedeniya zhivotnykh v norme i patologii. K 100-letiyu so dnya rozhdeniya L.V. Krushinskogo [The Development of Animal Behavior: Normal and Abnormal Aspects. On the 100<sup>th</sup> Anniversary of L.V. Krushinsky's birth]*. Moscow: Yazyki slavyanskoy kultury Publ., 2013;351-391. (in Russian)
- Poletaeva I.I., Perepelkina O.V., Boyarshinova O.S., Lil'p I.G., Markina N.V., Timoshenko T.V., Revishchin A.V. Neonatal injections of pharmacological agents and their remote genotype-dependent effects in mice and rats. *Ontogenez = Ontogeny (Moscow)*. 2012;43:387-400. Review. (in Russian)
- Poletaeva I.I., Surina N.M., Ashapkin V.V., Fedotova I.B., Merzalov I.B., Perepelkina O.V., Pavlova G.V. Maternal methyl-enriched diet in rat reduced the audiogenic seizure proneness in progeny. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2014;127:21-26.
- Poletaeva I.I., Surina N.M., Kostina Z.A., Perepelkina O.V., Fedotova I.B. The Krushinsky–Molodkina rat strain: The study of audiogenic epilepsy for 65 years. *Epilepsy Behav.* 2015;27. PII S1525-5050(15)00251-6.
- Raevsky K.S., Bashkatova V.G., Kosacheva E.S., Kudrin V.S., Semiokhina A.F., Fedotova I.B. Carbamazepine effects on aminoacid neurotransmitter content and lipid peroxidation products in brain divisions of rats with audiogenic epilepsy. *Neyrokhimiya = Neurochemistry*. 1998;15:281-285.
- Raisinghani M., Faingold C.L. Pontine reticular formation neurons are implicated in the neuronal network for generalized clonic seizures which is intensified by audiogenic kindling. *Brain Res.* 2005;1064: 90-97.
- Reigel C.E., Dailey 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.
- Ribak C.E., Roberts R.C., Byun M.Y., Kim H.L. Anatomical and behavioral analyses of the inheritance of audiogenic seizures in the progeny of genetically epilepsy-prone and Sprague-Dawley rats. *Epilepsy Res.* 1988;9:345-355.
- Romanova L.G., Poletaeva I.I., Remus B. The analysis of audiogenic sensitivity in rats by means of diallel cross. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 1976;26:772-777. (in Russian)
- Ross K.C., Coleman J.R. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2000;24:639-653.
- Sarkisova K.Y., Fedotova I.B., Surina N.M., Nikolaev G.M., Perepelkina O.V., Kostina Z.A., Poletaeva I.I. Genetic background contributes to the co-morbidity of anxiety and depression with audiogenic seizure propensity and responses to fluoxetine treatment. *Epilepsy Behav.* 2017;68:95-102.
- Semiokhina A.F. Cortical-subcortical relationships in spreading neocortical depression. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity*. 1969;19:143-149. (in Russian)
- Semiokhina A.F., Fedotova I.B., Poletaeva I.I. Rats of the Krushinsky–Molodkina strain: studies of audiogenic epilepsy, circulatory

- disorders, and behavior. Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 2006;56:249-267. (in Russian)
- Skradski S.L., White H.S., Ptáček L.J. Genetic mapping of a locus (mass1) causing audiogenic seizures in mice. Genomics. 1998;49: 188-192.
- Solius G.M., Revishchin A.V., Pavlova G.V., Poletaeva I.I. Audiogenic epilepsy and the GABAergic system of the colliculus inferior in Krushinsky–Molodkina rats. Doklady akademii nauk = Proceedings of the Russian Academy of Sciences. 2016;466:237-240. DOI 10.1134/S1607672916010099.
- Sorokin A.Ia., Kudrin V.S., Klodt P.M., Tuomisto L., Poletaeva I.I., Raevskii K.S. The interstrain differences in the effects of D-amphetamine and raclopride on dorsal striatum dopaminergic system in KM and Wistar rats (microdialysis study). Genetika = Genetics (Moscow). 2004;40:846-849.
- Sukhotinsky I., Chan A.M., Ahmed O.J., Rao V.R., Gradinaru V., Ramakrishnan C., Deisseroth K., Majewska A.K., Cash S.S. Optogenetic delay of status epilepticus onset in an *in vivo* rodent epilepsy model. PLoS ONE. 2013;8:e62013. DOI 10.1371/journal.pone.0062013.
- Surina N.M., Fedotova I.B., Kulikov A.V., Poletaeva I.I. Pinch-induced catalepsy in rats of various genetic groups with different predisposition to audiogenic epilepsy. Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity. 2010;60:364-371. (in Russian)
- Turner I.M., Newman S.M., Louis S., Kutt H. Pharmacological prophylaxis against the development of kindled amygdaloid seizures. Ann. Neurol. 1977;2:221-224.
- Venediktova N.I., Gorbacheva O.S., Belosludtseva N.V., Fedotova I.B., Surina N.M., Poletaeva I.I., Kolomytkin O.V., Mironova G. Energetic, oxidative and ionic exchange in rat brain and liver mitochondria at experimental audiogenic epilepsy (Krushinsky–Molodkina model). J. Bioenerg. Biomembr. 2017. DOI 10.1007/s10863-016-9693-5.
- Vinogradova L.V. Audiogenic kindling and secondary subcortico-cortical epileptogenesis: Behavioral correlates and electrographic features. Epilepsy Behav. 2015. PII S1525-5050(15)00345-5. DOI 10.1016/j.yebeh.2015.06.014.
- Vlasov S.V., Storozhenko I.V., Khak A.D., Koshelev V.B., Ryassina T.V., Medvedev O.S. The cardiovascular reactions during audiogenic seizures in rats genetically predisposed to epilepsy. Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni I.M. Sechenova. = Sechenov Physiological Journal of the USSR. 1991;77:52-58. (in Russian)
- Wagner F.B., Truccolo W., Wang J., Nurmikko A.V. Spatiotemporal dynamics of optogenetically induced and spontaneous seizure transitions in primary generalized epilepsy. J. Neurophysiol. 2015;113: 2321-2341. DOI 10.1152/jn.01040.2014.
- Walker M.C., Schorge S., Kullmann D.M., Wykes R.C., Heeroma J.H., Mantoan L. Gene therapy in status epilepticus. Epilepsia. 2013; 54(6):43-45. DOI 10.1111/epi.12275.
- Yechikhov S., Morenkov E., Chulanova T., Godukhin O., Shchipakina T. Involvement of cAMP- and Ca(2+)/calmodulin-dependent neuronal protein phosphorylation in mechanisms underlying genetic predisposition to audiogenic seizures in rats. Epilepsy Res. 2001; 46:15-25.
- Zhao M., Alleva R., Hongtao H., Daniel A.G.S., Schwartz T.H. Optogenetic tools for modulating and probing the epileptic network. Epilepsy Res. 2015;116:15-26. DOI 10.1016/j.eplepsyres.2015.06.010.
- Zhulin V.V., Pleskacheva M.G. Binding of GABA and diazepam in the brain of the Krushinsky–Molodkina rat strain. Neyrokhiimiya = Neurochemistry. 1991;10:10-17. (in Russian)