

Сборник трудов XXV научной школы-конференции молодых ученых
по физиологии и высшей нервной деятельности и нейрофизиологии

[предварительная версия]

Москва

27 – 28 октября 2021 г.

УДК 577.25

ПОВЫШЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК
ГЛИОБЛАСТОМЫ 101/8 ПРИ ОТСРОЧЕННОМ НАЧАЛЕ ЛЕЧЕНИЯ
ДОКСОРУБИЦИНОМ

А.И.Алексеева¹, А.С.Халанский², С.Ф.Дрозд³, Г.В.Павлова^{1,3}

¹*ФГБУН Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

²*ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, Россия*

³*ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им Н.Н. Бурденко, Москва, Россия*

⁴*ООО «Технология лекарств», Химки, Московская область, Россия*

⁵*РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия*

Email: mariott@bk.ru

Аннотация: Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток является одной из наиболее значимых проблем современной нейроонкологии, приводящей к снижению эффективности химиотерапевтических препаратов. В работе проводили оценку уровня экспрессии маркеров множественной лекарственной устойчивости в глиобластоме 101/8 после терапии доксорубицином в отсроченный период начала.

Ключевые слова: глиобластома, доксорубицин, экспериментальная глиобластома 101/8

Мультиформная глиобластома (ГБМ) –злокачественное новообразование головного мозга, с крайне неблагоприятным прогнозом лечения. ГБМ составляет 14,7% всех первичных опухолей ЦНС и 47,7% среди злокачественных опухолей ЦНС. Средняя продолжительность жизни пациентов без лечения составляет 13 месяцев с момента постановки диагноза, а 5-ти летняя выживаемость составляет 5,6%. Низкая эффективность лечения ГБМ связана с особенностями локализации опухоли (невозможность полного иссечения опухоли хирургическим путем), низкой эффективностью химиотерапевтических препаратов, обусловленной наличием

гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и резистентностью опухолевых клеток, поздней постановкой диагноза и высоким метастазированием [1].

Существенной проблемой лечения ГБМ является низкоэффективная диагностика опухолей у пациентов и поздний период начала терапии, когда опухолевый узел уже не поддается тотальной деструкции фармацевтическими препаратами или лучевыми методами терапии. Как следствие, происходит вторичное развитие и озлокачествление опухоли, возникновение перекрёстной резистентности опухолевых клеток.

Доксорубин – противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, используемый для терапии солидных новообразований. Доксорубин не используется для терапии глиобластомы, так как он не проникает в опухоль с интактным ГЭБ, однако, в экспериментах *in vitro* показана его высокая антипролиферативная активность. В последнее время большое распространение получили наносомальные формы доксорубина (Келикс[®], Нанодокс[™]), которые показывают высокую эффективность против глиобластомы [2]. Недостатком доксорубина, как и большинства цитостатиков является быстрое формирование множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Экспериментальная (интракраниальная) глиобластома 101/8 – это перевиваемый тканевой штамм, полученный путём пассирования химически индуцированной опухоли мозга крысы. По своим гистологическим характеристикам опухоль имеет устойчивое строение мультиформной глиобластомы человека [3[]].

Цель работы: Изучение изменения молекулярных маркеров глиобластомы 101/8, участвующих в формировании резистентности опухоли после терапии доксорубином с отсроченным периодом начала.

Материалы и методы: В эксперименте использовали самцов крыс Вистар (m=200-250 гр, n=40). Животным имплантировали глиобластома 101/8 в количестве 1,0 млн. клеток. Животные были разделены на две группы: «Без лечения» (n=20) и «Докс» (n=20). Животным группы «Докс» вводили водный

раствор доксорубина («Teva», Израиль) в дозе 1,5 мг/кг на 8, 11 и 14 дни после имплантации. На 18 день животных часть животных (n=10) из обеих групп, выбранных случайно забивали путём передозировки золетил (Virbac, Франция) и выделяли опухоль. Для анализа методом RT-PCR отбирали образцы центральной и периферической части опухоли. Для оценки изменения экспрессии генов МЛУ исследовали следующие маркеры: Abcb1b, Mgmt и Wnt3 (праймеры «Евроген», Россия; реагенты для проведения ПЦР «Синтол», Россия; амплификатор Bio-Rad CFX-96, США). Достоверность разницы определяли по критерию Коновера, различия считали достоверными при $p < 0,05$. Оставшихся животных использовали для оценки продолжительности жизни после проведенной терапии.

Результаты и обсуждение: Введение доксорубина животным с глиобластомой 101/8 вызвало существенное изменение уровня экспрессии всех изученных онкомаркеров в центральной области опухоли. Изменение маркеров в периферической части опухоли выражено слабее и в части случаев различия недостоверны. Отмечено повышение уровня экспрессии гена Abcb1b, кодирующего основной белок лекарственной резистентности р-гликопротеин в 5,8 раз. Уровень экспрессии гена Mgmt, участвующего в репарации повреждённой ДНК повысился 53,5 раза по сравнению с нелеченой опухолью, при этом уровень экспрессии гена не изменился на периферии. Отмечено изменение уровня гена Wnt3 в 2,8 раз. Полученные данные свидетельствуют о том, что доксорубин оказал воздействие только на центральную часть опухоли, где разрушен ГЭБ и препарат свободно достигает клеток. Периферическая часть опухоли имеет интактный ГЭБ, что препятствует воздействию доксорубина на клетки. Однако именно в периферической части наиболее выражены процессы развития опухоли (пролиферация клеток, неоангиогенез и инвазия). Увеличения уровня экспрессии маркеров резистентности в опухоли свидетельствует об озлокачествлении опухоли и формировании множественной лекарственной устойчивости, что

подтверждается отсутствием увеличения продолжительности жизни животных в группе после терапии доксорубицином.

Заключение: Таким образом, терапия доксорубицином в поздние сроки приводит к существенному озлокачествлению опухоли, повышает её резистентность и увеличивает пролиферативную активность опухолевых клеток.

Литература:

1. Hutóczki G, Virga J, Birkó Z, Klekner A. Novel Concepts of Glioblastoma Therapy Concerning Its Heterogeneity. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 16;22(18):10005. doi: 10.3390/ijms221810005

2. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm.* 2019;572:118733. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.118733

3. А.С. Халанский, Л.И. Кондакова Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8 I. Биологическая характеристика. Клиническая и экспериментальная медицина. 20136 №4 стр. 63-68

INCREASED RESISTANCE OF GLIOBLASTOMA 101/8 TUMOR CELLS WITH DELAYED INITIATION OF DOXORUBICIN TREATMENT

A.I.Alekseeva¹, A.S.Khalansky², S.F.Drozd³, G.V.Pavlova^{1,3}

¹ *Institute of higher nervous activity and neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Science Institute of Human Morphology, Moscow, Russia*

³ *Burdenko national medical research center of neurosurgery., Moscow, Russia*

Abstract: Multidrug resistance of tumor cells is one of the most significant problems of modern neurooncology, leading to a decrease in the effectiveness of chemotherapeutic drugs. The work evaluated the expression level of markers of multidrug resistance in glioblastoma 101/8 after doxorubicin therapy in the delayed onset period.

Key words: glioblastoma, doxorubicin, experimental glioblastoma 101.8

УДК 57.02

ИССЛЕДОВАНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ И ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ В ЗАДАЧЕ РАСПОЗНАВАНИЯ ПОЛОЖЕНИЯ ОБЪЕКТОВ У МЫШЕЙ

Алипов В.И.¹, Торопова К.А.^{1,2}, Ивашкина О.И.^{1,2}, Анохин К.В.^{1,3}

¹ *Институт Перспективных исследований мозга МГУ, Москва, Россия*

² *НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

³ *ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия*
E-mail: alipvladimir@yandex.ru

Аннотация: Исследование декларативной памяти является актуальным направлением нейрофизиологии. В настоящей работе проверялась возможность формирования кратковременной и долговременной памяти у лабораторных мышей в задаче распознавания нового положения объектов. Полученные результаты свидетельствуют о возможности сформировать оба вида декларативной памяти с использованием этой методики.

Ключевые слова: декларативная память, распознавание положения объектов, кратковременная память, долговременная память

Введение: В изучении механизмов формирования и хранения воспоминаний отдельный интерес представляет декларативная память, в частности потому, что её нарушение является основным проявлением многих нейродегенеративных заболеваний [1]. Моделирование различных форм памяти и их нарушений на лабораторных животных обладает рядом преимуществ перед исследованиями с участием людей-добровольцев, включая возможность в полной мере контролировать условия эксперимента, а также выполнять широкий спектр манипуляций, в том числе применять методы генной инженерии. Для оценки параметров декларативной памяти у человека можно использовать широкий спектр опросников и когнитивных тестов, на животных же для этого используют поведенческие тесты. Одним из вариантов оценки декларативной памяти у лабораторных животных являются тесты на распознавание новых объектов (РНО) или на распознавание нового положения объектов (РПО) у грызунов [2,3]. Методика заключается в помещении животного в знакомую ранее арену с двумя или более новыми объектами в сеансе обучения, а в сеансе тестирования – в замене одного объекта незнакомым (в РНО) или перемещении одного из объектов в новое положение (в РПО). Предполагается, что если животное при обучении запомнило объекты и их положение, то во время тестирования оно больше времени будет

проводить, обследуя перемещенный или новый объект, поскольку измененный объект будет обладать большей новизной для животного. Отдельным преимуществом данной методики является отсутствие положительного или отрицательного подкрепления, что приближает память, формирующуюся в данной задаче, к декларативной памяти у человека. Было показано, что успешность распознавания объектов зависит от активности специфических областей головного мозга, в частности гиппокампа, поэтому РНО и РПО широко используются в оценке нейротропных эффектов лекарственных средств и в фундаментальных исследованиях нейронального обеспечения декларативной памяти [4]. В настоящее время данные тесты используются для различных модельных животных, начиная от рыб, заканчивая приматами [5].

Целью данной работы является проверка возможности формирования памяти у мышей в парадигме РПО. Для этого нами в независимых экспериментах проводилась оценка способности мышей сформировать кратковременную память (КВП) (сохраняется в течение нескольких часов после обучения) и долговременную память (ДВП) (сохраняется в течение не менее чем 24 часов после обучения).

Материалы и методы: В эксперименте участвовали 23 самца мышей линии C57Bl/6, которых разделили на две группы: животные, у которых тестировали КВП (N=14), и мыши, у которых тестировали ДВП (N=9). Обе группы проходили три этапа обучения в парадигме РПО.

Первый этап заключался в предобучении: животных для ознакомления помещали на 6 мин в пустую прямоугольную арену (33 x 40 см) со зрительными ориентирами на стенках. Через 24 часа при обучении животных возвращали в ту же арену на 15 мин, при этом в арене находились два новых объекта, которые представляли из себя деревянные арки, одна из которых была красного, другая зеленого цвета. Тестирование памяти проводили через 2 или 24 часа для групп КВП и ДВП соответственно. Тестирование проходило в той

же арене с теми же объектами, но один из них был перемещен в новое положение.

Видеорегистрацию и анализ поведения осуществляли в программе EthoVision ХТ 8.0 (Noldus). Для оценки обследования объектов регистрировали время, проведенное носом мыши в области рядом с объектом (3 см от краев объекта). Для этого автоматически выделяли точку, соответствующую кончику носа, на видеозаписи. Далее рассчитывали коэффициент предпочтения (КП) перемещенного объекта как меру памяти:

$$\text{КП} = \frac{T \text{ перемещенный объект}}{T \text{ общее для двух объектов}}$$

Полученные КП для этапа обучения и этапа тестирования сравнивали с помощью парного критерия Стьюдента на программном обеспечении GraphPad Prism.

Результаты : При тестировании кратковременной памяти нами был получен значимо более высокий уровень предпочтения перемещенного объекта в тесте по сравнению с обучением ($p = 0,0026$) (рис. 1).

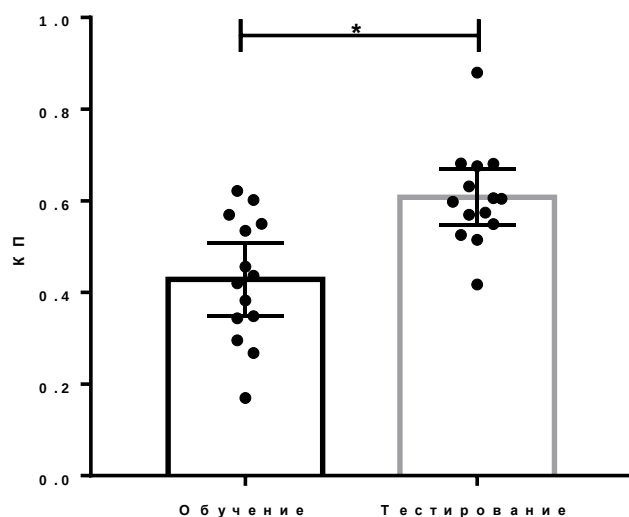


Рисунок 1. Сравнение коэффициента предпочтения перемещенного объекта при обучении и тестировании кратковременной памяти через 2 часа. Здесь и далее данные представлены как среднее $\pm$ 95%-ный доверительный интервал,

точками показаны индивидуальные значения. * - $p < 0,01$, парный критерий Стьюдента.

При тестировании долговременной памяти нами также было показано значимое предпочтение перемещенного объекта по сравнению с сессией обучения ($p = 0,016$) (рис. 2).

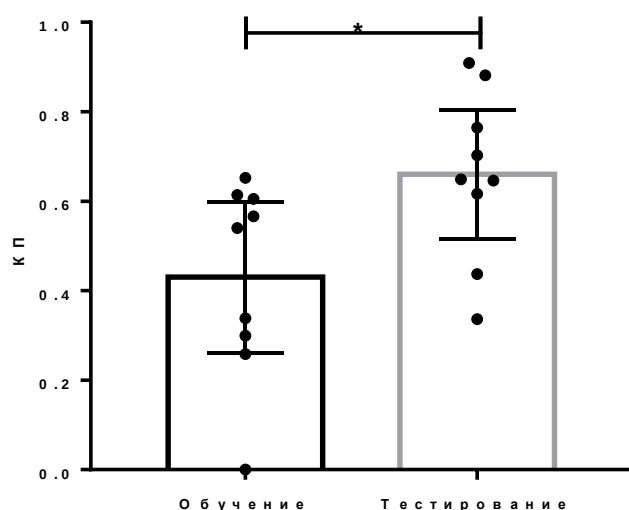


Рисунок 2. Сравнение коэффициента предпочтения перемещенного объекта при обучении и тестировании долговременной памяти через 24 часа. * - $p < 0,05$, парный критерий Стьюдента.

Закключение: Полученные результаты свидетельствуют о том, что методика РПО позволяет формировать как кратковременную, так и долговременную память у лабораторных мышей.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

Список литературы

1. Kumar A, Sidhu J, Goyal A, et al. Alzheimer Disease. [Updated 2021 Aug 11]
2. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. Behav Brain Res. 2010 Dec 31;215(2):244-54. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.036. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20060020.
3. Benice TS, Raber J. Object recognition analysis in mice using nose-point digital video tracking. J Neurosci Met. 2008;168:422–430. doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.11.002.

4. Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem.* 2010;17:5–11. doi: 10.1101/lm.1650110.
5. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process.* 2012;13(2):93-110. doi:10.1007/s10339-011-0430-z

NOVEL OBJECT LOCATION BEHAVIORAL TASK IN MUS MUSCULUS MEMORY STUDIES

Alipov V.I.¹, Toropova K.A.^{1,2}, Ivashkina O.I.^{1,2}, Anokhin K.V.^{1,3}

¹*Institute for Advanced Brain Studies of the Moscow State University, Moscow, Russia*

²*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia*

³*Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia*

Abstract:

The study of declarative memory is a topical area of neurophysiology. In the present work, we tested the possibility of short-term and long-term memory formation in laboratory mice in the novel object location task. The results indicate the possibility of forming both types of declarative memory using this method.

Key words: declarative memory, novel object location, short-term memory, long-term memory

УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ ПОТРЕБЛЯЕМОГО РАСТВОРА ЭТАНОЛА НА УРОВЕНЬ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ В ПРИЛЕЖАЩЕМ ЯДРЕ У САМОК КРЫС DAT-НЕТ И WISTAR В УСЛОВИЯХ СВОБОДНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ.

Антонова И.В.¹, Веракса А.Е.¹, Громова Г.Е.^{1,2}

¹ – *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН*

² – *Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена*
Email: risha.irina999@mail.ru

Аннотация: Механизмы формирования алкогольной зависимости до сих пор не являются полностью изученными, поэтому исследование роли дофаминовой системы в формировании и развитии алкогольной зависимости относится к числу актуальных в нейрофизиологии и психиатрии. Использование крыс DAT-НЕТ в качестве экспериментальной модели нарушения работы дофаминовой системы могут дать представление о мозговых механизмах формирования психоневрологических заболеваний и зависимостей. В данном исследовании изучалась связь между высоким уровнем потребления раствора этанола и увеличением количества тирозингидроксилазы в прилежащем ядре мозга самок крыс DAT-НЕТ и Wistar.

Ключевые слова: алкогольная зависимость, крысы DAT-NET, дофамин, самки

Известно, что нарушения в работе дофаминовой системы мозга приводят к ряду психических расстройств, таких как синдром дефицита внимания и гиперактивности, шизофрения, депрессия и др. [1]. Кроме этого, дофаминовая система играет ключевую роль в формировании алкогольной зависимости, так как является частью системы награды и подкрепления. В частности, нарушение регуляции мезолимбической части дофаминовой системы является фактором высокого риска увеличения потребления алкоголя [2]. Мезолимбический путь, контролирующей систему награды и подкрепления, состоит из дофаминергических нейронов, локализованных в области вентральной покрышки среднего мозга (VTA - ventral tegmental area), которые посылают отростки в область прилежащего ядра (nAcc - nucleus accumbens), где осуществляется выведение дофамина (DA). Показано, что у крыс-нокаут по гену, кодирующему мембранный белок обратного захвата DA (DAT-NET), происходит накопление DA в пресинаптической щели, и, как следствие, его трёхкратное увеличение во внеклеточной среде у данной группы животных по сравнению с крысами дикого типа [3], что делает модель DAT-NET удобной для изучения психоневрологических расстройств и алкогольной зависимости. Предполагается, что роль дофамина в формировании предпочтения алкоголя связана не только с нарушениями работы переносчика, но и с общими изменениями метаболизма катехоламинов. Субстратспецифичный фермент тирозингидроксилаза (ТГК) контролирует синтез дофамина и других катехоламинов, иммуногистохимические исследования локализации данного фермента наиболее информативны для изучения дифференцировки, локализации и развития дофаминергических нейронов. Целью работы являлось исследование влияния длительного добровольного спаивания на уровень потребления р-ра этанола и содержание ТГК в иммунопозитивных отростках нейронов области прилежащего ядра у крыс самок DAT-NET и Wistar.

Методика: в эксперименте использовали самок крыс-гетерозигот (DAT-HET) (n= 11) и Wistar (n=9 – контрольная группа). Животные содержались на стандартном рационе по три особи в клетке размером 570*350*250 мм со свободным доступом к пище и поилке в условиях освещенности: 12 ч свет, 12 темнота, Т 22°C и 55% влажности. На протяжении четырех месяцев всем животным в качестве раствора для питья были предоставлены вода и 10% раствор этанола, что соответствовало условиям свободной алкоголизации. Для оценки потребления р-ра этанола использовался тест «Суточная проба»: каждая крыса размещалась отдельно в клетке с двумя индивидуальными поилками с р-ром воды и спирта на 24 часа. Перед тестированием все крысы сутки находились в режиме водной депривации. После окончания тестирования регистрировалось количество выпитого р-ра спирта и воды у каждой особи. После окончания алкоголизации крысы были наркотизированы раствором хлорал гидрата (400 мг/кг), декапитированы и мозг был фиксирован 4%-ным раствором параформальдегида для иммуногистохимических исследований, которые проводили на замороженных фронтальных срезах, содержащих область nAcc, методом непрямого иммуномечения по ранее описанному протоколу [4]. Для реакции были использованы первичные антитела мыши против ТГ (Sigma, США) и вторичные Ig козы против мыши, конъюгированные с биотином (VectorLabs., Великобритания). Специфичность антител проверяли с помощью реакции без первичных или вторичных антител. С помощью микроскопа Carl Zeiss (Imager A1, Германия) получали микрофотографии из области nAcc, на которых с помощью программы фото-М оценивали оптическую плотность ТГ-иммунопозитивных отростков в условных единицах (у.е.). Статистическую обработку проводили с помощью Н-критерия Крускала–Уоллиса, и последующего апостериорного анализа межгрупповых различий по U-критерию Манна–Уитни с поправкой Холма–Бонферрони.

Результаты: Анализ результатов суточной пробы в конце эксперимента показал широкий разброс уровня потребления раствора спирта. В связи с этим,

животных разделили по данным количества выпитого спиртового раствора. Крыс, которые пили раствор больше среднего значения по группе, отнесли к многопьющим животным, остальных отнесли к малопьющим. По результатам среднего значения выпитого раствора этанола по пяти суточным пробам отмечено, что малопьющие и многопьющие самки DAT-HET демонстрируют достоверно более высокий уровень потребления р-ра этанола, в суточных пробах по сравнению с аналогичными группами Wistar ($p = 0,04$) (рис.1).

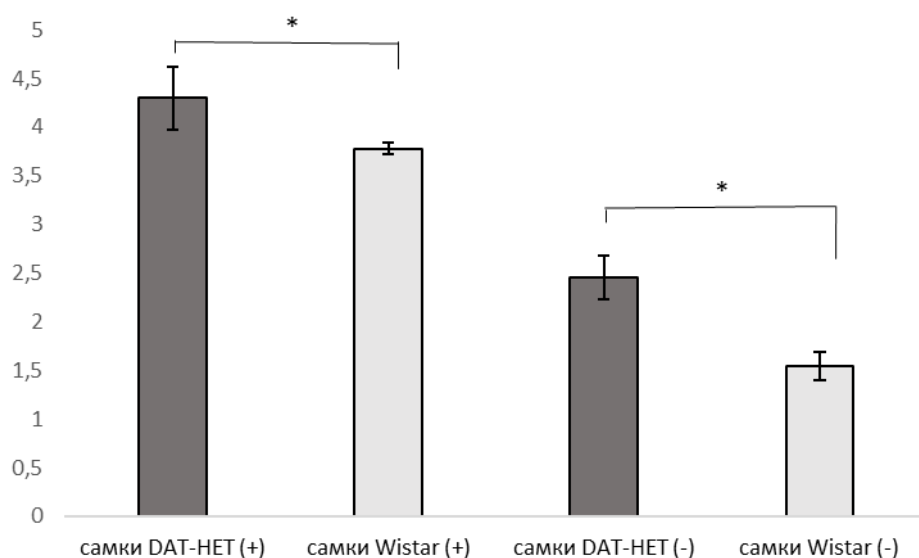


Рис. 1. Среднее количество потребляемого р-ра этанола за 5 суточных проб у исследуемых групп.

По оси абсцисс: группы крыс, по оси ординат: количество выпитого р-ра этанола на вес крысы, г/кг

знак «-» - малопьющие группы, знак «+» - многопьющие группы.

*— достоверные различия между группами по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$)

По результатам иммуногистохимического исследования было обнаружено, что количество ТГК в области nAcc у крыс изменялось в зависимости от уровня потребления раствора спирта. В nAcc у групп DAT-HET отмечен более высокий уровень ТГК, в частности у группы малопьющих самок DAT-HET по сравнению с малопьющими самками Wistar ($p = 0,003$), более интенсивная

реакция выявлена у группы многопьющих самок Wistar по сравнению с малопьющими самками Wistar ($p=0,039$) (рис.2).

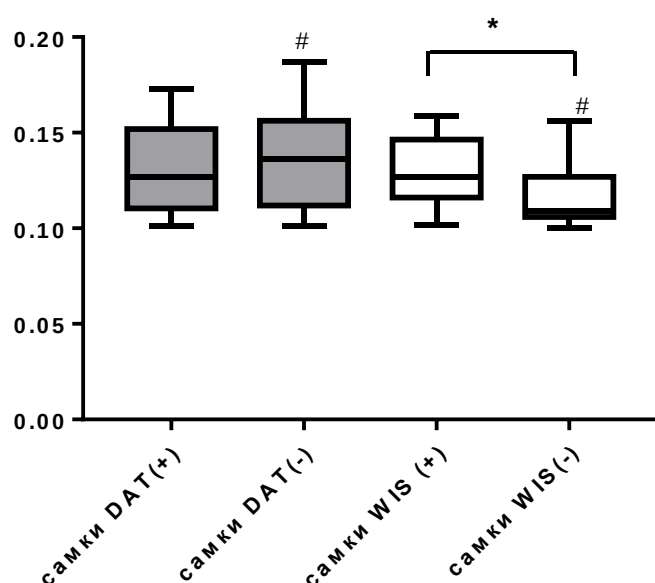


Рис.2. Количество тирозингидроксилазы в отростках дофаминергических нейронов в

прилежащем ядре у многопьющих групп крыс.

По оси абсцисс: группы крыс; по оси ординат: показатели оптической плотности

тирозингидроксилазы в у.е. знак «-» - малопьющие группы, знак «+» - многопьющие группы

*, # – достоверные различия между группами по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$)

Заключение: при анализе полученных данных не выявлено достоверных различий в уровне ТКГ у самок DAT-НЕТ в зависимости от уровня потребления раствора этанола, что может быть связано с нарушением биосинтеза DA, характерным для этой категории животных, однако подобные нарушения в работе дофаминовой системы также могут являться причиной большего потребления р-ра этанола в условиях алкоголизации в режиме

свободного выбора. Достоверные отличия в уровне ТКГ в зависимости от уровня потребления р-ра спирта между самками Wistar говорят о классическом влиянии этанола на дофаминовую активацию в системе награды, где он вызывает положительные эффекты подкрепления [5]. Таким образом, не смотря на увеличение уровня ТКГ по сравнению с контрольными группами, вероятно, у крыс DAT-HET система награды не является главной составляющей в формировании предпочтения этанола.

Работа выполнена при поддержке Госзадания № Госрегистрации АААА-А18-118012290373-

Литература:

1. Alcaro A., Huber R., Panksepp J. Behavioral Functions of the Mesolimbic Dopaminergic System: An Affective Neuroethological Perspective. // Psychology, Medicine. – 2007 – Brain Research Reviews. –2007– Vol.56 – PP. 283–321. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.07.014
2. Engel J.A., Jerlhag E. Alcohol: mechanisms along the mesolimbic dopamine system. // Prog Brain Res. – 2014 – Vol.211 – PP.201-33. doi: 10.1016/B978-0-444-63425-2.00009-X.
3. Cinque S., Zoratto F., Poleggi A., Leo D., Cerniglia L., et al. Behavioral Phenotyping of Dopamine Transporter Knockout Rats: Compulsive Traits, Motor Stereotypies, and Anhedonia. // Front Psychiatry. – 2018 – Vol.9 – P.43. doi: 10.3389/fpsy.2018.00043
4. Morina I. Yu., Stankova E. P. & Romanova I. V. Effects of Prenatal Stress on the Formation of the Orexinergic System of the Hypothalamus in Rats //Neuroscience and Behavioral Physiology. –2020– Vol.50(5) – PP. 607–617. doi:10.1007/s11055-020-00942-x
5. Charlet K., Beck A., Heinz A. The dopamine system in mediating alcohol effects in humans. // Current Topics in Behavioral Neurosciences. –2013 – Vol.1 – PP. 461-488. doi: 10.1007/7854_2011_130.

**THE EFFECT OF CONSUMED ETHANOL SOLUTION ON THE LEVEL OF
TYROSINE HYDROXYLASE IN THE NUCLEUS ACCUMBENS IN
FEMALE DAT-HET AND WISTAR RATS UNDER CONDITIONS OF FREE
ALCOHOLIZATION.**

Antonova I.V.¹, Veraksa A.E., G.E.¹ Gromova G.E.^{1,2}

1 – Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint-Petersburg, Russia

2 – Herzen State Pedagogical University, Saint-Petersburg, Russia

Abstract: The mechanisms of alcohol addiction formation are still not completely understood, so the research of the role of dopamine system in the formation and development of alcohol addiction is among the topical issues in neurophysiology and psychiatry. The use of DAT-HET rats as an experimental model of dopamine system dysfunction can provide insight into the brain mechanisms of neuropsychiatric disease and addiction formation. This study examined the relationship between high levels of ethanol solution consumption and an increase in tyrosine hydroxylase in the adjoining nucleus of the brain of female DAT-HET and Wistar rats.

Key words: alcohol dependence, DAT-HET rats, dopamine, females

УДК 576.35:591.481.1+616.831-001.31

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ВНЕ НЕЙРОГЕННЫХ ЗОН МОЗГА ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ У МЫШЕЙ

**Астахова О.Г.^{1,2}, Иванова А.А.^{1,2,3}, Комольцев И.Г.^{1,4}, Гуляева Н.В.^{1,4},
Лазуткин А.А.^{1,2}**

¹ *ФГБУН Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

² *Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва,
Россия*

³ *Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия*

⁴ *Бюджетное Учреждение Здравоохранения Научно-практический
психоневрологический центр им. З.П. Соловьёва Департамента
Здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия*

E-mail: lazutkin.a.a@gmail.com

Аннотация: Стволовые клетки нейрогенных зон мозга - основные кандидаты для повышения его регенеративного потенциала. Появление после травмы новых клеток в других частях мозга менее изучено. Нами была охарактеризована пролиферация клеток в ненейрогенных зонах после ЧМТ. Показано увеличение пролиферации в таламусе через 1, но не через 7 недель после травмы.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма; пролиферация; таламус

Введение: Повреждение нервной ткани – один из сильнейших стимулов, изменяющих работу стволовых клеток в мозге. В результате травмы может меняться общая производительность стволовых клеток, направление движения клеток-предшественников, их дифференцировка и даже области мозга, производящие такие клетки [1, 2, 3]. Работа стволовых клеток и судьба их потомства после травмы направлены на компенсацию повреждений нервной системы и, тем самым, ее частичной или полной регенерации. Для направленного увеличения регенеративной способности нервной ткани необходимо подобрать мишени, терапевтическое воздействие на которые приводило бы к максимальной эффективности восстановления нормальных функций мозга, не нарушая при этом другие аспекты работы нервной системы.

В большинстве случаев внимание при травме уделяется событиям, происходящим в нейрогенных областях взрослого мозга: субвентрикулярной зоне, ростральном миграционном потоке, субкалозальной зоне, зубчатой фации гиппокампа и полосатом теле [4]. Вместе с тем, в норме, делящиеся клетки равномерно распределены в небольшом количестве по всем структурам мозга [5, 6, 7, 8]. Возможная активация пролиферативной активности этих диффузно распределенных клеток могла бы послужить мишенью для модуляции регенеративного потенциала в головном мозге в ответ на травму.

Целью нашей работы было выявить области мозга, помимо нейрогенных зон, в которых происходит усиление пролиферативной активности в ответ на черепно-мозговую травму (ЧМТ) через 1 и 7 недель после нее, и определить фенотип клеток, за счет которых достигается повышение пролиферации.

Методика: В эксперименте использовали гетерозиготных самцов мышей линии Nestin-GFP (n=24) в возрасте 3-4 месяцев. Животных содержали в стандартных лабораторных клетках со свободным доступом к воде и корму. Для повреждения мозга применяли модель гидродинамического удара. Трепанацию черепа проводили электрическим трепаном в правой теменной кости, диаметр отверстия 4 мм, центр отверстия – между брегмой и лямбдой (-2 мм от брегмы). Удар силой около 2 атмосфер наносили с помощью прибора для жидкостной перкуссии, подключенного к голове мыши посредством пластиковой трубки. Через 1 или 7 недель с момента черепно-мозговой травмы животным внутрибрюшинно вводили EdU в дозе 40 мг/кг, спустя 2 ч после инъекции проводили транскардиальную перфузию и извлекали мозг. В качестве контрольных брали животных того же возраста без нанесения ЧМТ. Саггитальные срезы толщиной 50 мкм изготавливали на вибраторе из обоих полушарий. Далее на свободноплавающих срезах проводили выявление EdU методом клик-гистохимии и иммуногистохимическое окрашивание с помощью антител к клеточным маркерам Nestin, GFAP, Iba1, Ascl1, Olig2, NG2 и NeuN.

Для исследования пролиферации клеток в «ненейрогенных» зонах срезы снимали при помощи сканирующего микроскопа Olympus VS110 (объектив 10x). Для подсчёта EdU-положительных клеток использовали программу ImagePro 5.0, оценивали плотность клеток в различных структурах. Анализ проводили на двух уровнях: латеральном и медиальном. Медиальный уровень соответствовал месту повреждения (Lateral 1,08 – 1,92). Для анализа пролиферативной активности на этом уровне были выделены следующие «ненейрогенные» области мозга: стриатум, таламус, четверохолмие, мозжечок, ретикулярная формация, черная субстанция, ствол мозга, пириформная и моторная области коры. Латеральный уровень был выбран как наиболее удаленный от места травмы (Lateral 2,88 – 3,60). Этот уровень включил в себя стриатум, миндалину, зрительную, соматосенсорную, инсулярную и пириформную области коры. Для подсчёта для каждого полушария использовали по 3 среза с уровня, плотность клеток считали как отношение количества клеток к площади структуры, усреднённое для 3 срезов. В анализ не были включены энторинальная кора на латеральном уровне и миндалина, обонятельная луковица и гипоталамус на медиальном уровне, т.к. из-за особенностей резки не удалось набрать по три среза, содержащие эти структуры для всех животных. На медиальном уровне также не вошли в анализ зрительная, соматосенсорная и инсулярная области коры, расположенные на этом уровне в месте травмы. Также из анализа были исключены структуры, относящиеся к нейрогенным областям взрослого мозга: гиппокамп и субвентрикулярная зона – в связи с тем, что большое число клеток в этих областях не позволяло оценить их плотность использованными методами.

Для анализа колокализации делящихся клеток с различными маркерами съемку проводили с использованием микроскопа Olympus FV1000 (объектив 20x). Для съемки было отобрано по 1 срезу травмированного полушария на медиальном уровне, содержащему таламические ядра и зубчатую фасцию гиппокампа. Поиск колокализаций EdU-положительных клеток с маркерами пролиферации

проводили в программе Bitplane.Imaris 7.4.2. Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prizm 9.

Результаты: Было показано, что в правом полушарии спустя 1 неделю после ЧМТ плотность делящихся EdU^+ клеток была выше, чем в левом полушарии у мышей той же группы. На медиальном уровне различия были выявлены в стриатуме, миндалине, соматосенсорной и зрительной коре. На латеральном уровне изменения обнаружены в стриатуме, черной субстанции и моторной коре. Наиболее выраженные изменения в плотности EdU^+ клеток через 1 неделю после ЧМТ были найдены в таламусе. Через 7 недель после травмы не было выявлено отличий между полушариями ни в одной из исследованных структур. Так как увеличение плотности EdU^+ клеток в таламусе правого полушария через одну неделю после травмы оказалось особенно заметным, был проведён более детальный анализ этой области. Были проанализированы заднее латеральное, латеродорзальное, вентральное заднемедиальное и вентральное заднелатеральное ядра. Было показано увеличение плотности EdU^+ клеток в правом полушарии спустя 1 неделю после ЧМТ в каждом из этих ядер в сравнении как с контралатеральным полушарием той же группы, так и с травмированным полушарием через 7 недель после травмы.

Далее определяли фенотип EdU^+ клеток в таламусе и гранулярном слое зубчатой фации гиппокампа травмированного полушария, оценивая колокализацию со следующими маркерами: Nestin – маркером стволовых клеток и клеток-предшественников, GFAP – маркером незрелых и зрелых астроцитов и нейрональных стволовых клеток, Iba1 – маркером микроглии, NG2 и Olig2 – маркерами незрелых и зрелых олигодендроцитов, Ascl1 – маркером мигрирующих нейробластов и NeuN – маркером зрелых нейронов. Через 1 неделю после ЧМТ клетки $\text{EdU}^+/\text{Nestin}^+$ обнаружены во всех исследованных структурах, через 7 недель после травмы такие клетки были найдены только в гиппокампе, но не в таламических ядрах. При этом

количество EdU⁺/Nestin⁺ клеток в зубчатой фасции через 7 недель после травмы было ниже, чем через 1 неделю. Как через 1, так и через 7 недель после травмы в гиппокампе были найдены EdU⁺/GFAP⁺ клетки, количество которых в травмированном полушарии также было ниже через 7 недель по сравнению с 1 неделей после травмы. В таламусе EdU⁺/GFAP⁺ клеток выявлено не было ни через 1, ни через 7 недель после травмы. Колокализаций EdU⁺ клеток с другими маркерами через 7 недель после ЧМТ не было обнаружено больше ни в одной из проанализированных структур. Также не было выявлено колокализаций с другими маркерами в гиппокампе ни в одной из групп. Через 1 неделю после травмы во всех исследованных таламических ядрах были обнаружены колокализации EdU-положительных клеток с Iba1 и Olig2. Клетки, меченые Ascl и NG2 не были колокализированы с EdU ни в одной из анализируемых областей. Таким образом, нами была показана активация пролиферативной активности микроглиальных клеток и предшественников олигодендроцитов в таламических ядрах травмированного полушария через 1 неделю после ЧМТ. Также через 1 неделю после травмы было показано увеличение делящихся нервных стволовых клеток в зубчатой фасции гиппокампа.

Заключение: Было показано увеличение пролиферативной активности в ненейрогенных зонах травмированного полушария через 1, но не через 7 нед. после ЧМТ. Увеличение числа делящихся клеток было обнаружено в близких к месту травмы областях коры, а также ряде подкорковых структур. Выраженная активация пролиферативной активности была выявлена в ядрах таламуса. В таламических ядрах делящиеся клетки были обнаружены среди популяций микроглиальных клеток и предшественников олигодендроцитов.

Литература:

1. Christian KM, Song H, Ming GL. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. // Annu Rev Neurosci – 2014 – Vol. 37 – PP. – 243-62. doi: 10.1146/annurev-neuro-071013-014134.

2. Lepousez G, Nissant A, Lledo PM. Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. // *Neuron* – 2015 – Vol. 86 - № 2 – PP. – 387-401. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.002.
3. Lindvall O, Kokaia Z. Neurogenesis following Stroke Affecting the Adult Brain. // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2015 – Vol. 7 - № 11 – PP. – a019034. doi: 10.1101/cshperspect.a019034
4. Nemirovich-Danchenko NM, Khodanovich MY. New Neurons in the Post-ischemic and Injured Brain: Migrating or Resident? // *Front Neurosci.* – 2019 – Vol. 13 – PP. – 588. doi: 10.3389/fnins.2019.00588. PMID: 31275097; PMCID: PMC6591486.
5. Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. // *J Neurosci.* – 1999 – Vol. 19 - № 19 – PP. – 8487-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-19-08487.1999.
6. Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. // *J Cell Biol.* – 2005 – Vol. 168 – № 3 – PP. – 415-27. doi: 10.1083/jcb.200407053.
7. Sundholm-Peters NL, Yang HK, Goings GE, Walker AS, Szele FG. Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2005 – Vol. 64 - № 12 – PP. – 1089-100. doi: 10.1097/01.jnen.0000190066.13312.8f.
8. Shapiro LA, Ng K, Zhou QY, Ribak CE. Subventricular zone-derived, newly generated neurons populate several olfactory and limbic forebrain regions. // *Epilepsy Behav.* – 2009 – Vol. 1 - № 1 – PP. – 74-80. doi: 10.1016/j.yebeh.2008.09.011.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект» и гранта РФФИ 19-29-04173

CELL PROLIFERATION IN NON-NEUROGENIC AREAS OF THE BRAIN AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY IN MICE

**Astakhova O.G.^{1,2}, Ivanova A.A.^{1,2,3}, Komoltsev I.G.^{1,4}, Gulyaeva N.V.^{1,4},
Lazutkin A.A.^{1,2}**

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

³ *National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

⁴ *Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow, Russia*

E-mail: lazutkin.a.a@gmail.com

Abstract: Stem cells in the neurogenic brain areas are the main candidates for increasing regenerative potential. The origin of new cells from other brain parts after trauma is less studied. We characterized cell proliferation in non-neurogenic zones after traumatic brain injury. We showed an increase in thalamus proliferation 1 but not 7 weeks after injury.

Key words: Traumatic brain injury; proliferation; thalamus

УДК 159.955.2, 159.955.6

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИЛИ АКТУАЛИЗАЦИЯ ПОНЯТИЙ РАЗМЕРА И ФОРМЫ У УЧАЩИХСЯ НАЧАЛЬНОЙ ШКОЛЫ

Бирюкова В.С.¹, Белашов Е.А.¹, Голубева И.Ю.², Тихонравов Д.Л.^{1,3}

*1 Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург,
Россия*

2 Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

e-mail: vlbiryukova@mail.ru

Ключевые слова: формирование понятий, индуктивная и дедуктивная функции рассудка, учащиеся начальной школы.

Целью исследования было изучение скорости формирования эмпирических понятий размера и формы у учащихся начальных классов. У учащихся 1-2-ых классов скорости формирования понятий размера и формы достоверно не отличались друг от друга. У учащихся 3-4-ых классов скорость при формировании понятия размер достоверно была медленнее: 1. скорости при их формировании понятия форма контура; 2. скорости при формировании понятия размер у учащихся 1-2 классов.

ВВЕДЕНИЕ

В повседневной жизни человек и животные довольно часто сталкиваются с оценкой понятий большего/меньшего размера (хищник-жертва, конкурент-союзник и др.), а также плоской/объемной формы (плод-лист, 2D-3D изображения и др.). У детей 6-7 лет изучалась способность к выявлению общих признаков подкрепляемых изображений, что является основой для генерализации (индуктивной функции рассудка), обеспечивающей формирование понятия. Также изучалась способность относить изображения нового алфавита стимулов к уже сформированным понятиям, что, в свою очередь, является основой для категоризации (дедуктивной функции рассудка). В работе описаны особенности выполнения заданий у испытуемых с разными стратегиями поиска признаков [3]. Дедуктивная функция рассудка также изучалась с применением методики категоризации, адаптированной для детей младшего школьного возраста – «Свободная сортировка животных» и для школьников 5-х – 9-х классов средней школы – «Свободная сортировка слов» [1, 2]. В наших предыдущих работах [4, 5] мы изучали скорость формирования понятий у 4-5-летних детей. Однако, мы не нашли специальных работ, где бы сравнивалась скорость формирования или актуализации понятий размера и формы у учащихся начальной школы. **Целью исследования было изучение**

скорости формирования или актуализации эмпирических понятий размера и формы у учащихся начальных классов.

МЕТОДИКА

Участники исследования. Всего в исследовании участвовали 57 учащихся начальной общеобразовательной школы в возрасте от 6.5 до 11 лет. Исследование проводилось в Московской и Ленинградской областях. Участники исследования были разделены на две группы по классам: 1-2 класс (34 учащихся: 20 девочек и 14 мальчиков) и 3-4 класс (23 учащихся: 13 девочек и 10 мальчиков).

Контурные изображения для выбора. Гладкие и зубчатого контура изображения разной конфигурации были разного размера (большие, средние и малые). Количество изображений было достаточно большим для того, чтобы они реже повторялись во время опыта (по 20 штук на каждые 6 типов изображений и, соответственно, общее количество изображений составляло 120 штук).

Описание пробы. Любая проба (сочетание 4-х контурных изображений при одновременном их предъявлении) начиналась с опускания непрозрачного экрана: участник мог видеть изображения на планшете, но не мог до них дотянуться. Через 5 секунд опускался прозрачный экран, и испытуемый мог выбрать любую из этих 4-х изображений, сдвинув 1 карточку с изображением в сторону. Если он выбирал правильное изображение, то под ним в углублении лежало подкрепление (наклейка или пайетка). Если испытуемый ошибался, то он не получал подкрепления в этой пробе.

Формирование (актуализация) понятия «большого/меньшего размера» или понятия «гладкой/зубчатой формы контура». Исследовали самостоятельный выбор испытуемого (без инструкций со стороны исследователя) одного изображения из 4-х возможных. В каждой пробе предъявляли только два размера фигур. При формировании (актуализации)

понятия «большого» или «меньшего» размера использовали либо 4 изображения с гладким контуром, либо 4 изображения с зубчатым контуром, которые демонстрировались участнику одновременно в пробе. При формировании понятия «гладкой» или «зубчатой» формы контура использовали 4 фигуры одинакового размера. В обоих типах проб одна фигура отличалась от остальных либо размером, либо по форме соответственно (Рис.1). Именно эту отличающуюся от остальных фигуру должен был выбирать испытуемый, используя вначале метод «проб и ошибок».

Критерий обученности при формировании (актуализации) понятий. Мы обучали участников ежедневно до однократного достижения или превышения ими 70%-го уровня выполнения задачи за 1 опытный день. Каждый опытный день подсчитывали число проб с правильными и неправильными ответами и суммировали пробы только в те дни, когда уровень правильных ответов не достигал 70%-го критерия.

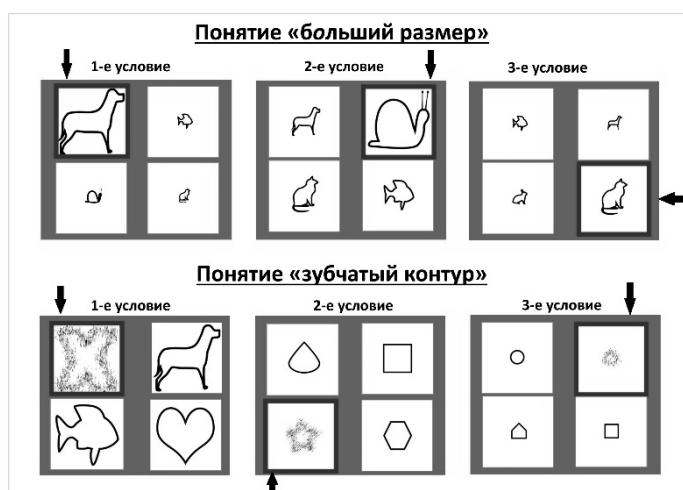


Рисунок 1. Примеры предъявления 4-х контурных изображений в трёх условиях при формировании понятий «большой размер» и «зубчатый контур». Верхняя панель: В данном примере при формировании понятия «большой размер» использовали только изображения с гладким контуром, которые отличались по размеру. Для формирования понятия «большой размер» предъявлялись пробы с различными изображениями в рамках 3-х условий: 1. большое изображение

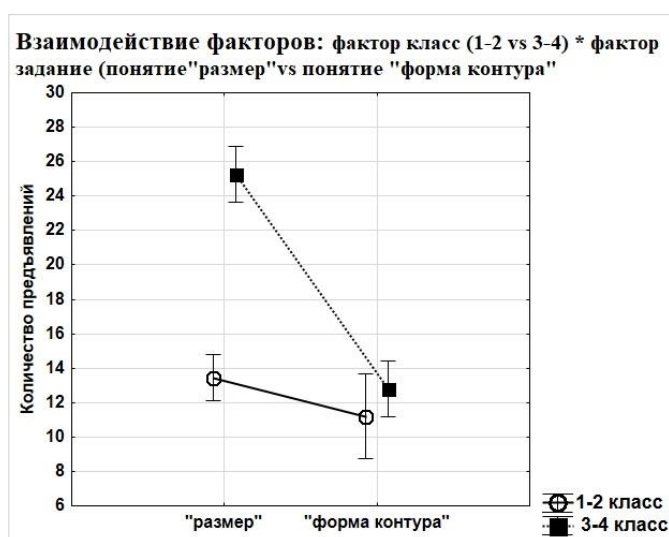
среди 3-х малых; 2. большое изображение среди 3-х средних; 3. среднее изображение среди 3-х малых. Нижняя панель: В данном примере при формировании понятия «зубчатый контур» использовали изображения только одного размера, которые отличались по форме контура. Для формирования понятия «зубчатый контур» предъявлялись пробы с различными изображениями в рамках 3-х условий: 1. большое изображение с зубчатым контуром среди 3-х больших изображений с гладким контуром; 2. среднее изображение с зубчатым контуром среди 3-х средних изображений с гладким контуром; 3. малое изображение с зубчатым контуром среди 3-х малых изображений с гладким контуром. Правильные ответы (обозначены стрелками) – изображения, отличные от 3-х других в пробе. От пробы к пробе менялось местоположение «правильных» изображений и сами изображения были разными.

Статистическая обработка материала. При анализе данных использовали статистический пакет программ StatSoft Statistica 10.0. Было установлено, что все выборки данных прошли тест нормальности и поэтому для обработки материала применяли двухфакторный критерий ANOVA (2-way ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано влияние фактора класс (1-2 и 3-4 классы) и фактора задание (понятие «размер» и понятие «форма контура») на скорость формирования понятий, измеренных в количестве предъявлений, необходимых для однократного достижения или превышения 70%-го уровня выполнения задачи. Эффект фактора класс был достоверным (2-way ANOVA: $F(1, 266)=52.55$, $P=0.00001$). Эффект фактора задание был значимым (2-way ANOVA: $F(1, 266)=63.56$, $P=0.00001$). Было выявлено достоверно значимое взаимодействие этих факторов (2-way ANOVA: $F(1, 266)=30.643$, $P=0.00001$).

У учащихся 1-2-ых классов скорости формирования или актуализации понятий размера и формы достоверно не отличались друг от друга ($P=0.39$, Tukey HSD post hoc test). Такой же эффект наблюдался у 4-5-летних детей. Это, вероятно, свидетельство того, что оба данных понятия одинаково важны для младшей группы испытуемых. У учащихся 3-4-ых классов скорость при формировании понятия размер достоверно была медленнее скорости при формировании понятия форма контура ($P<0.001$, Tukey HSD post hoc test). Скорость формирования или актуализации понятия размер у учащихся 3-4 классов была значительно медленнее, чем таковая у учащихся 1-2 классов ($P<0.001$, Tukey HSD post hoc test). Можно предположить следующие возможные причины, которые привели к задержке формирования понятия размера у учащихся 3-4-классов: 1. понятие форма контура может становиться важнее понятия размера; 2. в этом возрасте существует огромное количество разнообразных понятий и знаний, которые могли являться дистракторами при решении задач; 3. привычка выполнять чёткие инструкции педагогов, но в нашей задаче отсутствовали инструкции со стороны исследователя и учащимся приходилось самостоятельно искать решение задач.



ВЫВОДЫ

1. У учащихся 1-2-ых классов скорости формирования или актуализации понятий размера и формы достоверно не отличались друг от друга.
2. У учащихся 3-4-ых классов скорость при формировании понятия размер достоверно была медленнее скорости при формировании понятия форма контура.
3. Скорость формирования или актуализации понятия размер у учащихся 3-4 классов была значительно медленнее, чем таковая у учащихся 1-2 классов.

Исследование выполнено в рамках программы «Сириус. Лето: начни свой проект» при поддержке гранта РФФИ № 20-015-00269, а также в рамках государственных заданий № 0134-2019-0005 (ИФ РАН) и № 075-00776-19-02 (ИЭФБ РАН).

ЛИТЕРАТУРА

1. Будрина Е.Г. (2016). Когнитивный стиль узкий/широкий диапазон эквивалентности как индикатор способности к понятийному обобщению. Тезисы докладов Седьмой международной конференции по когнитивной науке. Светлогорск. 20-24 июня. С. 697-698.
2. Будрина Е.Г. (2010). Специфика интеллектуального развития подростков в условиях разных моделей обучения. Экспериментальная психология. 3(1):115-130.
3. Голубева И.Ю., Кузнецова Т.Г., Горбачева М.В., Булгакова О.С. (2017). Дифференцирование зрительных стимулов по разделительному признаку детьми 6-7 лет. Естественные науки. 1(58):42-48.
4. Голубева, И. Ю., Тихонравов Д.Л., Войтенков В.Б., Пашков А.Ю., Первунина Т.М. (2020). Сравнительное исследование формирования понятий с использованием реальных геометрических фигур и контурных изображений в качестве стимулов у детей в возрасте 4–5 лет. Трансляционная медицина. 7(5): 109-118.
5. Тихонравов Д.Л., Войтенков В.Б., Голубева И.Ю., Герасимов А.П., Пашков А.Ю. (2019). Применение методики формирования понятий размера и формы у детей дошкольного возраста для клинических исследований. Педиатр. Научно-практический журнал для врачей. 10(6): 45-52.

PECULIARITIES OF FORMATION OR ACTUALIZATION OF THE CONCEPTS OF SIZE AND SHAPE IN PRIMARY SCHOOL STUDENTS

Biryukova V.S.¹, Belashov E.A.¹, Golubeva I.Y.², Tikhonravov D.L.^{1,3}

*1 Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian
Federation, St. Petersburg, Russia*

*2 Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg,
Russia*

*3 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy
of Sciences, St. Petersburg, Russia*

Key words: formation of concepts, inductive and deductive functions of abstract thinking, primary school students

The goal was to study the rate of forming the empirical concepts of size and shape in primary school students. The rates of formation of the concepts of size and shape in the 1st-2nd-year pupils did not differ significantly from each other. For the 3rd-4th-year pupils, the rate of forming the concepts of size was significantly slower compared to: i. the rate of their forming the concept of contour shape; ii. the rate of forming the concepts of size in the 1st-2nd-year pupils.

УДК: 612.821.7: 159.963: 612.084

РАЗВИТИЕ МЕТОДИКИ ДВУСТОРОННЕЙ КОММУНИКАЦИИ СО СПЯЩИМ В СОСТОЯНИИ ОСОЗНАННОГО СНОВИДЕНИЯ

Блохина Т.И., Бакирова Д.Р., Дорохов В.Б.

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

Email: tblokhina167@gmail.com; vbzorokhov@mail.ru

Аннотация: Нами разработан метод двусторонней коммуникации со спящим испытуемым в состоянии осознанного сновидения. Арифметическая задача подавалась в аудио режиме. Опытный сновидец передавал ответ экспериментатору движениями глаз и дыханием. Полученный результат подтвержден в исследовании 2021 года, проведенном четырьмя международными группами.

Ключевые слова: сон, фаза БДГ, осознанные сновидения, сознание

Изучение сознания является важнейшей задачей когнитивных наук, необходимой для понимания механизмов функционирования психики человека. В качестве перспективной экспериментальной модели для изучения сознания многие исследователи рассматривают феномен осознанных сновидений (ОС) [1]. ОС – состояние измененного сознания во время сна, при котором спящий понимает, что в данный момент спит, характеризующееся совмещением признаков сна и бодрствования и возникающее как спонтанно, так и в результате намеренной практики. Хорошо известен метод верификации осознания во сне, введенный Стивеном Лабержем, по особым движениям глазами (специальный сигнал «лево-право-лево-право» [2], который, в сочетании с другими показателями полисомнограммы, считается достаточным для верификации состояния ОС. До сих пор такие контакты оставались односторонними: погрузившись в осознанное сновидение, люди могли сообщить об этом движениями глаз. Наше исследование, опубликованное в 2018 году [3], показало возможность двустороннего диалога со спящим в

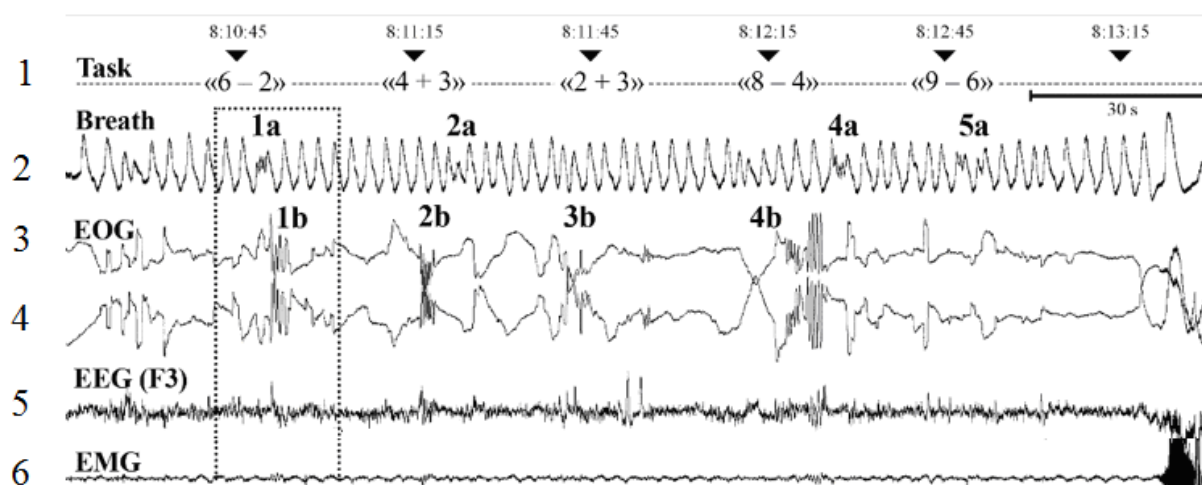
состоянии ОС. Позднее, в 2021 г., этот результат была подтвержден в исследовании, выполненном четырьмя международными независимыми лабораторными группами [4].

Методика и результаты российского исследования: ОС в подавляющем большинстве случаев происходят в фазу быстрого движения глаз (БДГ). В эту фазу сна тело спящего практически парализовано (ввиду мышечной атонии), за исключением мышц, отвечающие за дыхание и движение глаз. Поэтому в качестве сигналов обратной связи от спящего нами были выбраны движения глаза и учащенного дыхания.

В нашем исследовании принимал участие испытуемый с большим опытом осознания во сне (мужчина, 38 лет, без нарушений сна, не имеющий поражений центральной нервной системы). В качестве техники вызова осознанности применялась техника прерывания сна (после 2-3 циклов сна он просыпался, бодрствовал некоторое время, повторял план на эксперимент и ложился спать). После повторного засыпания через наушник ему начинали подаваться аудио-сигналы с постепенным увеличением громкости – это были заранее записанные инструкции голосом самого испытуемого, в которых содержались математические примеры (сложение или вычитание, корректное решение находилось в диапазоне от 2 до 10), команды по подаче ответа, а также общие фразы для поддержания осознанности во сне. Пример математического задания и команда по подаче ответа: «Сколько будет 6 минус 3? Подай сигнал дыханием, затем глазами». Пример напоминания об эксперименте: «Ты спишь! Это эксперимент! Вспомни про цель!». Полисомнограмма диалогового взаимодействия представлена на рисунке 1.

Рисунок 1. 1) Задание (Task-аудиозапись); 2,3,4) Ответы испытуемого (дыхание (Breath), две электроокулограммы (EOG - левый и правый глаз), 5) электроэнцефалограмма (EEG, отведение F3); 6) миограмма (EMG).

5 заданий: «6–2» и т.д.; 2,3,4) Ответы испытуемого: 2) дыхание 1a: 4 регулярных пика, короткие выдохи-вдохи и т.д.; 3,4) EOG. 1a, 1b - 4 движения глазами (вправо-влево), 2a, 2b – ответ на вопрос «4+3» сначала глазами, затем дыханием (в данном случае сигнал дыханием хуже различим). 3b: ответ на вопрос «2+3» только сигналом движения глаз, при этом неразборчиво (комментарий испытуемого: «сюжет сновидения сильно отвлек от диалога и осознанность понизилась»). 4a, 4b: ответ на вопрос «8–4» («осознанность к этому моменту вернулась на высокий уровень»). 5a: ответ на вопрос «9–6» дыханием («два раза, для уверенности, что сигнал будет четко зафиксирован»). После этого произошло пробуждение (резкое увеличение амплитуды EMG); весь опыт длился около трех минут, что нормально для ОС такого рода.



Всего с испытуемым была проведена регистрация 18 сессий ночного сна, при этом в 13 эпизодах фазы быстрого движения глаз (фазы БДГ) была зафиксирована осознанность с помощью поданных верифицирующих сигналов глазами и последующего подтверждения в самоотчете. В течение всех 13 эпизодов фазы БДГ были проведены попытки коммуникации с помощью запущенных аудио-фрагментов. В рамках 6 эпизодов были получены ответы от

испытуемого. В остальных случаях ответа не было, либо следовало пробуждение. Отдельная статистика в случае отсутствия ответов не велась (не фиксировалась их точное количество и причина – пробуждение или отсутствие реакции во сне). Однако отметим, что пробуждение после попытки коммуникации действительно было нередкой ситуацией, потому необходимо дорабатывать механизм мягкого подбуживания, который не будет столь существенно влиять на структуру сна. В том случае, если после задания испытуемый отвечал на вопрос, то следовала новая задача, а если просыпался, то в рамках текущего эпизода эксперимент прекращался. Так, например, в рамках одного эпизода было задано 5 вопросов, после которых произошло пробуждение – эта коммуникация зафиксирована на рисунке 1. Статистика эффективности коммуникации: всего было получено 10 ответов на задания, из них 6 правильных ответов (60%); 4 неправильных ответа (40%). Мы включили случаи практически верных ответов (не отличающихся более чем на единицу от верных) в число правильных, так как погрешность может быть связана со сложностью распознавания начала и конца движения на записи, особенно в случае движений глаз; таким образом уместно заключить, что испытуемый действительно отвечал со сравнимой или большей точностью, и коммуникация была успешной. После пробуждения испытуемый записывал самоотчет о том, что ему снилось и как проходила субъективная оценка коммуникации. В рамках данного эксперимента самоотчеты подтверждали факты осознания во сне, получение заданий и подачу сигналов.

Методика и результаты экспериментов в международном исследовании: Публикация объединяла результаты экспериментов по двусторонней коммуникации со спящими в 4 международных лабораториях (США, Германия, Голландия, Франция). Были использованы похожие подходы, как и в нашем исследовании, с вариацией конкретных методик. В качестве вопросов в рамках исследования давались простые арифметические задачи, вопросы с ответами

«да/нет», а также несколько более сложных сценариев. Для кодировки исходного вопроса авторы исследования использовали обычные голосовые задания, а также азбуку Морзе (с подачей сигналов звуком или светом). Ответы должны были подаваться с помощью движения глаз. Сигналы дыханием, как в нашем эксперименте, не использовались.

В исходную выборку исследования вошли 36 участников, среди которых были как опытные практики ОС, так и новички, которых специально тренировали для участия в эксперименте с помощью доступных техник вызова осознания во сне, кроме того, один из испытуемых был пациентом с диагностированной нарколепсией. Несмотря на применение различных техник вызова осознания во сне, было зафиксировано всего 15 верифицированных случаев ОС у 6 участников (17% всех испытуемых), с ними было проведено 158 попыток коммуникации (заданных вопросов) на подтвержденных ОС. На них было получено 29 правильных ответов (18,35%); 5 неправильных ответов (3,16%); 28 спорных ответов (17,72%); в 96 случаях зафиксировано отсутствие наблюдаемой реакции (60,76%). Отметим, что 21 из 29 верных ответов были получены у пациента с диагностированной нарколепсией.

Кроме того, исследователи провели еще 379 попыток коммуникации без подтверждения осознанности у спящего (без верифицирующего сигнала глазами об осознании). В результате был получен всего 1 корректный ответ; 1 некорректный, 11 спорных результатов и 366 случаев отсутствия реакции. Данная статистика косвенно указывает на то, что двусторонней коммуникации возможна только в состоянии ОС, так как в отсутствии осознанности во сне не стоит ожидать сознательной обработки входящего вопроса и реакции на него. Однако для полноценного подтверждения этой гипотезы требуется провести отдельное исследование по другим критериям.

Обсуждение: Рассмотренные исследования показывают возможность и применимость методики диалога с испытуемым в состоянии осознанного сновидения. В частности, подтверждено, что подготовленный испытуемый (сновидец) способен в состоянии, сходном по электрофизиологическим показателям с обычным сном в фазе БДГ: воспринимать внешние события; сознательно следовать своим планам; выполнять когнитивно сложные операции; передавать информацию внешнему наблюдателю. Эта методика создает новый канал коммуникации во время осознанного сновидения и может иметь разнообразное практическое применение, а также служить экспериментальной моделью для исследования механизмов измененного состояния сознания и сновидений.

Мы выделяем следующие недостатки в текущей методике диалога со сновидцем. Во-первых, низкая эффективность подачи сигналов. В нашем исследовании достаточно мало сигналов было встроено в сновидения, причем гипотеза о том, что постепенное увеличение громкости подаваемого аудиозаписи обеспечит больше стабильности, не подтвердилась. Наоборот, высокий уровень громкости аудио-сигналов часто приводил к пробуждению у испытуемого, который находился в этот момент в пограничном состоянии осознанности. Во-вторых, использование двух последовательных способов ответа (дыхание и сигналы глазами) значительно усложняет процесс диалога. Возможно, требуется индивидуальный выбор способа ответа. На основе этих предпосылок мы делаем вывод о том, что для эффективного диалога со сновидцем необходимо подбирать оптимальный уровень громкости подачи сигналов, а также требуется тщательный отбор опытных сновидцев, для получения статистически значимых результатов в повторных экспериментах, и желательно, в комфортных домашних условиях. Также отметим, что в случае международного исследования основная проблема коммуникации состояла в отсутствии какой-либо реакции на вопросы (62% результатов всех попыток).

Ведущий автор международного исследования, Карен Конколи, после публикации результатов сообщила, что среди тех испытуемых, кто не отреагировал на вопросы исследователей, около половины даже не вспомнили факт получения вопроса. Таким образом, необходимо найти баланс уровня громкости сигнала, который, с одной стороны, преодолевает барьер восприятия между сном и бодрствованием, но в то же время не прервет тонкое пограничное состояние осознанности во сне [5]. Возможно, эту настройку необходимо будет проводить в индивидуальном порядке с каждым испытуемым (в рамках предварительной подготовки к эксперименту).

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 20–013–00683а).

Литература

1. Voss, U., Schermelleh-Engel, K., Windt, J., Frenzel, C., Hobson, A., 2013. Measuring consciousness in dreams: The lucidity and consciousness in dreams scale. *Conscious Cogn*; 22(1):8-21. doi: 10.1016/j.concog.2012.11.001.
2. LaBerge S.P. et al. Lucid dreaming verified by volitional communication during REM sleep. *Percept. Mot. Skills*. 1981. Vol. 52. No 3. Pp. 727–732. doi: 10.2466/pms.1981.52.3.727
3. Миронов А.Ю., Синин А.В., Дорохов В.Б., Методика диалога со спящим испытуемым в состоянии осознанного сновидения с использованием дыхательных движений // Социально-экологические технологии. 2018. No 2. С. 83–107. doi: 10.31862/2500-2966-2018-2-83-107.
4. Konkoly et al. Real-time dialogue between experimenters and dreamers during REM sleep, *Current Biology* 31, 1–11, 2021. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.026
5. Hobson, A., The Neurobiology of Consciousness: Lucid Dreaming Wakes Up. *The Neurobiology of Consciousness*, 2(2), 2009. doi: 41–44. 10.11588/ijodr.2009.2.403

DEVELOPMENT OF METHODS FOR TWO-SIDED COMMUNICATION WITH A DREAMER IN THE STATE OF LUCID DREAMING

Blokhina T.I., Bakirova D.R., Dorokhov V.B.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract. We developed a method that allows two-way communication with a sleeping subject in a state of lucid dreaming. Math tasks were given via audio and the experienced lucid dreamer sent the result with the number of breaths and eye movements. This result was confirmed in the international research in 2021 by four sleep laboratories.

Key words: dreaming, sleep, REM sleep, lucid dreaming, state of consciousness

УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА
СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, Москва,

Россия

E-mail: multibroshka@mail.ru

Ключевые слова: ранний провоспалительный стресс, липополисахарид, социальное доминирование, социальное взаимодействие, агрессивность.

Исследовали социальное поведение взрослых крыс разного пола после раннего провоспалительного стресса в тестах на социальное взаимодействие, социальное доминирование и агрессивное поведение. Постнатальный стресс оказывал влияние только на самцов, увеличивая доминирование и мотивацию к социальному взаимодействию, не влияя на агрессивность крыс.

ВВЕДЕНИЕ. Известно, что воздействия в пренатальном и раннем постнатальном периоде развития могут приводить к увеличению уровня тревожности, депрессивности взрослых особей, повлиять на выработку и угашение условнорефлекторного страха. Данные о влиянии на социальное

поведение немногочисленны. Введение липополисахарида (ЛПС) матери на поздних сроках беременности приводило к появлению симптомов аутистического спектра и шизофреноподобных отклонений у потомства [Baharnoori et al., 2012; Foley et al., 2014; Lee et al., 2021]. Имеются данные об уменьшении социального взаимодействия после постнатального введения ЛПС [Kentner et al., 2018; MacRae et al., 2015]. Детальный анализ показал, что уменьшается взаимодействие за счет контактов, направленных к животному ЛПС группы, вероятно, из-за изменения их запаха. Высказывается гипотеза о влиянии иммунной системы на социальное поведение, в частности на уровень агрессии [Das et al., 2016]. Было показано, что у высокоагрессивных животных после стресса уровни провоспалительных цитокинов были выше, чем у низкоагрессивных животных [Alperina et al., 2019; Idova et al., 2016; Audet et al., 2010]. Сходные данные были получены и при исследовании пациентов с депрессией, которые демонстрировали повышенную агрессивность и высокий уровень провоспалительных цитокинов [Takahashi et al., 2018]. Целью нашей работы было исследовать влияние раннего постнатального введения ЛПС на различные аспекты социального поведения взрослых крыс: социальное доминирование, социальную мотивацию, агрессивное поведение.

МЕТОДИКА. В данной работе исследовали влияние раннего провоспалительного стресса на социальное поведение самцов и самок крыс линии Вистар в возрасте 3,5-5-ти месяцев. На 3 и 5-й день от рождения каждый помет делили на две части, половине крысят вводили бактериальный липополисахарид (50 мкг/кг, группа ЛПС) для создания раннего провоспалительного стресса, другой половине - физиологический раствор (группа ФИЗ, контроль).

Начинали исследование с теста социального взаимодействия, для которого использовали квадратное открытое поле (100x100x30 см), где около одной из стенок, посередине располагался пластиковый отсек (21x21x14 см) с перфорированными стенками. Тест проводился в течение двух дней: в первый

день внутренний отсек был пустой, во второй день в отсек заранее помещали незнакомую крысу-гостя одного пола и возраста с исследуемой крысой. Поведение крысы регистрировали в течение 5-ти минут. Анализировали время нахождения крысы в зоне взаимодействия (коридор шириной 15 см около внутреннего отсека), число и длительность контактов (нос крысы вблизи стенки внутреннего отсека). Оценивали процентное соотношение времени взаимодействия во второй и первый опыт (коэффициент взаимодействия).

Социальное доминирование оценивали при помощи тестирования в трубе из прозрачного оргстекла длиной 150см и внутреннего диаметра 6 см. Эксперимент проводили в течение двух дней: в первый день животные исследовали новую обстановку и проходили по трубе в обоих направлениях, во второй проводили само тестирование. За день до начала эксперимента крыс взвешивали и формировали однополые пары так, чтобы одна крыса была из ФИЗ группы, другая из ЛПС группы, а вес у животных был почти одинаковый (с точностью до 10г). Во время тестирования крыс одновременно запускали с разных концов трубы, чтобы животные двигались друг-другу на встречу. “Победителем” считали то животное, которое смогло оттеснить оппонента назад и выйти с противоположного конца трубы. У каждой пары было две попытки, при этом каждую крысу запускали с разных концов трубы. Если в течение 2 мин не выявлялся “победитель”, считали что ничья.

Агрессивное поведение оценивали при помощи теста “резидент-интродер” (Р-И) и теста на хищническое поведение. За неделю до проведения теста Р-И самцов ссаживали с овариэктомированными самками в отдельные домашние клетки (35x55x20см); перед началом теста самку удаляли. Экспериментальных самок также рассаживали парами из одной группы в отдельные домашние клетки и перед началом теста одну из крыс убирали на время тестирования ее соседки. Тест Р-И проводили в домашней клетке, где к резиденту подсаживали незнакомую более молодую и меньшую по весу крысу-интродера того же пола, и регистрировали поведение обеих крыс в течение 5-ти

минут. При этом фиксировали такие параметры, как латентность и число драк, число и длительность стоек напротив оппонента, число постановок лап на интродера/резидента, число и длительность преследований интродера/резидента, число “сексуальных атак” со стороны резидента. Анализ хищнического поведения проводили на небольшой камере размерами 51x40.5x30см. В качестве добычи выступали живые домовые сверчки *Acheta domesticus*. За неделю до проведения эксперимента животных приучали к новой диете, давая пробовать умерщвленных сверчков. За два дня до эксперимента крыс сажали в камеру для ее обследования, на полу располагались умерщвленные сверчки. Перед экспериментом проводили 24 ч пищевую депривацию. Во время опыта крысу сажали в центр камеры, в которой находились 3-4 живых сверчка, и вели наблюдение в течение 5-ти мин. Оценку хищнического поведения проводили в баллах: 1 балл – только обнюхивание добычи; 2 балла – обнюхивание и дальнейшее преследование; 3 балла – преследование и попытка поймать добычу; 4 балла – преследование, ловля и дальнейшее умерщвление добычи, но без поедания; 5 баллов – добыча была поймана, убита и съедена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. В первый день теста социального взаимодействия самцы группы ЛПС значительно меньше времени находились в зоне взаимодействия и меньше обследовали снаружи внутренний отсек, чем самцы группы ФИЗ (Рис.1, А). Эти результаты совпадают с нашими ранее полученными данными о снижении исследовательской активности у самцов ЛПС группы. Однако, на второй день теста, при помещении в отсек крысы-гостя, разницы в длительности пребывания в зоне взаимодействия и длительности контактов между группами ФИЗ и ЛПС обнаружено не было (Рис.1, А). Коэффициент взаимодействия был больше у самцов в группе ЛПС, чем в группе ФИЗ (Рис.1, Б), что свидетельствует о том, что ранний провоспалительный стресс увеличивал мотивацию к социальному взаимодействию. Среди самок групповых различий обнаружено не было.

В тесте на социальное доминирование в трубе самцы группы ЛПС значительно чаще были “победителями”, чем самцы группы ФИЗ (Рис.1, В). У самок разницы между группами обнаружено не было. Полученные данные свидетельствуют об увеличении социальной доминантности у самцов после введения ЛПС в раннем онтогенезе.

В тесте на агрессивное поведение “резидент-интродер” не было выявлено различий в ФИЗ и ЛПС группах по длительности преследования интродера, числу стоек и схваток, числу постановок лап на интродера как среди самцов, так и среди самок. Вместе с тем было обнаружено, что самцы ЛПС группы могли совершать “сексуальные атаки” на интродера (Рис.1, Г), среди самцов ФИЗ группы схожих случаев нападения обнаружено не было. Таким образом, не было выявлено изменений в уровне агрессии у самцов ЛПС группы по сравнению с ФИЗ группой, но отмечался повышенный уровень сексуальной мотивации, направленной на самцов интродеров, и отсутствие дифференцировки объектов.

При оценке хищнической агрессии выявили половые различия (Рис.1, Д): самки обеих групп, ЛПС и ФИЗ, чаще ловили, умерщвляли и съедали своих жертв сверчков, в то время как самцы ЛПС и ФИЗ групп в основном ограничивались обнюхиванием и преследованием сверчков, реже пытались их поймать. Возможно, более выраженное хищническое поведение самок было связано с их меньшей тревожностью. Различий в хищническом поведении у животных ФИЗ и ЛПС групп не наблюдалось.

ВЫВОД. Ранний провоспалительный стресс оказал влияние на социальное поведение взрослых самцов, но не самок крыс. У самцов ЛПС группы чаще встречалось социальное доминирование, была выше мотивация к социальному взаимодействию, по уровню агрессивности отличий животных ЛПС и ФИЗ группы не было выявлено. У самцов ЛПС группы отмечалось увеличение сексуальной мотивации и отсутствие дифференцирования объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alperina E., Idova G., Zhukova E., Zhanaeva S., Kozhemyakina R. Cytokine variations within brain structures in rats selected for differences in aggression. *Neurosci Lett* . 2019 Jan 23;692:193-198;
2. Audet M.-C., Mangano E.N., Anisman H. Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. *Front. Behav. Neurosci.*, 4 (2010), pp. 1-12;
3. Baharnoori M., Bhardwaj S.K., Srivastava L.K. Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: a prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophr Bull.* 2012 May;38(3):444-56;
4. Das S., Deuri S.K., Sarmah A., Pathak K., Baruah A., et al. Aggression as an independent entity even in psychosis - the role of inflammatory cytokines. *J. Neuroimmunol.*, 292 (2016), pp. 45-51;
5. Foley K.A., MacFabe D.F., Vaz A., Ossenkopp K.-P., Kavaliers M. Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: implications for autism spectrum disorders. *Int J Dev Neurosci.* 2014 Dec;39:68-78;
6. Idova G.V., Markova E.V., Gevorgyan M.M., Alperina E.L., Zhukov E.N. Changes in production of cytokines by C57Bl/6J mouse spleen during aggression provoked by social stress. *Bull Experim Biol and Med.*, 160 (2016), pp. 679-682;
7. Kentner A.C., Khan U., MacRae M., Dowd S.E., Yan S. The effect of antibiotics on social aversion following early life inflammation. *Physiol Behav* . 2018 Oct 1;194:311-318;
8. Lee G.A., Lin Y.-K., Lai J.-H., Lo Y.-C., Yang Y.-C.S.H., et al. Maternal Immune Activation Causes Social Behavior Deficits and Hypomyelination in Male Rat Offspring with an Autism-Like Microbiota Profile. *Brain Sci* . 2021 Aug 18;11(8):1085;
9. MacRae M., Kenkel W.M., Kentner A.C. Social rejection following neonatal inflammation is mediated by olfactory scent cues. *Brain Behav Immun* . 2015 Oct;49:43-8;
10. Takahashi A., Flanigan M.E., McEwen B.S., Russo S.J. Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. *Front. Behav. Neurosci.*, 12 (2018), pp. 56-62.

THE EFFECT OF EARLY-LIFE PROINFLAMMATORY STRESS ON SOCIAL BEHAVIOR IN ADULT RATS

Broshevitskaya N.D., Pavlova I.V.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

We investigated the social behavior of adult rats in both sexes after early pro-inflammatory stress in a social interaction test, dominance tube test, resident-intruder

test and predator aggression test. LPS-treated males were more dominant and showed more social motivation but not aggression.

KEYWORDS: proinflammatory stress, lipopolysaccharide, dominance tube test, social interaction, aggression.

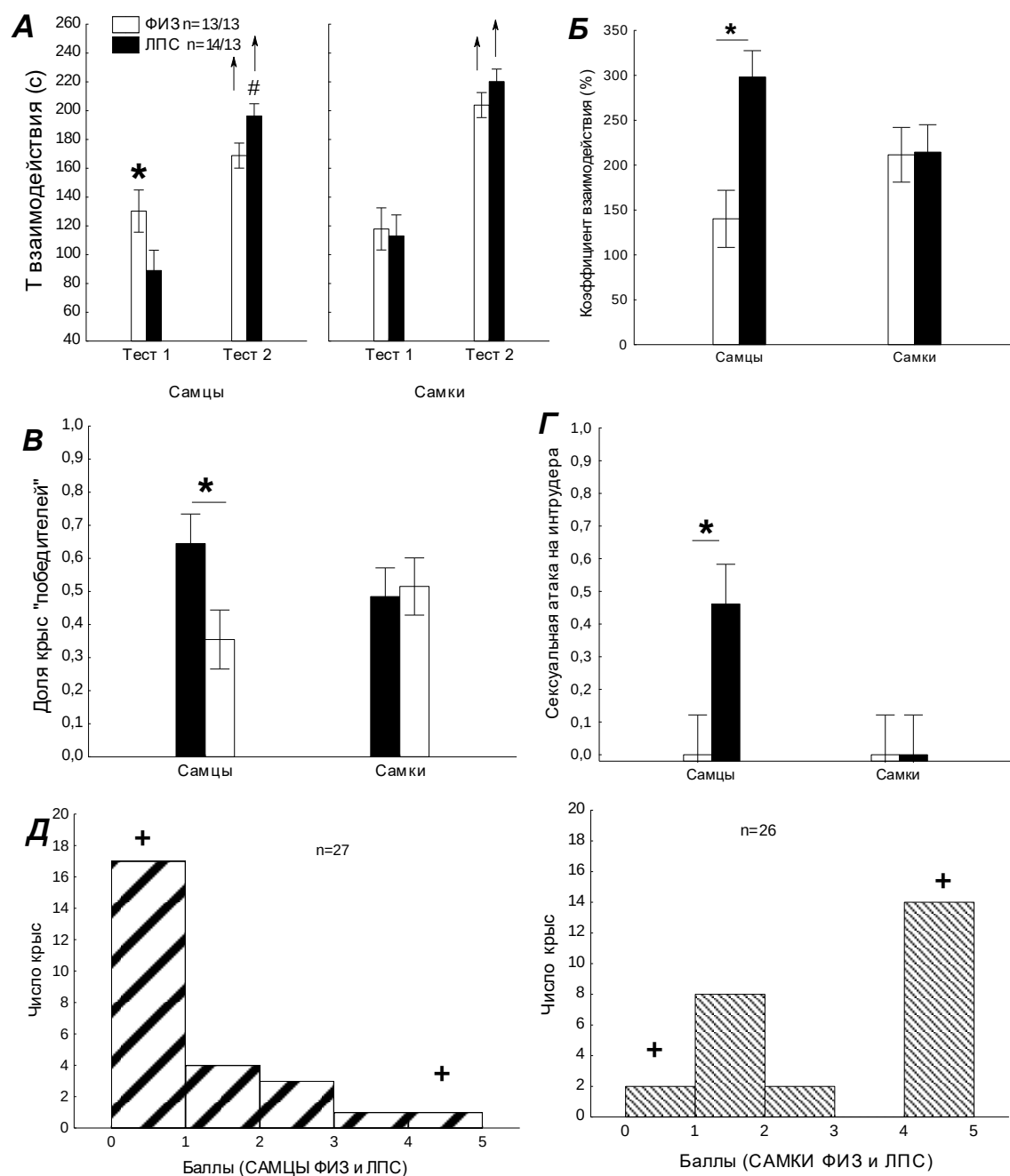


Рис.1. Влияние ЛПС на социальное поведение крыс. А-Б - время и коэффициент взаимодействия ($((T_{\text{тест2}} / T_{\text{тест1}}) * 100\%)$) в тесте социального

взаимодействия; *B* - доля крыс «победителей» в группах в тесте на доминантность в трубе; *Г* - среднее число «сексуальных атак» на интродера в тесте «резидент-интродер»; *Д* - баллы в тесте на хищническую агрессию. ФИЗ – группа крыс с введением физиологического раствора в раннем онтогенезе; ЛПС – с введением липополисахарида. * - различия между группами ФИЗ и ЛПС ($p < 0.05$), , # - тенденция ($0.05 \leq p < 0.1$); + - половые различия (А-Б post-hoc Fisher LSD, ANOVA; В-Д критерий χ^2 , 2 x 2 Table).

УДК 612.846; 612.846.2

ИССЛЕДОВАНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ДВИЖЕНИЯ ГЛАЗ У ДЕТЕЙ И КАЧЕСТВОМ НЕПРОИЗВОЛЬНОГО ЗАПОМИНАНИЯ ЗРИТЕЛЬНОЙ ИНФОРМАЦИИ

Буденкова Е.А.

БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

E-mail: KBudenkova@gail.com

Аннотация: В настоящее время большое количество работ посвящено изучению механизма функционирования памяти. Несмотря на это, полученных результатов недостаточно для ответа на поставленный вопрос, что определяет актуальность данного исследования. Работа направлена на поиск «окуломоторных фенотипов» в группах детей 4-6 лет и 7-9 лет с высокой и низкой способностью к произвольному запоминанию зрительной информации.

Ключевые слова: окулография, саккады, зрительные фиксации, память, внимание.

Непроизвольное запоминание может играть в жизни человека значимую роль. Обычно подобное запоминание осуществляется непреднамеренно, тесно связано с прежним опытом и сильными чувствами человека и поэтому представляет исследовательский интерес.

Методика: В исследовании приняли участие две группы детей, 4-6 лет ($n = 135$) и 7-9 лет ($n = 236$), с нормальным развитием и без диагностированных

нейропатологий. Первой группе предложено к произвольному просмотру изображение (птицы на ветке), а второй группе отрывок текста с описанием животного (черепаха) для чтения вслух. Сразу после завершения предъявления стимульного материала участникам было предложено воспроизвести полученную информацию (Что увидел(а), о чём прочел(ла)?). Запись движений глаз проводилась с помощью айтрекера RED250mobile.

Результаты: Полученные значения основных окуломоторных параметров (скорость саккад, длительность межсаккадических фиксаций) находятся в диапазоне, наблюдаемом у взрослых людей [1].

Основываясь на качестве воспроизведения произвольно запомненной информации, в пределах обеих возрастных групп выделены подгруппы: правильно ответившие на вопрос сразу (Right, R) и после наводящих вопросов (Right with Prompting, RwP), неправильно ответившие (Wrong, W) и не давшие никакого ответа на вопрос (No Answer, NoA) с учетом наличия наводящих вопросов. В группе 4-6 лет R-RwP-W-NoA соотношение оказалось 2-2-1-1, а в группе 7-9 лет 6-1-3-2. При сравнении подгрупп в рамках отдельных возрастных групп не обнаружено статистически значимых различий по среднему количеству фиксаций (при просмотре картинки), количеству просаккад и регрессивных саккад (при чтении), а также по среднему значению диаметра зрачка во время фиксаций.

При рассматривании изображения у участников исследования наблюдались малые (2-5), средние (6-9) и большие (более 10) группы фиксаций. Для подгруппы R, в отличие от остальных, оказалось характерно наличие одной большой группы фиксаций и пары малых. В пределах каждой подгруппы группы можно выделить наличие одной доминантной зоны фиксаций (на которую приходится максимальное время фиксаций) или доминанты с субдоминантой(ми). В подгруппах R и W одна доминанта и одна субдоминанта, в NoA одна доминанта и две субдоминанты, в RwP – распределение фиксаций равномерное. В подгруппе R детей 7-9 лет (задание на чтение) фиксации

приходятся как правило на начало или середину слова, что считается оптимальным для восприятия информации; в остальных подгруппах фиксации в равной степени могут располагаться в начале, середине и конца слова. Последнее может свидетельствовать о недостаточном контроле моторного компонента саккад. Как в случае произвольного рассматривания картинки, так и при свободном чтении, можно отметить, что по мере выполнения задания диаметр зрачка во время фиксаций увеличивается у детей подгрупп R, W и RWP, но не NoA. Положительная динамика размера зрачка может отражать влияние когнитивной нагрузки, размер объёма рабочей памяти [2].

Заключение: В группах 4-6 и 7-9 лет наблюдается схожее численное распределение по уровню произвольного запоминания зрительной информации. При этом ряд окуломоторных параметров (распределение межсаккадических фиксаций, диаметр зрачка) проявляется схожим образом.

Литература:

1. Leigh R. J., Zee D. S. 2015. The neurology of eye movements. Oxford University Press, USA, T. 90.
2. Meghanathan R.N. Fixation duration surpasses pupil size as a measure of memory load in free viewing / R.N. Meghanathan, C. van Leeuwen, A.R. Nikolaev // *Frontiers in human neuroscience*. – 2015. – Т. 8. – 1063 p.

STUDY OF CORRELATION BETWEEN EYE MOVEMENT AND THE QUALITY OF INVOLUNTARY REMEMBER OF VISUAL INFORMATION IN CHILDREN

Budenkova E.A.

I. Kant BFU, Kaliningrad, Russia

Abstract: Nowadays, a large number of works are devoted to the study of the mechanism of memory functioning. Despite this, the results obtained are not enough to answer the question posed, which determines the relevance of this study. The work is aimed at searching for "oculomotor phenotypes" in groups of children 4-6 years old and 7-9 years old with high and low ability to involuntarily memorize visual information.

Key words: oculography, saccades, visual fixations, memory, attention.

УДК 616.853

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЮ-РИТМА ПАЦИЕНТОВ С ВИСОЧНОЙ
ЭПИЛЕПСИЕЙ: МЕТОД НЕЗАВИСИМЫХ КОМПОНЕНТ**

Буркитбаев С.Е.^{1,2}, Каримова Е.Д.^{1,2}

¹ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии»

Российской академии наук, Москва, Россия.

²ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П.

Соловьева» Департамента здравоохранения города Москвы, Россия.

E-mail: wannx@mail.ru

Аннотация: Исследования зеркальной системы мозга (ЗСМ) с помощью методов инвазивной регистрации активности головного мозга проводятся у пациентов с височной эпилепсией, при этом возможные нарушения работы ЗСМ у пациентов данной группы не принимаются во внимание. В данной работе проводился анализ реакций мю-ритма при наблюдении, представлении и выполнении различных моторных жестов у пациентов с височной эпилепсией и у контрольной группы.

Ключевые слова: височная эпилепсия; метод независимых компонент, зеркальные нейроны, ЭЭГ

Зеркальная система мозга (ЗСМ) впервые была обнаружена группой итальянских исследователей во главе с Дж. Риццолатти в 1996 году [1]. Последующие исследования ЗСМ человека, проведенные с помощью таких методов как ПЭТ, фМРТ, ТМС [2,3], косвенно подтвердили наличие системы нейронов с зеркальными свойствами, аналогичной обнаруженной у животных.

Прямым доказательством наличия подобных нейронов у человека стали результаты работы Роя Мукамеля и его коллег. В исследовании принимали участие пациенты с фармакорезистентной височной эпилепсией, которые готовились к операции по удалению эпилептического очага и проходили предоперационное обследование по его локализации с помощью инвазивных электродов [4].

Эпилепсия - это тяжелая неврологическая патология головного мозга, наличие которой может отрицательным образом сказаться на работе отдельных функциональных систем [5,6] и ЗСМ в частности. Так, помимо возможных морфологических изменений отделов головного мозга богатых нейронами с “зеркальными” свойствами, на функционирование этой системы могут влиять нарушения во взаимодействии с другими людьми, в результате накладываемых ограничений на привычный для здорового человека ритм жизни, а также частое нахождение в состоянии сильного стресса, вызванного чувством страха перед очередным приступом. Таким образом, для корректного анализа/изучения работы ЗСМ на основе данных, полученных с помощью инвазивных электродов у пациентов с височной эпилепсией, является актуальным исследовать суммарную биоэлектрическую активность у пациентов с височной эпилепсией в сравнении со здоровыми людьми. *Гипотеза исследования:* Активность ЗСМ у пациентов с эпилепсией может быть нарушена по сравнению со здоровыми людьми.

Цель исследования: Определить особенности активации ЗСМ у пациентов с фокальной эпилепсией при помощи регистрации ЭЭГ.

Методика: В исследования принимали участие две группы: пациенты с височной эпилепсией и сопоставимая по возрасту и полу группа здоровых добровольцев. Группу пациентов составили 37 человек (средний возраст 34 ± 4 лет) с диагнозом височная эпилепсия из них 7 пациентов проходили в прошлом операцию по удалению эпилептического очага. Критерии включения: диагноз фокальная симптоматическая эпилепсия, возраст 18-45 лет. Критерии

исключения: органические нарушения головного мозга (киста, энцефалопатия и пр.) диабет, алкоголизм, наркотическая зависимость. Пациенты проходили обследование в день поступления в НПЦ, до начала медикаментозного лечения. Диагноз фокальная симптоматическая эпилепсия ставился врачами-эпилептологами на основе информации, включающей электро-клиническую семиологию приступов на основе видео-ЭЭГ мониторинга и МРТ исследования, проходившего по стандартным эпилептическим протоколам. Контрольную группу составил 31 здоровый испытуемый (средний возраст 35 ± 3 год), без какого-либо психоневрологического диагноза, с аналогичными группе пациентов критериями исключения. Исследование проводилось на базе Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и ГБУЗ НПЦ психоневрологии ДЗ г. Москвы.

Структура исследования. Во время исследования испытуемые просматривали видеоролики и следовали инструкциям на экране. Участники исследования находились 30 с в состоянии покоя с закрытыми глазами, затем 30 с в состоянии покоя с открытыми глазами. Далее в течении 10 с наблюдали за неподвижным экспериментатором. Следующая часть исследования включает выполнение блоков заданий, активирующих ЗСМ. В качестве заданий были выбраны наблюдение, представление и выполнение движения. В качестве движений были выбраны: простое нецеленаправленное движение (сжатие руки), простое целенаправленное движение (захват чашки) и движение, которое задействует обе руки (хлопки). Продолжительность каждого блока для каждого движения составляла 10 с.

Получение и анализ данных. Запись ЭЭГ осуществлялась с помощью энцефалографа-анализатора ЭЭГА-21/26 “ЭНЦЕФАЛАН 131-03”, г. Таганрог (19 электродов по системе 10-20%, относительно объединенных ушных электродов А1 и А2) в состоянии покоя с закрытыми и открытыми глазами, а также во время когнитивных нагрузок. Для всех отведений задавали частоту опроса 250 Гц, полосы фильтрации 1-45 Гц, импеданс менее 10 кОм. Обработка

записей ЭЭГ проводилась в программном обеспечении MNE-Python (<https://mne.tools/stable/index.html>). Для вычисления независимых компонент сигнала и расчета топограммы для каждой компоненты использовался алгоритм “*infomax*”. Известно, что маркером активности ЗСМ является десинхронизация спектра мощности в полосе частот сенсомоторного мю-ритма, которая совпадает с частотным диапазоном альфа ритма, но регистрируется над моторной корой. Т.о. для каждой пробы и для каждой компоненты рассчитывалась спектральная плотность мощности методом “*multitaper*” и вычислялась мощность сигнала в диапазоне 8-13 Гц. Статистический анализ данных проводился с логарифмированными относительными значениями мощности компонент мю-ритма в программе Statistica v.7.0 StatSoft© Inc., USA с использованием дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA).

Методики исследования были одобрены этическими комитетами Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН и ГБУЗ научно-практического центра психоневрологии департамента здравоохранения г. Москвы.

Результаты: Анализ проводился с разделением пациентов на подгруппы, чтобы выявить влияние оперативного удаления эпилептического очага и давности заболевания на снижение мю-ритма и активность ЗСМ. Дисперсионный анализ с повторными измерениями и фактором “группа” ($p < 0.01$) выявил достоверный уровень снижения мощности мю-ритма для каждой группы в каждой из трех задач. Достоверно значимых отличий относительной мощности мю-ритма между контрольной группой и группой пациентов с эпилепсией, не проходивших операцию выявлено не было (рис.1.). Апостериорный тест Тьюки показал достоверно меньший уровень десинхронизации ритма по сравнению с контрольной группой у группы пациентов с операцией в анамнезе.

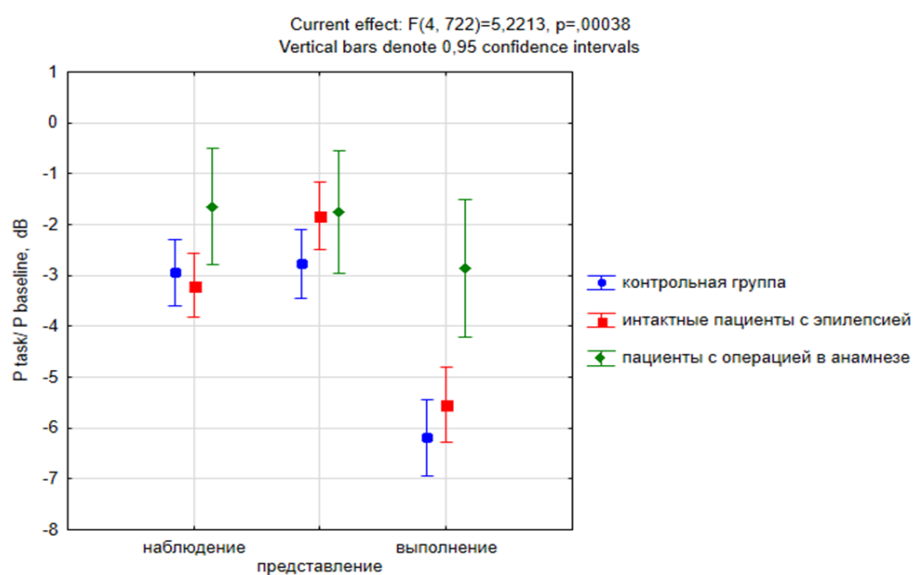


Рисунок 1. Относительные значения мощности компонент мю-ритма в контрольной группе и двух подгруппах пациентов с эпилепсией (прошедших операцию и без операции); Значения мощности спектра во время фоновой пробы (открытые глаза) равны 0.

Анализ влияния давности заболевания на уровень снижения мощности мю-ритма выявил значимое влияние фактора “группа” ($p<0.01$) и показал, что пациенты с давностью заболевания 5-10 лет имеют достоверно меньший уровень снижения мощности мю-ритма по сравнению с контрольной группой и пациентами с давностью заболевания менее 5 лет и более 10 лет при представлении и выполнении заданий. Достоверные различия между контрольной группой и остальными подгруппами пациентов с эпилепсией обнаружены не были.

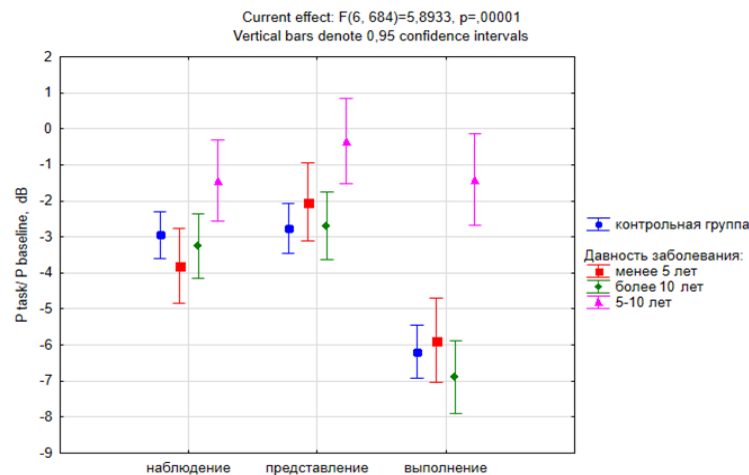


Рисунок 2. Относительные значения мощности компонент мю-ритма у пациентов с разной давностью заболевания и в контрольной группе

Заключение. Пациенты, страдающие эпилепсией продемонстрировали достоверные отличия снижения мю-ритма по сравнению с контрольной группой. Так для группы пациентов, перенесших удаление эпилептического очага был характерен сниженный уровень десинхронизации мю-ритма при выполнении заданий. Учет фактора давности заболевания показал наличие достоверных отличий между группой пациентов с давностью 5-10 лет и контрольной группой при представлении и выполнении моторных задач. У этой группы пациентов наблюдался сниженный уровень десинхронизации мю-ритма.

Литература

1. Rizzolatti G. и др. Premotor cortex and the recognition of motor actions // Cogn. Brain Res. - 1996. - Т. 3. - № 2. - С. 131–141.
2. Grèzes J., Decety J. Functional anatomy of execution, mental simulation, observation, and verb generation of actions: A meta-analysis // Hum. Brain Mapp. - 2000.
3. Hari R. и др. Activation of human primary motor cortex during action observation: a neuromagnetic study. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 1998. - Т. 95. - № 25. - С. 15061–15065.
4. Mukamel R. и др. Single-Neuron Responses in Humans during Execution and Observation of Actions // Curr. Biol. – 2010.
5. Klugah-Brown B, Luo C, He H, Jiang S, Armah GK, Wu Y, et al. Altered Dynamic Functional Network Connectivity in Frontal Lobe Epilepsy // Brain Topography. Springer US – 2019 – 32 – V. 3 – PP. 394–404.

6. Lee HJ, Park KM. Intrinsic hippocampal and thalamic networks in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis according to drug response. // Seizure. Elsevier – 2020 – V. 76 – N 2 – PP. 8.

MU-RHYTHM STUDY IN PATIENTS WITH TEMPORAL LOBE EPILEPSY: INDEPENDENT COMPONENT ANALYSIS

Burkitbayev S.E.^{1,2}, Karimova E.D.^{1,2}

1 – Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow

2 – Moscow research and clinical center for neuropsychiatry, Moscow

E-mail: wannx@mail.ru

Abstract. Studies of the mirror system of the brain (MSB) using methods of invasive registration of brain activity are carried out in patients with temporal lobe epilepsy, while possible disturbances of the SPM in patients of this group are not taken into account. In this work, we analyzed the reactions of the sensorimotor rhythm during observation, imaginary performance and performance of various motor gestures in patients with temporal lobe epilepsy and in the control group.

Key words: temporal lobe epilepsy; independent component analysis, mirror neurons, EEG

УДК 612.82

СТИМУЛЯЦИЯ НИТРЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МЕДИАЛЬНОЙ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ: ВЛИЯНИЕ НА СЕРОТОНИНОВУЮ ТРАНСМИССИЮ И ГЕНЕРАЛИЗАЦИЮ УСЛОВНОРЕФЛЕКТОРНОГО СТРАХА

Бурмакина М. А., Трофимова Н. А., Саульская Н. Б.

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: burmakinama@infran.ru

Аннотация: Работа направлена на исследование взаимодействия нитрергической и серотониновой систем медиальной префронтальной коры (мПК). Показано, что активация NO системы мПК при выработке реакции страха предотвращает вызываемый выработкой рост уровня серотонина в мПК и уменьшает генерализацию страха.

Ключевые слова: медиальная префронтальная кора, условная реакция страха, генерализация страха, серотонин, оксид азота

Характерной особенностью стрессовых расстройств являются нарушения в работе системы страха, в частности - неспособность подавлять неоправданный страх. Такое явление называется генерализацией страха и характеризуется тем, что реакция страха, сформированная на одни стимулы, переносится на схожие, но вместе с тем безопасные стимулы. Такая реакция является адаптивной, но слишком высокая генерализация сопровождает ряд психических заболеваний и расстройств. В связи с этим изучение механизмов генерализации страха является актуальной задачей нейрофизиологии.

В регуляцию генерализации страха вовлечен ряд структур головного мозга. Одной из них является мПК, функции которой связаны с механизмами, отвечающими за формирование и проявления страха [1], а также за дискриминацию опасных и безопасных стимулов [2].

Известно, что деятельность мПК регулируют несколько нейромодуляторных систем. Активность двух из них – серотонинергической и нитрергической – связана с формированием генерализованного страха [3, 4, 5]. Вместе с тем вопрос о взаимодействии этих систем в мПК и о его влиянии на генерализацию страха остаётся открытым.

Работа направлена на изучение эффектов введения NO-донора в мПК на серотониновую трансмиссию в этой области во время выработки условнорефлекторной реакции страха (УРС), а также на её формирование и генерализацию.

Методика: Работа выполнена на крысах-самцах линии Спрег-Доули методом прижизненного внутримозгового микродиализа Животным под общим наркозом в мПК имплантировали диализные канюли. В первый день эксперимента на вход канюли подключали диализный насос и начинали перфузию мПК искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ). Животных разделили на две группы. Крысам группы «Без введения» (n=10) проводили процедуру выработки УРС с дискриминационным компонентом: сочетали звуковой условный сигнал (CS+) и неизбежное болевое раздражение, а затем предъявляли дифференцировочный сигнал CS- без болевого раздражения. Крысам группы «DEA NONO» (n=9) после сбора фоновых порций диализата в ИСМЖ добавляли донор NO – диэтиламин ноноат (DEA NONO, 1мМ, «Sigma», США), собирали 3 порции диализата, а затем вырабатывали УРС, как описано выше для группы «Без введения». На второй день эксперимента животных обеих групп тестировали на проявления генерализованного и условнорефлекторного страха, предъявляя сначала безопасный CS-, а затем потенциально опасный CS+ и регистрируя замирание животных (показатель страха у грызунов) на эти сигналы. Диализат собирали в течение всего периода экспериментов. Уровень внеклеточного серотонина в мПК измеряли методом ВЭЖХ.

Результаты: Показано, что выработка УРС у животных группы «Без введения» вызывает рост уровня внеклеточного серотонина в мПК относительно фонового уровня (максимум - $129 \pm 5\%$), что согласуется с данными, ранее полученными в нашей лаборатории. Активация нитрергической системы введением в мПК DEA NONO приводит к первоначальному подъёму ($136 \pm 10\%$) уровня внеклеточного серотонина в мПК с последующим его снижением (рис.1). Вместе с тем, во время выработки УРС у крыс группы «DEA NONO» не наблюдалось значимых изменений уровня внеклеточного серотонина в мПК (рис.1).

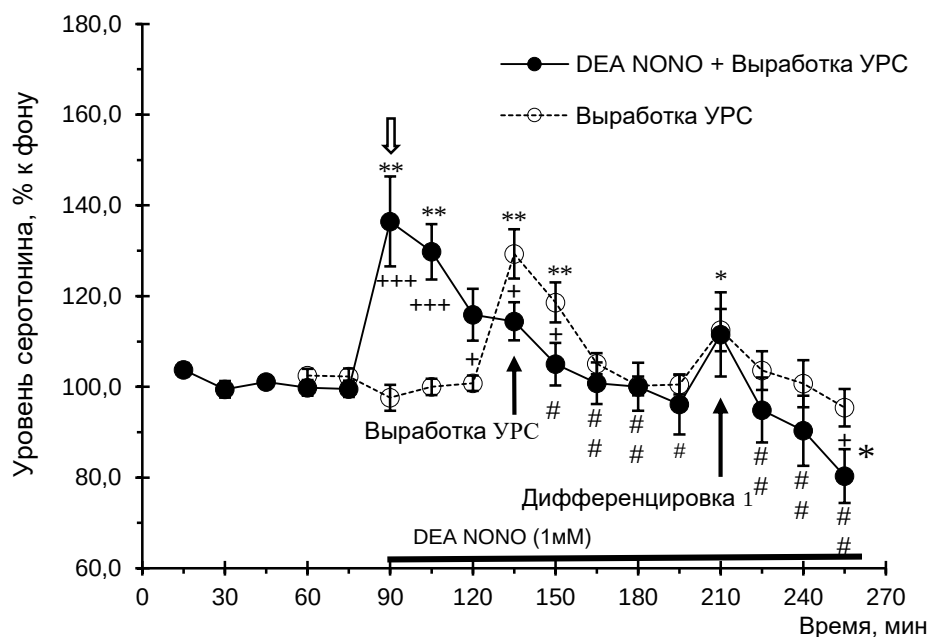


Рис 1. Изменения уровня внеклеточного серотонина в мПК в ходе выработки УРС у животных с введением в мПК 1 мМ DEA NONO (DEA NONO +Выработка УРС) и у крыс без введения этого препарата (Выработка УРС)). * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.001$ – при сравнении с фоном; + – $p < 0.001$ при межгрупповом сравнении; # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.01$; ### – $p < 0.001$ – при сравнении с уровнем серотонина перед выработкой УРС. Белая стрелка – начало введения DEA NONO. Горизонтальная линия – период введения DEA NONO.

Второй день эксперимента показал, что крысы группы «DEA NONO» меньше замирали на безопасный CS- по сравнению с крысами группы «Без введения», следовательно, уровень генерализации страха у них был ниже. В ходе тестирования животных на проявления условнорефлекторного страха было продемонстрировано, что группы «Без введения» и «DEA NONO» не отличаются друг от друга по времени замирания на потенциально опасный CS+ (рис. 2).

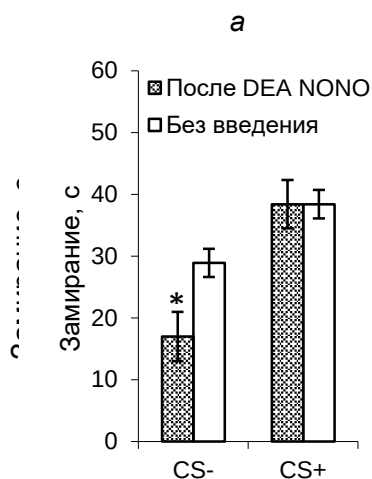


Рис 2. а – время замирания (с) на дифференцировочный (CS–) и условный (CS+) сигналы б – время неподвижности (с) в межсигнальных интервалах во время дифференцировочной сессии (CS– тест) и реализации УРС (CS+ тест) у животных с введением (После DEA NONO) и без введения (Без введения) 1 мМ DEA NONO в ходе выработки УРС

Заключение: Полученные данные позволяют предположить, что нитрергическая система мПК взаимодействует с серотонинергической системой этой области, и что такое взаимодействие оказывает влияние на степень генерализации страха. Этот вывод можно сделать ввиду того, что активация NO-системы введением в мПК донора NO, во-первых, предотвращает активацию серотониновой системы мПК, вызываемой выработкой УРС, во-вторых, селективно уменьшает через сутки проявления генерализованного страха.

Литература

1. Corcoran K.A., Quirk G.C.SJ. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 4. P. 840–844
2. Kim E.J., Kim N., Kim H.T., Choi J.C.SS. The prelimbic cortex is critical for context-dependent fear expression // Front. Behav. Neurosci. 2013. V. 7. № 73. P. 1–13.
3. Саульская Н.Б., Марчук О.Э. Активность серотониновой системы префронтальной коры у крыс с высокой и низкой генерализацией страха обстановки // Росс. физиол. журн. 2018. Т. 108. № 4. С. 466–476

4. Саульская Н.Б., Марчук О.Э. Торможение обратного захвата серотонина в медиальной префронтальной коре во время выработки условнорефлекторной реакции страха способствует формированию генерализованного страха // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2018. Т. 68. № 6. С.
5. Саульская Н.Б., Судоргина П.В. Активность нитергической системы медиальной префронтальной коры крыс с высокой и низкой генерализацией условнорефлекторной реакции страха // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2015. Т. 65. № 3. С. 372–381.

STIMULATION OF THE NITREGIC SYSTEM OF THE MEDIAL PREFRONTAL CORTEX: INFLUENCE ON SEROTONIN TRANSMISSION AND GENERALIZATION OF CONDITIONED FEAR

Burmakina M. A., Trofimova N. A., Saulskaya N. B.

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia

Abstract: The work examines the interaction of the nitregic and serotonegic systems of the medial prefrontal cortex (mPFC). We showed that activation of the mPFC NO system during the acquisition of fear response prevents the acquisition-induced rise of mPFC extracellular serotonin level and reduces fear generalization.

Key words: medial prefrontal cortex, generalization of fear, serotonin, nitric oxide, conditioned fear response

УДК 612.821

ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕДЕНИЯ У КРЫС ПОДРОСТКОВОГО ВОЗРАСТА ВСЛЕДСТВИЕ СТРЕССА В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Буянова А. А.¹, Недогреева О. А.¹

¹ *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: anastasiabuianova97@gmail.com

Аннотация: В работе проведено сравнение результатов поведенческих тестов, направленных на выявление уровня тревожности и депрессивно-подобного поведения, полученных на трех когортах крыс подросткового возраста, подвергнутых стрессу в раннем онтогенезе. Выявлены тенденции к увеличению тревожности вследствие стресса в раннем онтогенезе. Показана валидность модели.

Ключевые слова: стресс в раннем онтогенезе; липополисахарид; тревожно-подобное поведение; половой диморфизм; подростковый возраст.

Перенесенный в раннем возрасте стресс наблюдали более чем у половины людей, страдающих расстройствами тревожного и/или депрессивного спектра [1]. Изучение изменений поведения, вызванных стрессом в раннем возрасте, на животных моделях помогает оценить степень когнитивных и эмоциональных нарушений. Липополисахарид (ЛПС) в иммуностимулирующих концентрациях, введенный крысам в течение первой недели жизни, способен оказать долгосрочное воздействие на развитие центральной нервной системы, повышая чувствительность к стрессу [2]. Из-за чрезмерной активации механизмов преодоления стресса в подростковом возрасте могут наблюдаться трудности [3]. Известно, что перестройки, происходящие в организме вследствие действия стрессоров, у мужских и женских особей отличаются [4]. Изменение гормонального фона, обуславливающее развитие полового диморфизма, у крыс начинается с восемнадцатого постнатального дня [5].

Целью данной работы было выяснить наличие полового диморфизма в реакции на стресс в раннем онтогенезе (СРО) у крыс линии Вистар подросткового возраста. В работе оценивали тревожность крыс в тестах «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и депрессивно-подобное поведение в тесте Порсолта. Важной особенностью данной работы является сравнение данных, полученных на разных когортах животных, что позволяет оценить их воспроизводимость, а значит, и валидность модели.

Методика: Работа выполнена на трех когортах крыс линии Вистар: первую составили 19 самцов, вторую — 25 самок, третья группа состояла из крыс обоих полов — 18 самцов и 16 самок. Для моделирования стресса в раннем онтогенезе на 3 и 5 постнатальные дни (ПД) крысятам подкожно вводили ЛПС в дозе 50 мкг/кг — группа СРО, крысята контрольной группы получали эквивалентный объем изотонического NaCl. Начиная с 27 ПД поведенческие тесты проводили ежедневно, чтобы вызвать эффект умеренного стресса. Осуществляли видеорегистрацию с последующей обработкой в программе EthoVision XT. Статистический анализ выполняли с помощью программ GraphPad Prism 8.0.1 и RStudio 1.4.1103. Данные представлены как $M \pm SEM$.

Результаты: Во всех трех исследованных когортах животных были обнаружены признаки тревожного, но не депрессивно-подобного поведения у крыс группы СРО. Так, в тесте ОП у крыс первой когорты (только самцы) мы наблюдали уменьшение числа стоек без опоры в экспериментальной группе ($0,11 \pm 0,11$) по сравнению с контрольной ($2,3 \pm 0,9$) ($p = 0,031$). Крысы группы СРО проходят меньше квадратов ($79,1 \pm 7,1$), чем контрольные самцы ($103 \pm 7,8$) ($p = 0,028$). У крыс второй когорты (только самки) также было обнаружено уменьшение числа пройденных квадратов в группе СРО ($p = 0,009$). На третьей когорте можно проследить наличие межполовых различий в отклонениях поведения, вызванных стрессом в раннем онтогенезе. Так, например, в

контрольных группах число свешиваний в тесте ПКЛ примерно одинаковое у самцов и самок, при этом мы наблюдали увеличение числа свешиваний у самок группы СРО ($7,86 \pm 1$) по сравнению с контрольными ($4,1 \pm 1,1$) ($p = 0,0338$). Похожая тенденция прослеживается и в количестве вытягиваний: у самок группы СРО ($5,9 \pm 1,0$) оно достоверно выше в сравнении с этим показателем у самцов ($3,1 \pm 0,5$) ($p = 0,017$). В тесте Порсолта было выявлено статистически незначимое увеличение длительности “пассивного плавания” в группе СРО ($151,6 \pm 13,1$ сек) по сравнению с контрольной ($121,4 \pm 18,3$ сек), сильнее выраженное у самцов.

Заключение: В поведении крыс подросткового возраста явно прослеживается половой диморфизм, хоть он выражен еще не так сильно, как во взрослом возрасте. Изменения поведения, вызванные стрессом в раннем онтогенезе, выявляются, в основном, на уровне тенденций, что отчасти может быть обусловлено малым числом животных в группах, а отчасти нивелированием за счет поведения, вызванного пубертатными гормональными перестройками. Тем не менее, наша работа показывает, что провоспалительный стресс в раннем онтогенезе приводит к некоторым проявлениям тревожного, но не депрессивно-подобного поведения у крыс Вистар подросткового возраста, что подтверждено воспроизведением сходной картины поведенческих изменений на трех различных когортах животных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-00063.

Литература

1. Li M, D'Arcy C, Meng X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. // Psychol Med. — 2016 — Vol. 46 — №4 — PP. 717-730. doi:10.1017/S0033291715002743.
2. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, et al. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2000 — Vol. 97 — №10 — PP. 5645-5650. doi:10.1073/pnas.090571897

3. Ganguly P, Brenhouse HC. Broken or maladaptive? Altered trajectories in neuroinflammation and behavior after early life adversity. // Dev Cogn Neurosci. — 2015 — Vol. 11 — PP. 18-30. doi:10.1016/j.dcn.2014.07.001.
4. Desbonnet L, Garrett L, Daly E, McDermott KW, Dinan TG. Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain. // Int J Dev Neurosci. — 2008 — Vol. 26 — №3-4 — PP. 259-268. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.02.004.
5. Bell MR. Comparing Postnatal Development of Gonadal Hormones and Associated Social Behaviors in Rats, Mice, and Humans. // Endocrinology. — 2018 — Vol. 159 — №7 — PP. 2596-2613. doi:10.1210/en.2018-00220

BEHAVIORAL CHANGES IN ADOLESCENT RATS DUE TO EARLY-LIFE STRESS

Buianova A. A.¹, Nedogreeva O. A.¹

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

Abstract: In our work we aimed to compare results on the level of anxiety and depressive-like behavior obtained on three cohorts of adolescent rats subjected to stress in early ontogenesis. We revealed tendencies to increasing anxiety-like behavior as a consequence of early-life stress. The model used is proved to be valid as the results were reproducible.

Key words: early-life stress; lipopolysaccharide; anxiety-like behavior; sexual dimorphism; adolescence period.

УДК 612.82

ОТВЕТЫ СТАБИЛЬНО РЕГИСТРИРУЕМЫХ НЕЙРОНОВ МИНДАЛИНЫ НА
ЗРИТЕЛЬНЫЕ И СЛУХОВЫЕ СТИМУЛЫ

Васильева Л.Н., Бондарь И.В.

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,
Россия*

e-mail: luvasilieva@mail.ru, bondar@ihna.ru

Аннотация: Мы записывали ответы стабильно регистрируемых нейронов в миндалине двух кроликов на зрительные и звуковые стимулы. 35 % нейронов отвечали хотя бы на один из типов стимулов. Мы нашли нейроны, отвечающие только на звуковые стимулы и только на зрительные, а также на стимулы обеих модальностей.

Ключевые слова: нейрон, кролик, хроническая регистрация, стабильная регистрация, миндалина

Методика: Стабильная регистрация - методика, позволяющая регистрировать активность одного и того же нейрона более одного дня [1]. В данной работе мы исследовали ответы стабильно регистрируемых нейронов миндалины на зрительные и слуховые стимулы. Пучки из 32 нихромовых микроэлектродов были изготовлены по опубликованной ранее методике [2]. Пучки были имплантированы в миндалину двух кроликов под общей анестезией. Нейронную активность записывали с помощью платы RHD 2000 (Intan Technologies). Нативные данные были подвергнуты частотной фильтрации, нейронные спайки были детектированы по порогу амплитуды. Отсортированные спайки были проанализированы с помощью автоматического алгоритма для поиска стабильно регистрируемых нейронов [3]. В качестве простых зрительных стимулов выступали черно-белые шахматные паттерны, сложных - картинка с изображениями кроликов, пейзажей и др. В качестве звуковых стимулов использовались чистые тоны и записи криков различных животных (хищников, птиц и кроликов).

Результаты: У кролика №1 мы записывали данные в течение 72 дней после имплантации, у кролика №2 - 964 дней. Благодаря стабильной регистрации, нам удалось протестировать свойства нейронов в различных экспериментальных условиях с предъявлением зрительных или слуховых стимулов. Мы протестировали свойства 147 стабильно регистрируемых нейронов. Нейроны кролика №1 отвечали в основном на чистые тоны, а нейроны кролика №2 - и на зрительные и слуховые стимулы, хотя большая часть нейронов не отвечала на предъявляемые стимулы (рис. 1). 8.2 % нейронов отвечали на стимулы обеих модальностей, 12.2 % - только на зрительные стимулы, 5.4 % - только на слуховые.

Заключение: В данном исследовании нами были получены данные стабильной регистрации активности нейронов миндалины кролика. Благодаря стабильной регистрации нам удалось протестировать 147 стабильно регистрируемых нейронов и зрительными, и слуховыми стимулами.

Источники финансирования: Работа частично поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-015-00349_a) и средствами государственного бюджета по государственному заданию Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021-2023 гг.

Литература

1. McMahon D, Russ B, Elnaiem H, Kurnikova A, Leopold D (2015) Single-unit activity during natural vision: diversity, consistency, and spatial sensitivity among AF face patch neurons. *J Neurosci* 35 (14): 5537-5548.
2. Bondar I, Leopold D, Richmond B, Victor J, Logothetis N (2009) Long-term stability of visual pattern selective responses of monkey temporal lobe neurons. *PLoS One* 4 (12): e8222.

3. Fraser G, Schwartz A (2012) Recording from the same neurons chronically in motor cortex. *J Neurophysiol* 107 (7): 1970-1978.

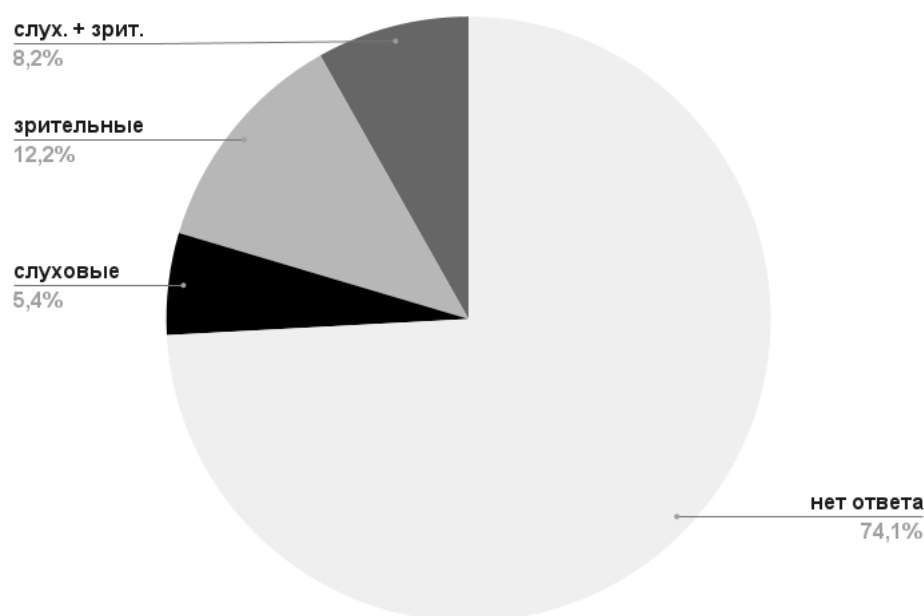


Рисунок 1. Доля нейронов, отвечающих на стимулы разной модальности.

RESPONSES OF STABLE NEURONS IN RABBIT AMYGDALA TO VISUAL AND AUDITORY STIMULI

Vasileva L.N., Bondar I.V.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

e-mail: luvasilieva@mail.ru, bondar@ihna.ru

Abstract: We studied responses of stable units to visual and auditory stimuli in amygdala of two rabbits. 35 % of neurons were selective to at least one of the stimulus modalities. We found neurons that responded to auditory, to visual and both auditory and visual stimuli.

Key words: single unit, rabbit, chronic recording, stable recording, amygdala

Funding: This study was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (project # 19-015-00349_a) and funds within the state assignment of Ministry of Education and Science of the Russian Federation for 2021-2023.

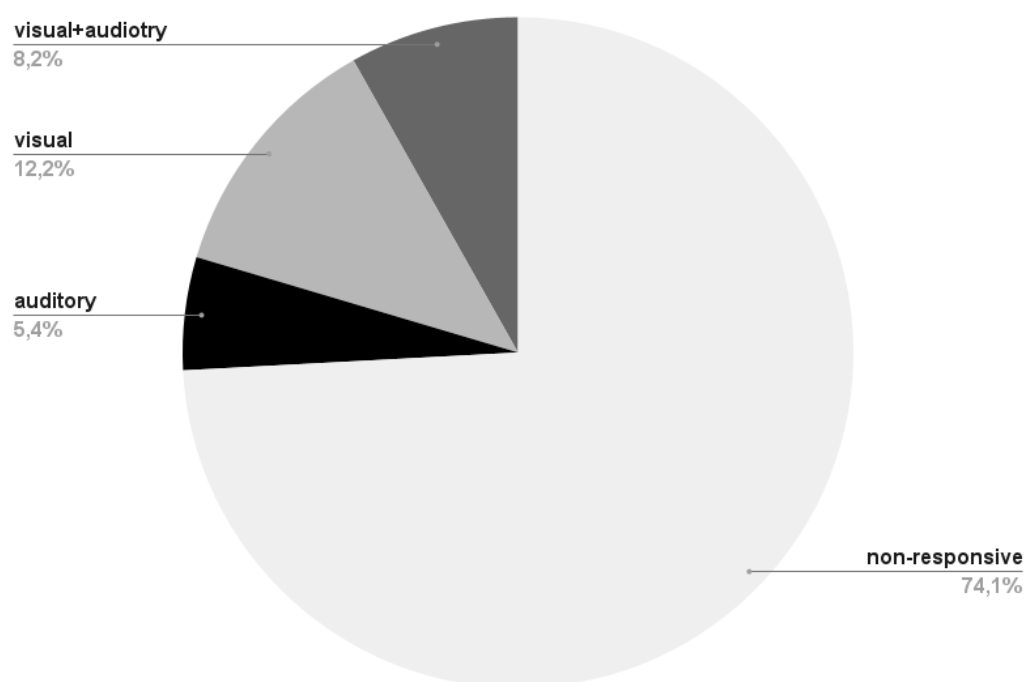


Figure 1. Proportion of neurons responding to stimuli of different modalities.

УДК 575.822

ВЛИЯНИЕ ГЕНОМА РОДИТЕЛЬСКИХ ОСОБЕЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ
ПАМЯТНОГО СЛЕДА У ПОТОМКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER* В
НОРМЕ И ПРИ СТРЕССЕ

**Васильева С.А.¹, Никитина Е.А.^{1,2}, Медведева А.В.², Савватеева-Попова
Е.В.²**

*1 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный педагогический
университет им. А. И. Герцена» Санкт-Петербург, Россия*

*2 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: Swetlana.gorohowa@yandex.ru

Аннотация: В данной работе у линии дрозофилы, несущей мутацию agn^{ts3} гена LIMK1 (ключевого фермента ремоделирования актина) с использованием реципрокных гибридов с линией дикого типа Canton-S изучен вклад материнского и отцовского геномов в когнитивные процессы (обучение и память) в норме и при стрессорном воздействии.

Ключевые слова: LIMK1, обучение и память, слабое статическое магнитное поле

Проблема продолжительности жизни, особенностей медицинской помощи населению пожилого и старческого возраста становится все более актуальной в большинстве стран мира, в том числе и в России. Изучение этиологии и патогенеза нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) – одна из важных проблем нейрологии и медицины. Использование животных моделей дает возможность изучать механизмы функциональных нарушений, лежащих в основе этих заболеваний, а также разрабатывать терапевтические подходы. Удобной моделью для исследования связи между организацией генома и архитектурой хромосом, реализуемой в когнитивных нарушениях, является дрозофила. В частности, линия *agnostic*, несущая мутацию по гену *limk1*. LIMK1 - ключевой фермент ремоделирования актина - участвует в клеточной сигнализации и узнает белки семейств рецепторов и ионных каналов. У мутанта *agnostic* наблюдается триада характерных для большинства НДЗ диагностических признаков: резкие дефекты памяти и обучения, нарушение локомоторного поведения и накопление в тканях мозга амилоидоподобных агрегатов [1].

Стрессовые воздействия занимают важное место среди факторов, провоцирующих социально-значимые заболевания. Развитие всех биологических объектов происходит в магнитном поле (МП) Земли, обладающем огромной проникающей способностью во все биологические системы [2]. Одним из новых и малоизученных стрессорных факторов являются слабые статические МП (ССМП). Воздействие ослабленного

(например, за счет экранирования) статического МП Земли оказывает пагубное, и пока что до конца непонятое влияние в первую очередь на нервную систему и когнитивные функции живых организмов [3].

Конформационная организация пространства ядра, хромосом, генов является фактором лабильности, определяющим процессы детерминации и адаптации, в том числе высшей формы — обучения и памяти. В связи с этим особое значение приобретает изучение роли генетических и эпигенетических факторов в формировании пространственной структуры ядра.

Материал и методы: В настоящем исследовании для получения реципрокных гибридов была использована линия дикого типа Canton-S, а также линия agn^{ts3} , несущая температурно-чувствительную (ts) мутацию по гену *limk1*. В результате скрещивания были получены реципрокные гибриды Canton-S $\times$ agn^{ts3} ; agn^{ts3} $\times$ Canton-S.

У исследуемых линий была изучена динамика условно-рефлекторного подавления ухаживания в контроле и после воздействия ССМП. Ослабление электромагнитного поля Земли проводили с помощью специально разработанной цилиндрической камеры.

Результаты: Показано, что у линии дикого типа Canton-S в контроле индекс обучения (ИО) в течение 3 часов сохранялся на высоком уровне, полученном сразу после тренировки, что свидетельствует о нормальном протекании процессов обучения и памяти. При действии ССМП наблюдается снижение активности ухаживания. Так же, как и в контроле, сразу после тренировки отмечено условно-рефлекторное подавление ухаживания. Однако через 3 часа ИО достоверно снижается, что свидетельствует о нарушении процессов формирования среднесрочной памяти.

У мутанта agn^{ts3} в контроле выработки условно-рефлекторного подавления ухаживания не происходило. После воздействия ССМП на стадии имаго после тренировки наблюдали высокий ИО, сохранявшийся и через 3 часа, что

свидетельствует о восстановлении процессов обучения и памяти после действия стрессового фактора и подтверждает предыдущие исследования [4].

Таким образом, подтверждено тормозящее действие ССМП на деятельность нервной системы у линии дикого типа. Напротив, у мутантной линии *agn^{ts3}* это стрессовое воздействие на стадии имаго приводит к восстановлению способности к обучению и формированию памяти.

В экспериментах с реципрокными гибридами наблюдается патроклинное наследование формирования памятного следа.

ИО гибридов через 3 часа после обучения не отличается от показателя отцовских линий Canton-S или *agn^{ts3}*. Продемонстрировано патроклинное наследование и реакции на стресс у гибридов. В случае отцовской линии *agn^{ts3}* происходит восстановление способности к обучению и формированию памяти при стрессе, в то время как у гибридов *agn^{ts3} × Canton-S* показатели существенно ниже.

Заключение: Исследования в области изучения роли родительских геномов в экспрессии генов потомства показали необходимость учитывать материнский и отцовский эффект в построении прогностических моделей.

Литература

1. Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Zakharov G.A., Savvateeva-Popova E.V. The *Drosophila agnostic* locus: involvement to formation of cognitive defects in Williams syndrome. *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 2. P. 53-61.
2. Бучаченко А.Л. Магнито-зависимые молекулярные и химические процессы в биохимии, генетике и медицине. *Успехи химии*. 2014. Т.83. № 1. С. 1–12.
3. Никитина Е.А., Медведева А.В., Герасименко М.С., Проников В.С., Сурма С.В., Щеголев Б.Ф., Савватеева-Попова Е.В. Ослабленное магнитное поле Земли: влияние на транскрипционную активность генома, обучение и память у *Dr. melanogaster*. *Ж. высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. 2017. Т. 67. № 2. С. 246–256.
4. Никитина Е.А., Каминская А.Н., Молотков Д.А., Попов А.В., Савватеева-Попова Е.В. Влияние теплового шока на обучение, формирование памяти и содержание LIMK1 в мозге самцов *Drosophila melanogaster* с измененной структурой гена *limk1*. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2014. Т. 50. № 2. С. 137 – 147.

EFFECT OF THE PARENTAL GENOME ON MEMORY FORMATION IN THE DESCENDANTS OF DROSOPHILA MELANOGASTER IN NORMAL AND UNDER STRESS

Vasileva S.A.¹, Nikitina E.A.^{1,2}, Medvedeva A.V.¹, Savvateeva-Popova E.V.¹

¹ Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia

² Herzen State Pedagogical University, St. Petersburg, Russia

Abstract. In this study, in *Drosophila* strain carrying *agn*^{ts3} mutation of the gene for LIMK1 (a key enzyme of actin remodeling) using reciprocal hybrids with the wild-type Canton-S, we investigated the contribution of the maternal and paternal genomes to cognitive processes (learning and memory) in normal conditions and stressor exposure to a weak static magnetic field.

Keywords: LIMK1, learning, memory, weak static magnetic field

УДК 577.24

СТРЕССОРНЫЙ ОТВЕТ МАТЕРИ НА ГИПОКСИЮ ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ НА ПРОТЯЖЕНИИ ВСЕЙ ЖИЗНИ ПОТОМСТВА КРЫС

Ветровой О.В.^{1,2}, Стратиллов В.А.¹

¹ *ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург,
Россия.*

² *ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский Государственный Университет”,
Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия.*

E-mail: yov210292@yandex.ru

Ключевые слова: пренатальная гипоксия; глюкокортикоиды; глюкокортикоидные рецепторы; гиппокамп; печень

Аннотация: Пренатальная гипоксия (ПГ) является фактором риска развития множества тяжелых неврологических заболеваний [1,2]. Известно, что стрессорная реакция матери на гипоксию сопряжена с эпигенетическим нарушением перинатальной экспрессии глюкокортикоидных рецепторов (ГР) в гиппокампе потомства [1,3], однако информации о том, как это влияет на функциональное состояние глюкокортикоидной системы в дальнейшем онтогенезе, недостаточно.

В рамках настоящего исследования были изучены долгосрочные эффекты ПГ на функционирование глюкокортикоидной системы на протяжении всей жизни, а также осуществлена проверка прямой связи между стрессорным ответом матери и устойчивым нарушением экспрессии ГР в гиппокампе потомства.

Методика: Для индукции стрессорного ответа матери нами использована модель тяжелой гипобарической гипоксии (пренатальная гипоксия, ПГ), которой подвергали беременных самок крыс на 14-16 сутки беременности, период закладки гиппокампа у плода. Количество кортикостерона (КС) определяли в плазме крови беременных самок и у самцов потомков в возрасте 1 день (новорожденные), 2 недели (ювенильные), 3 месяца (взрослые) и 18 месяцев (стареющие) методом иммуноферментного анализа. Количество и локализацию глюкокортикоидных рецепторов (ГР) определяли в гиппокампе и печени самцов крыс иммуногистохимическим методом и методом вестерн блотт. Транскрипцию глюкокортикоид-зависимых генов (*maoa*, *crhr1*) в гиппокампе определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Эффективность периферической рецепции глюкокортикоидов определяли по активности глюкозо-6-фосфатазы (Г6Фазы) в печени и количеству глюкозы в крови.

Результаты: В ответ на предъявление первого гипоксического сеанса в плазме крови беременных крыс происходит увеличение количества КС, однако при повторном предъявлении гипоксии уровень КС не отличается от контрольного, а в дальнейшем его количество снижается. В плазме крови новорожденных крысят, переживших ПГ, количество КС также ниже контроля, что сопровождается увеличением количества ГР в печени. Активность глюкозо-6-фосфотазы печени и количество глюкозы в плазме крови ПГ крысят не отличаются от контроля, что указывает на компенсацию недостатка КС повышенным количеством ГР в печени на этом этапе онтогенеза. Однако при анализе гиппокампальных звеньев глюкокортикоидной системы новорожденных ПГ крысят нами показано уменьшение как общего количества ГР и их ядерной локализации, так и интенсивности транскрипции глюкокортикоид-зависимых генов. Уменьшение количества ГР и интенсивности глюкокортикоид-зависимой транскрипции в гиппокампе сохраняется на протяжении всей жизни, сопровождаясь нарушением контроля глюкокортикоидной отрицательной обратной связи и, как следствие, нормализацией базального уровня КС в плазме ювенильных крыс и его стабильным увеличением у взрослых и стареющих животных. Хроническое повышение уровня КС вызывает снижение количества ГР в печени до контрольного уровня у взрослых крыс и дальнейшее уменьшение их количества у стареющих крыс, что сопровождается уменьшением активности Г6Фазы и гипогликемией.

Для оценки роли глюкокортикоидного стрессорного ответа матери на гипоксию в формировании выявленной периферической и центральной дисфункции глюкокортикоидной нейроэндокринной системы потомства была проведена дополнительная серия экспериментов с использованием ингибитора синтеза кортикостерона метирапона. Подавление материнской глюкокортикоидной реакции на гипоксию инъекцией метирапона беременным крысам перед

каждым гипоксическим сеансом предотвращает снижение белковой экспрессии ГР в гиппокампе потомства.

Заключение: Таким образом, нами установлено, что:

- 1) Снижение чувствительности к глюкокортикоидам гиппокампа крыс, переживших ПГ, сохраняется на протяжении всей жизни;
- 2) Следствием нарушения чувствительности гиппокампа к глюкокортикоидам является стабильная гиперактивация гипоталамо-гипофиз-адренокортикальной оси;
- 3) Устойчивое увеличение базального уровня глюкокортикоидов сопровождается возрастными нарушениями их периферической рецепции и, как следствие, реализации глюкокортикоид-зависимых функций;
- 4) При этом использование ингибитора синтеза кортикостерона предотвращает уменьшение количества глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе после ПГ.

По результатам проведенных исследований [4] можно сделать вывод, что именно стрессорный ответ матери на гипоксию опосредует нарушение чувствительности гиппокампа плода к глюкокортикоидам, что в дальнейшем определяет центральные и периферические нарушения функционирования глюкокортикоидной системы.

Литература

1. Gonzalez-Rodriguez P.J., Xiong F., Li Y., Zhou J., Zhang L. (2014) Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats: Role of glucocorticoid receptors. *Neurobiology of Disease*, 65, 172-179, doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.020
2. Li Y., Gonzalez P., Zhang L. (2012) Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions. *Progress in Neurobiology*, 98, 2, 145-1651, doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.010

3. Xiong F., Zhang L.. (2013) Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34, 27–46, doi: 10.1016/j.yfrne.2012.11.002
4. Vetrovoy O., Tyulkova E., Stratilov V., Baranova K., Nimiritsky P., Makarevich P., Rybnikova E. (2021) Long-term effects of the prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats. *Developmental Neuroscience*, 42, 145–158, doi: 10.1159/000512223

LONG-TERM EFFECTS OF PRENATAL SEVERE HYPOXIA ON CENTRAL AND PERIPHERAL COMPONENTS OF THE GLUCOCORTICOID SYSTEM IN RATS

Vetrovoy O.V.^{1,2}, Stratilov V.A.¹

¹ *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg,
Russia*

² *Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*

Abstract: At the basis of the pathogenesis of many serious diseases is a violation of oxygen supply. The action of hypoxia is extremely dangerous in early ontogenesis - during prenatal and early postnatal development. The formation of developmental pathologies is caused by violations of the setting of the sensitivity thresholds of the signaling systems of the fetus, mediated not only by hypoxia itself, but also by the release of stress hormones by the mother's body. The present study focused on assessing the role of the maternal glucocorticoid response to hypoxia in the formation of impaired functioning of the glucocorticoid neuroendocrine system throughout the life of the offspring.

Key words: prenatal severe hypoxia; glucocorticoids; glucocorticoid receptors; hippocampus; liver

УДК 612.821

УЧАСТИЕ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Волобуева Ю.Е.

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: uliana1997-7050@yandex.ru

Аннотация: Изучение функции холинергической системы в процессах обучения и памяти в норме и при определенных формах патологии относится к числу актуальных направлений нейрофизиологии. В работе проводилось исследование влияния фактора роста нервов на синаптическую пластичность поля СА1 гиппокампа на модели с дегенерацией септальных холинергических нейронов, вызванной иммунотоксином 192IgG-сапорином.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; холинергический дефицит; фактор роста нервов; иммунотоксин 192IgG-сапорин; долговременная потенция.

Данные литературы свидетельствуют о том, что активность холинергических нейронов тесно связана с процессами обучения и памяти [1]. Потеря холинергических нейронов, приводящая к дегенерации холинергической системы, является одной из причин патогенеза болезни Альцгеймера (БА) и может быть основной причиной нарушения обучения и памяти [1, 2, 3]. Известно, что при БА наблюдается не только потеря холинергических нейронов в базальном переднем мозге, но и потеря холинергической иннервации гиппокампа [2]. В экспериментах холинергическая дисфункция моделируется с помощью введения иммунотоксина 192IgG-сапорина.

Существуют данные, показывающие, что фактор роста нервов (NGF) может оказывать положительное влияние на холинергическую функцию, способствуя выживаемости холинергических нейронов [4]. NGF в гиппокампе экспрессируется интернейронами, поглощается аксонами базальных холинергических нейронов переднего мозга и транспортируется в их тела [5]. В нашей работе мы использовали модель дегенерации септальных холинергических нейронов, вызванную иммунотоксином 192IgG-сапорином, чтобы определить, может ли аппликация NGF на срезы гиппокампа уменьшить последствия холинергического дефицита.

Методика: Эксперименты проводили на 21 половозрелом самцах крыс линии Wistar (200 - 250 г), полученных из питомника "Пушино" филиала ИБХ РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. От каждого животного в электрофизиологических экспериментах использовали от 2 до 4 срезов гиппокампа ($n = 14-19$ /группу). Иммунотоксин 192-SAP (Merck, США) вводили стереотаксически под ингаляционной анестезией изофлюраном непосредственно в область медиального септума (1,5 мкл/животное). В контрольной группе животные получали эквивалентные объемы растворителя фосфатно-солевого буфера (PBS). Введение в медиальную септальную область производили под углом по следующим координатам: AP + 0,4 мм, L – 1,5 мм, 14-15°. Препарат вводили с помощью микроинфузионного насоса (Stoelting Co., США) со скоростью 0,5 мкл/мин. Через 21 день после инъекции подопытное животное декапитировали, извлекали мозг и готовили горизонтальные срезы гиппокампа толщиной 400 мкм с помощью вибратора (Leica Biosystems, Германия) в ледяной искусственной спинномозговой жидкости (ACSF). Приготовление, инкубация, регистрация фокальных потенциалов (фВПСП) проводилась по стандартным методикам.

Регистрация фВПСП осуществляли в поле CA1 с помощью стеклянного микроэлектрода, заполненного ACSF, со средним сопротивлением 1-5 МОМ. Стимуляцию срезов производили с помощью биполярного электрода (нихромовая проволока, 80 мкм) подведенного к коллатералям Шаффера. ФВПСП регистрировали в ответ на парные импульсы с межстимульным интервалом 50 мс и частотой тестирования 0,033 Гц. Использовали интенсивность стимула, вызывавшую фВПСП амплитудой 50-60% от максимума. В эксперименте участвовало три группы животных. Контрольная группа (n=14), с предварительной инъекцией PBS в ACSF, опытная, с предварительной инъекцией иммунотоксина SAP в ACSF (n=19) и группа SAP в ACSF+NGF (n=14), которая была проинкубирована с NGF. Запись проводили в 3 этапа: 1) Запись базовой линии: 40 минут.

2) Инкубация с NGF в дозе 200нг/мл для группы SAP в ACSF+NGF. Затем запись фВПСП в течение 20 минут. 3) Тетанизацию, вызывавшую длительную потенцию (ДП) проводили высокочастотной стимуляцией (HFS) (3 последовательности по 1 сек 100 Гц каждая, применяемые с интервалом 20 с), с использованием той же интенсивности стимула, что и для записи базовой линии. После индукции ДП фВПСП регистрировались еще в течение 60 минут.

После декапитации каждого животного извлекали переднюю часть мозга и на вибротоме делали 50 мкм фронтальные срезы медиальной септальной области, для оценки степени гибели холинергических нейронов с помощью окрашивания на холинацетилтрансферазу (ХАТ). После отмывки срезов в растворе PBS, содержащем 0.3% Triton X100 (Serva, ФРГ) свободно плавающие срезы инкубировали в растворе поликлональных антител кролика к ХАТ (Santa Cruz Biotechnology, США) в разведении 1:500 в течение ночи при 4°C. На следующий день срезы отмывали в PBS-Т и инкубировали с антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с биотином (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 800. Все антитела разводили в блокирующем растворе, состоявшем из 5% неиммунной сыворотки козы в PBS-Т, при комнатной

температуре в течение 1 ч. После дополнительной промывки в PBS срезы инкубировали с комплексом авидин-биотин-HRP (ABC Elite kit, Vector Labs, США) в течение 1 ч. В качестве хромогена применяли 3,3'-диаминобензидин (SIGMA-Fast Kit, Sigma-Aldrich, США). Все изображения были получены с помощью микроскопа Leica DM6000B (Leica Biosystems, Германия). Подсчет клеток проводили на 21 срезе, содержащем медиальное септальное ядро.

Статистическая обработка данных. В качестве основного параметра, описывающего динамику ДП, была выбрана амплитуда фВПСП, измеренная полуавтоматически с помощью программного обеспечения Clampfit 10.2. Полученные данные были усреднены и нормализованы к ответам за последние 10 минут до подачи высокочастотной стимуляции. Статистическая обработка данных производилась с помощью программы Statistica 10 (StatSoft, США). Для оценки достоверности результатов использовался двухфакторный ANOVA-метод с одним межгрупповым (фактор группы) и одним внутригрупповым (повторные измерения) факторами.

Результаты: В ходе анализа влияния NGF на характеристики вызванных ответов поля CA1 гиппокампа было проведено две серии экспериментов. В первой из них выявлено, что аппликация NGF в дозе 200нг/мл на срезы, полученные от контрольных животных, не оказывает значимого влияния на величину базовой линии и ДП (рис. 1).

Исследование изменений фокальных потенциалов в группах с дегенерацией нейронов в медиальной септальной области выявило значимые межгрупповые отличия по амплитуде ответов фокальных потенциалов поля CA1 гиппокампа. Показано, что амплитуда ДП у животных, получавших инъекции сапорина (1,5 мкл/животное) стабильно снижена по сравнению с контролем на протяжении 60 минут после тетанизации ($F(2,40) = 3.3$, $p < 0,05$; ANOVA-метод; повторные измерения 0-60 мин (рис. 2). Кроме того, показан значимый эффект времени $F(139, 5560) = 43.3$, $p < 0,0001$) и значимое взаимодействие между

факторами $F(278,5560)=1.75$, $p<0,0001$). Более детальный Post Hoc анализ выявил, что во всех группах наблюдался значимый прирост амплитуды после тетанизации коллатералей Шаффера, однако в группе животных, которым делали инъекции SAP достоверные изменения наблюдались лишь в первые 5 минут. В группе животных с введенным иммунотоксином инкубация срезов в NGF приводила к восстановлению уровня амплитуды фВПСП до контрольных значений.

Иммуногистохимический анализ срезов мозга, проведенный после завершения всех электрофизиологических экспериментов, показал, что инъекции 192IgG-сапорина индуцировали гибель большинства ХАТ-позитивных нейронов в медиальной септальной области. Гибель ХАТ-позитивных клеток в этой области варьировала от 50 до 90 %, соответственно, в среднем на срез медиальной септальной области после инъекции PBS приходилось $94\pm12,7$ клетки, после инъекции SAP – $31\pm4,8$ клеток ($F(1, 19)=19,519$, $p<0.05$; ANOVA-метод, однофакторный).

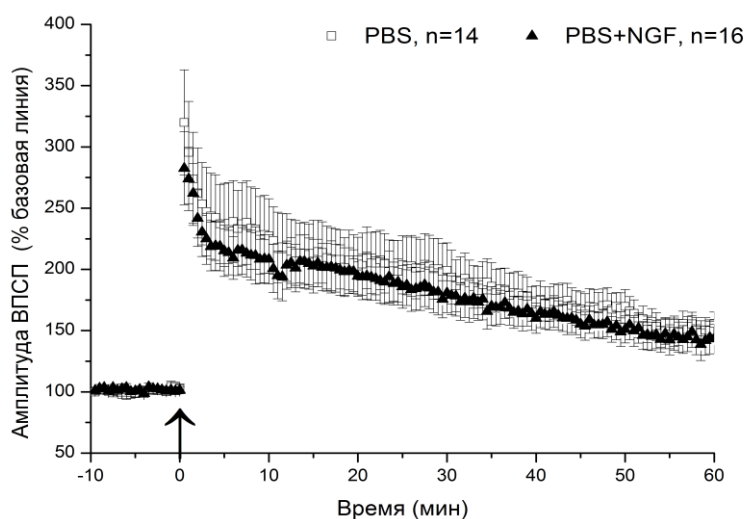


РИС. 1 ВПСП в условиях ДП у крыс контрольной группы (PBS) и группы животных с инъекцией PBS и аппликацией срезов в NGF в дозе 200нг/мл (PBS +NGF).

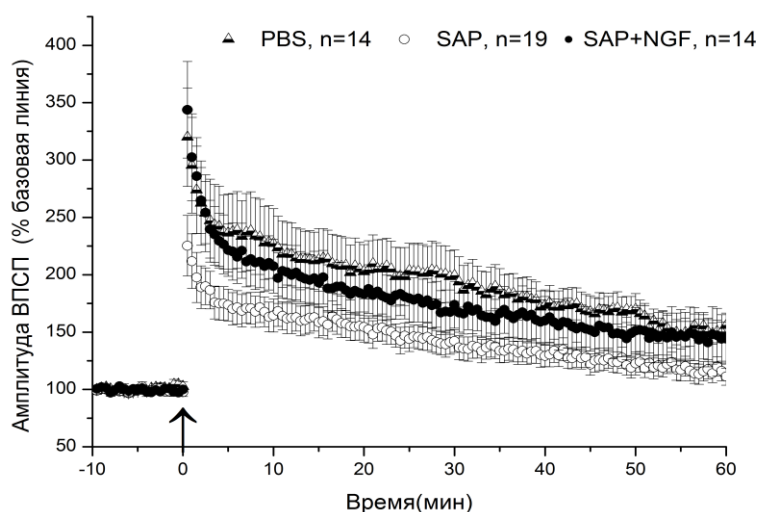


РИС. 2 фВПСП в условиях ДП у крыс контрольной группы (PBS), группы животных с инъекцией SAP (SAP) и группы, в которой холинергический дефицит корректировали с помощью NGF (SAP+NGF).

Заключение: Иммуногистохимический анализ срезов мозга показал, что внутрисептальная инъекция иммунотоксина 192IgG- вызывает достоверное снижение количества холинергических нейронов в медиальной септальной области. Возникающий в результате этого холинергический дефицит приводит к ухудшению пластических свойств синаптической связи нейронов поля CA1 – коллатерали Шаффера. NGF способен оказывать положительный эффект на синаптическую передачу в условиях холинергического дефицита в гиппокампе, что согласуется с имеющимися в литературе данными [8], где продемонстрировано протективное действие NGF на ДП в условиях действия бета-амилоида. Это позволяет сделать вывод, что NGF может быть использован в качестве средства для коррекции нарушений, связанных с холинергическим дефицитом.

Литература

1. Michael E. Hasselmo. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior // Behavioural Brain Research – 1995 - Vol. 67(1) - PP 1-27.

2. Bolshakov A.P., Stepanichev M.Y., Dobryakova Y.V., Spivak Y.S., Markevich V.A. Saporin from *Saponaria officinalis* as a Tool for Experimental Research Modeling, and Therapy in Neuroscience.//Toxins –2020 - Vol. 12(9) - PP 546. doi: 10.3390/12090546.
3. Dobryakova, Y.V., Volobueva, M.N., Manolova, A.O.; Medvedeva, T.M., Kvichansky, A.A., Gulyaeva, N.V.; Markevich, V.A.; Stepanichev, M.Y.; Bolshakov, A. Cholinergic deficit induced by central administration of 192IgG-saporin is associated with activation of microglia and cell loss in the dorsal hippocampus of rats. //Front Neurosci- 2019 – Vol. 13 – PP 146. doi: 10.3389/fnins.2019.00146.
- 4 Winkler J., Gilbert A. Ramirez , Leon J. Thal and Jerene J. Waite Nerve Growth Factor (NGF) Augments Cortical and Hippocampal Cholinergic Functioning after p75NGF Receptor-Mediated Deafferentation But Impairs Inhibitory Avoidance and Induces Fear-Related Behaviors //J NEUROSCI. – 2000 - Vol. 20(2) - PP 834-44. doi: 10.1523/20-02-00834.2000.
5. Seiler M, Schwab ME. Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. //Brain Res. – 1984 - Vol. 300(1) – PP 33-9. doi: 10.1016/0006-8993(84)91338-6..
6. Luca Rosario La Rosaa, Luca Rosario La Rosaa, Carmela Matronea,b, Caterina Ferrainac, Maria Beatrice Panicoc, Silvia Piccirillic Maria Grazia Di Certoa,, Georgios Strimpakosa, Nicola Biagio Mercuri ,Pietro Calissanoa,c, Marcello D’Ameliod,e,1 and Robert Nistic. Age-Related Changes of Hippocampal Synaptic Plasticity in AβPP-Null Mice are Restored by NGF Through p75NTR.// J Alzheimers Dis. – 2013 – Vol. 33(1) – PP 265-72. doi: 10.3233/JAD-2012-112108
7. Dashiani MG, Kruashvili LB, Rusadze KhZ, Matatradze SB, Beselia GV. [Effects of immunotoxic and electrolytic lesions of medial septal area on spatial short-term memory in rats.](#) //Georgian Med News. - 2015 – Vol. (239) – PP 98-103. PMID: 25802458
8. Ivanov AD, Tukhbatova GR, Salozhin SV, Markevich VA. NGF but not BDNF overexpression protects hippocampal LTP from beta-amyloid-induced impairment. //J Neuroscience – 2015 – Vol. 289 – PP 114-22. doi: 10.1016

INVOLVEMENT OF NERVE GROWTH FACTOR IN CORRECTION OF SYNAPTIC PLASTICITY DISORDERS.

Volobueva U.E.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

E-mail: uliana197-7050@yandex.ru

Abstract: In this work, we studied the effect of nerve growth factor on the synaptic plasticity of the CA1 field of the hippocampus in a model with degeneration of septal cholinergic neurons caused by the 192IgG-saporin immunotoxin.

Key words: Alzheimer's disease; cholinergic deficiency; nerve growth factor; immunotoxin 192IgG-saporin; long-term potentiation.

УДК 612.821

**ВЛИЯНИЕ СОЦИАЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ И ОБОГАЩЕННОЙ СРЕДЫ НА
ИМПУЛЬСИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ КРЫС С РАННИМ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫМ СТРЕССОМ.**

В.А. Груздева, Ф.Х. Закиров, М.И. Зайченко

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

e-mail: Work.gruzdeva@gmail.com

Аннотация: Исследовали влияние условий содержания на импульсивное поведение крыс. Животные, содержащиеся в обогащенной среде, были более импульсивными, чем находившиеся в социальной изоляции. Ранний провоспалительный стресс не влиял на проявление импульсивности. Самки, содержащиеся в условиях обогащенной среды, оказались импульсивнее самцов.

Ключевые слова: импульсивность, стресс, воспаление, изоляция, обогащенная среда

Известно, что стресс, пережитый в раннем возрасте, приводит к развитию целого ряда психопатологий в зрелом периоде жизни. К ним относится и проявления чрезмерной импульсивности. Нейровоспаление является одним из возможных механизмов, через который ранний стресс оказывает отрицательное влияние на развитие и формирование многих функций. Ранее нами было показано, что ранний провоспалительный липополисахаридный (ЛПС) стресс

статистически значимо усиливал импульсивное поведение у взрослых животных. Целью настоящей работы было исследование влияния условий содержания животных (социальная изоляция, обогащенная среда) на проявление импульсивного поведения у крыс в норме и с ранним ЛПС стрессом. Социальная изоляция является одной из важных форм стресса в подростковом периоде. Она лишает крысят игрового поведения, безобидных схваток, хватания зубами за шерстку партнеров и других форм социального взаимодействия, которые некоторые авторы рассматривают в качестве предподготовки для формирования защитных реакций в будущем. В то же время имеются данные, что проживание в условиях обогащенной среды может смягчать влияние острого и хронического стресса [1,2]. Мы предполагали, что социальная изоляция, оказывая дополнительное стрессорное действие, будет усиливать влияние раннего ЛПС стресса на проявление импульсивного поведения, а обогащенная среда, наоборот, противодействуя отрицательным эффектам ЛПС стресса, будет снижать импульсивность, смещая поведение к самоконтрольным реакциям.

В задачи работы входило: создать ранний провоспалительный стресс, обеспечить различные условия содержания животных (изоляция и обогащенная среда) и исследовать у них импульсивное поведение методом delay-discounting.

Методика

В опытах было использовано 132 крысы линии Вистар в возрасте от 6 до 10 мес (78 самцов и 54 самок). Крысята были выведены в виварии ИВНД и НФ от крыс, полученных из филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. 65 крысятам на 3-й и 5-й дни жизни с помощью шприца вводили в холку бактериальный липополисахарид в дозе 50 мкг/кг в объеме 10 мкл/г (группа ЛПС), вызывая тем самым провоспалительный стресс. 67 крысятам в этом же возрасте подкожно в том же объеме вводили физиологический раствор (группа ФИЗ). В возрасте 25 дней крысят отлучали от матери и разделяли на подгруппы

в зависимости от пола. В дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму ПК-120.

В возрасте 45 дней каждую группу крыс делили на три группы в зависимости от условий содержания, которые оставались неизменными до конца экспериментов. Одна группа крыс содержалась в стандартных условиях по 3-5 животных в клетке (группа СТАНД). Вторая группа крыс подвергалась социальной изоляции (СИ). При социальной изоляции крысы содержались поодиночке в клетках размером 30х30х17.5см. Третья группа помещалась в обогащенную среду (группа ОС), которая создавалась в камере размером 51х40.5х30см, где находились лесенки, беличье колесо, материал для зарывания, трубки. В обогащенную среду крыс помещали на 20 мин через день. Четвертая группа крыс (только самцы) постоянно содержалась в обогащенной среде в клетке 38х55х90см, где находились лесенки, гамак, беличье колесо, материал для зарывания, трубки (группа СО).

Таким образом, в работе анализировали поведение 8 групп крыс: ФИЗ+СТАНД (30 крыс), ЛПС+СТАНД (29 крыс), ФИЗ+ОС (15 крыс), ЛПС+ОС (14 крыс), ФИЗ+СИ (13 крыс), ЛПС+СИ (14 крыс), ЛПС+СО (8 крыс), ФИЗ+СО (9 крыс).

В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU), и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Методика delay discounting. Во время проведения экспериментов по изучению импульсивного поведения (delay-discounting) крысам ограничивали доступ к пище так, чтобы их вес поддерживался на уровне 85% от их веса при свободном доступе к пище. Крыс в возрасте 4-6 мес начинали обучать нажимать на педаль для получения пищи – стандартной пелеты (dustless precision pellets) 45 мг производства фирмы “BioServ” (США). Обучение проводилось до тех пор, пока крыса с равной вероятностью не нажимала на

каждую из педалей. Затем режим подкрепления меняли так, что нажатие на одну из педалей предоставляло 1 пелету, тогда как нажатие на другую – 4 пелеты, но с задержкой в 5 с. Во время ежедневной экспериментальной сессии крысам предоставляли 25 проб. Регистрировали число нажатий на обе педали (k_1 – число нажатий на педаль, предоставляющую слабое, но немедленное подкрепление, k_2 – число нажатий на педаль для получения более ценного, задержанного подкрепления). Рассчитывали долю задержанных реакций – $k_2/(k_1 + k_2)$, где 1 – 100% выбор задержанного подкрепления, а 0 – 100% выбор малоценного немедленного.

Статистическая обработка результатов. При обработке результатов использовали стандартную программу STATISTICA 10.0. Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова. Поскольку анализируемые параметры удовлетворяли данному критерию, то при сопоставлении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел factorial ANOVA. При post-hoc анализе применяли критерий Fisher LSD. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Исследовали влияние факторов ПОЛ, ГРУППА и ВОЗРАСТ крыс и взаимодействие этих факторов.

Результаты

Влияние социальной изоляции. В целом по всем животным изолированное содержание крыс приводит к статистически значимому ($p < 0.05$) снижению импульсивности по сравнению с животными, выращенными в стандартных условиях.

Социальная изоляция оказывала более выраженное влияние ($p < 0.05$) на самцов, хотя у самок также происходило снижение импульсивности по сравнению с животными, содержащимися в стандартных условиях, но не столь очевидное. При стандартных условиях выращивания самцы, пережившие ранний провоспалительный стресс, демонстрировали достоверно более высокую

импульсивность ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными животными. При содержании в условиях изоляции показатели импульсивности не только превышали значения контрольных животных, но и смещались в сторону самоконтроля. У контрольных животных, и у животных ЛПС группы происходило снижение ($p < 0.05$) импульсивности при содержании их в условиях социальной изоляции, однако усиление поведения самоконтроля было лучше выражено у крыс ЛПС группы. У самок, выращенных в изоляции различий в уровне импульсивности между группами ФИЗ и ЛПС не наблюдалось.

Влияние обогащенной среды. Пребывание в обогащенной среде, в целом по всем животным, приводило к значимому ($p < 0.05$) усилению импульсивности. Усиление импульсивности проявилось за счет группы самок, которые статистически значимо ($p < 0.05$), по сравнению с крысами, проживающими в стандартных условиях, предпочитали в меньшей степени немедленное подкрепление. У самцов пребывание в обогащенной среде никак не сказалось на импульсивности, ее уровень практически не отличался от животных, проживающих в стандартных условиях

Влияние раннего провоспалительного стресса сильнее прослеживалось у крыс самцов. Даже при содержании в нормальных стандартных условиях происходило увеличение уровня импульсивности у самцов, переживших ранний ЛПС стресс. Обогащенная среда не изменила этой тенденции, хотя большой разброс не позволил различиям достичь уровня статистической значимости. У самок же различий между группами, получившими инъекцию физ.р-ра и липополисахарида в раннем возрасте не проявилось совсем.

Влияние постоянной обогащенной среды оказалось статистически значимо у самок по сравнению с группой, находившейся в изоляции и со стандартной группой, приводя к большей импульсивности.

Среди самцов различных групп наибольшая статистически достоверная разница отмечена в группе изоляции, по сравнению с остальными группами.

Анализ импульсивного поведения группы СО показал, что постоянное содержание животных в условиях обогащенной среды приводит к еще большему усилению импульсивности даже по сравнению с группой ОС, что еще раз подтверждает связь выращиванию в среде, богатой разнообразными стимулами и импульсивности.

Заключение

Таким образом, длительная социальная изоляция приводила к снижению импульсивного поведения, оцениваемого по методике delay-discounting, у самцов по сравнению с контрольными животными. Эта разница еще больше усиливалась у самцов, испытавших двойной стресс (СИ+ЛПС). У самок различия между группами были менее выражены. Пребывание в обогащенной среде приводило к усилению импульсивного поведения, но только у самок, а не у самцов, по сравнению крысами, проживавшими в стандартных условиях. Ранний ЛПС стресс у крыс, пребывавших в обогащенной среде, нивелировал у них прирост импульсивности, в результате различия между ЛПС и контрольными группами стали недостоверными, как у самок, так и у самцов. В противоположность нашим ожиданиям, социальная изоляция привела к ослаблению импульсивности у самцов, а обогащенная среда к ее усилению у самок, по сравнению с контрольными животными. Ранний ЛПС стресс еще больше снижал импульсивность у самцов, подвергавшихся СИ, но уменьшал прирост импульсивности у крыс в условиях обогащенной среды. Хотя мы получили противоположные, чем ожидали результаты, некоторые исследователи [1,2] также наблюдали не усиление, а ослабление импульсивного поведения у крыс, переживших социальную изоляцию. Они объясняли большей чувствительностью крыс, бывших в СИ, к величине подкрепления при его одинаковой задержке в случае выполнения краткосрочных и долгосрочных реакций, чем крысы, жившие в обогащенной среде. По мнению авторов, социальная изоляция вызывает у крыс большую чувствительность к

подкрепляющим свойствам пищевого подкрепления, проявляя более высокую степень побудительной (incentive) мотивации к подкреплению и большую реактивность к различиям величин подкрепления. Рассмотренные практические и теоретические вопросы требуют дальнейшего специального исследования.

Литература:

1. Kirkpatrick K., Marshall A.T., Clarke J., Cain M.E. [Environmental rearing effects on impulsivity and reward sensitivity](#). Behav Neurosci. 2013. 127(5):712-724.
2. Kirkpatrick K., Marshall A.T., Smith A.P., Koci J., Park Y. [Individual differences in impulsive and risky choice: effects of environmental rearing conditions](#). Behav. Brain Res. 2014. 269:115-127.

Effect of social isolation and enriched environment on impulsive behavior in rats with early proinflammatory lipopolysaccharide stress.

V.A. Gruzdeva, F.Kh. Zakirov, M.I. Zaichenko

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

e-mail: Work.gruzdeva@gmail.com

Abstract: We investigated the influence of the social environment on the impulsive behavior in rats. The animals raised in an enriched environment were more impulsive than rats kept in social isolation. Early stress did not affect the impulsivity in these conditions. Females kept in an enriched environment turned out to be more impulsive than males.

Key words: Impulsivity, stress, inflammation, social isolation, enriched environment

УДК 612.821

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА KB-R7943 В ОРГАНАХ И
ОТДЕЛАХ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ПРИ
ПОМОЩИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ

Дашиева В.Ж.^{1,2}, Бородин М.А.³, М.В. Беляков⁴, Сухов И.Б.^{1, 2, 3}, Чистякова
О.В.¹, Шестакова Н.Н.¹

*1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии
наук, Санкт-Петербург, Россия*

*2 Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

3 НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

*4 Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-
исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»
Федерального медико-биологического агентства, Ленинградская область,
Россия*

E-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Аннотация: KB-R7949 известен как селективный блокатор натрий-кальциевого обменника (NCX). Было показано, что NCX косвенно влияет на ионную проводимость ионотропных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), участвующих в патогенезе нейропатического болевого синдрома. Было высказано предположение, что KB-R7949 может обладать анальгетической активностью для облегчения нейропатической боли.

Для проверки данной гипотезы на первом этапе было проведено исследование по определению распределения KB-R7949 в образцах тканей крыс после внутривенного введения препарата методом жидкостной

хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием после извлечения анализируемого препарата (аналита) из матрицы, очистки и концентрирования экстракта.

Ключевые слова: KB-R7943; нейропатическая боль; метод HPLC-MS/MS; крыса.

Поиск патофизиологических и нейрохимических механизмов нейропатической боли и способов её купирования является актуальной задачей. Нейропатическая боль – это боль, которая возникает или была спровоцирована поражением или дисфункцией нервной системы. Патогенез хронической нейропатической боли обусловлен гиперактивацией глутаматергической системы и зависит от активации рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR) [1,2]. Ключевую роль в управлении ионной проводимостью NMDAR играет натрий-кальциевый обменник (NCX) [3]. Предполагается, что опосредованное воздействие на NMDA-рецепторы селективных блокаторов NCX могут быть эффективны для купирования синдрома хронической нейропатической боли [4]. Клинические испытания показывают, что препараты, опосредованно воздействующие на NMDAR, более безопасны из-за меньших побочных эффектов и меньших дозировок [7]. Препарат KB-R7949 известен как селективный блокатор натрий-кальциевого обменника (NCX) [3]. Показано [5], что NCX опосредованно влияет на ионную проводимость ионотропных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), участвующих в патогенезе нейропатического болевого синдрома [6]. Сформулирована гипотеза, что KB-R7949 может обладать анальгетической активностью для купирования нейропатической боли. Фармакокинетические характеристики KB-R7943, необходимые для оценки его противоболевого действия, изучены недостаточно. Представленная работа направлена на изучение распределения KB-R7943 в целевых отделах мозга, характеризующихся наибольшей экспрессией NCX, а также в плазме крови,

сердце и моче в зависимости от времени после внутривенного введения препарата.

Методика: Основная группа исследования – здоровые крысы-самцы линии Wistar, возраст 4,5 месяцев, которым однократно внутривенно был введён препарат KB-R7943 в дозировке 20 мг/кг ($n=10$, масса 369 ± 15 г). Группа контроля – здоровые крысы ($n=3$, масса 345 ± 8 г). Через 1, 6 и 24 часа после введения препарата проводился забор крови, мочи и взятие образцов тканей гипоталамуса, гиппокампа и сенсомоторной коры. Выделение образцов тканей отделов головного мозга проводили после проведения перфузии верхней части туловища крысы раствором PBS, а образцы тканей гомогенизировали. Содержание KB-R7943 в полученных пробах плазмы, мочи и гомогенатов тканей отделов головного мозга проводили методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Результаты: Анализ содержания KB-R7943 установил, что препарат проникает через гематоэнцефалический барьер во все отделы мозга крыс и достигает максимальной концентрации через 1 час после внутривенного введения, через 6 часов концентрация препарата падает в 2 раза, а через сутки еще уменьшается на порядок. KB-R7943 в тканях гипоталамуса, гиппокампа и сенсомоторной коры. Установлено, что в период от 1 часа до 6 часов после введения препарата максимальная концентрация KB-R7943 наблюдается в гиппокампе 3,8 мкг/г (в пересчете на метилсульфонат), что в 2 раза выше, чем в гипоталамусе и сенсомоторной коре.

Анализ образцов плазмы крови показал аналогичную динамику изменения концентрации препарата во времени: максимальное значение наблюдается через 1 час, через 6 часов – падение в 2 раза, через 24 часа – еще в 5 раз. Накапливание препарата в сердечной мышце происходило медленнее, максимальное значение концентрации соответствует 6 часам, но и падение концентрации через 24 часа не значительно.

Вещество сохраняется в тканях в течение 24 часов после введения, однако большая часть препарата интенсивно выводится из организма. В моче обнаружены два соединения, являющиеся метаболитами KB-R7943. Предложена возможная структура метаболитов. Установлена зависимость содержания метаболитов в моче от времени после введения препарата. Максимальная концентрация метаболита А наблюдается через 1 час после введения. Метаболиты присутствуют в моче крыс в течение 24 часов после введения препарата.

Заключение: Исследование содержания KB-R7943 в тканях головного мозга показало, что вещество достигает целевых отделов головного мозга и депонируется в них в течение 24 часов после внутривенного введения. Установленное распределение препарата подтверждает принципиальную возможность воздействия KB-R7943 на исследуемые молекулярные мишени. Результаты данной работы будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке противоболевой терапии на основе KB-R7943.

Исследование проведено по программе гранта РФФИ 20-515-18008 Болг_а.

Литература:

1. Colloca L., Ludman T., Bouhassira D., Baron R., Dickenson A.H., Yarnitsky D., Freeman R., Truini A., Attal N., Finnerup N.B., Eccleston C., Kalso E., Bennett D.L., Dworkin R.H., Raja S.N. Neuropathic pain // Nat Rev Dis Primers. – 2017 – V. 3:17002
2. Inquimbert P., Moll M., Latremoliere A., Tong C.K., Whang J., Sheehan G.F., Smith B.M., Korb E., Athié M.C.P., Babaniyi O., Ghasemlou N., Yanagawa Y., Allis C.D., Hof P.R., Scholz J. NMDA Receptor Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent Pain after Peripheral Nerve Injury // Cell Rep.- 2018 – V. 23, N.9 – PP. 2678-2689. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.107.
3. Sibarov D.A., Abushik P.A., Poguzhelska ya E.E. , Bolshakov K.V., Antonov S.M. Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB - R7943 or lithium reveals its role in Cadependent N-methyl-D-aspartate receptor inactivation // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2015. – V. 355. – P. 484-495.

4. Huang Y., Wen L.L., Xie J.D., Ouyang H.D., Chen D.T., Zeng W.A. Antinociceptive effectiveness of the inhibition of NCX reverse-mode action in rodent neuropathic pain model // *Mol Pain*. – 2019 – 15:1744806919864511.
5. Sibarov D.A., Poguzhelskaya E.E., Antonov S.M. Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: a role of membrane cholesterol // *BMC Neurosci*. – 2018. – V. 19. – N.1. – P.73. doi: 10.1186/s12868-018-0475-3.
6. Petrenko A.B., Yamakura T., Baba H., Shimoji K. The role of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review // *Anesth Analg*. – 2003. – V. 97. – N.4. – PP. 1108-1116. doi: 10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55.
7. Stepanenko Y.D., Boikov S.I., Sibarov D.A., Abushik P.A., Vanchakova N.P., Belinskaia D., Shestakova N.N., Antonov S.M. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block // *Sci Rep*. – 2019. – V. 9. -N. 1. – P. 19454. doi: 10.1038/s41598-019-56072-z.

THE STUDY OF KB-R7943 DISTRIBUTION IN ORGANS AND DEPARTMENTS OF THE BRAIN IN RATS AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION USING LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH A MASS SPECTROMETRIC DETECTOR

***Dashieva V. Zh.*^{1,2}, *Borodin M. A.*³, *M. V. Belyakov*⁴, *Sukhov I.B.*^{1, 2, 3},
*Chistyakova O.V.*¹, *Shestakova N.N.*¹**

*1 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy
of Sciences, St. Petersburg, Russia*

2 Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

3 Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

*4 Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,
Leningrad region, Russia*

E-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Abstract: KB-R7949 is known as a selective sodium-calcium exchanger (NCX) blocker. It has been shown that NCX indirectly affects the ionic conductivity of

ionotropic N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) involved in the pathogenesis of neuropathic pain syndrome. It has been hypothesized that KB-R7949 may have analgesic activity for the relief of neuropathic pain.

To test this hypothesis, at the first stage, a study was carried out to determine KB-R7949 distribution in tissue samples of rats after intravenous administration of the drug by liquid chromatography with mass spectrometric detection after extraction of the analyzed drug (analyte) from the matrix, purification and concentration of the extract.

Key words: KB-R7943; neuropathic pain; HPLC-MS / MS method; rat.

УДК 612.821

**ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА KB-R7943 В ОРГАНАХ И
ОТДЕЛАХ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ПРИ
ПОМОЩИ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-
СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ**

**Дашиева В.Ж.^{1,2}, Бородин М.А.³, М.В. Беляков⁴, Сухов И.Б.^{1, 2, 3}, Чистякова
О.В.¹, Шестакова Н.Н.¹**

*1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии
наук, Санкт-Петербург, Россия*

*2 Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
СПБПУ, Санкт-Петербург, Россия*

3 НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

*4 Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-
исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»
Федерального медико-биологического агентства, ФГУП «НИИ ГПЭЧ»,
Ленинградская область, Россия*

E-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Аннотация: KB-R7943 известен как селективный блокатор натрий-кальциевого обменника (NCX). Было показано, что NCX косвенно влияет на ионную проводимость ионотропных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), участвующих в патогенезе нейропатического болевого синдрома. Было высказано предположение, что KB-R7943 может обладать анальгетической активностью для облегчения нейропатической боли.

Для проверки данной гипотезы на первом этапе было проведено исследование по определению распределения KB-R7943 в образцах тканей крыс после внутривенного введения препарата методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием после извлечения анализируемого препарата (аналита) из матрицы, очистки и концентрирования экстракта.

Ключевые слова: KB-R7943; нейропатическая боль; метод HPLC-MS/MS; крыса.

Основной текст:

Поиск патофизиологических и нейрохимических механизмов нейропатической боли и способов её купирования является актуальной задачей. Нейропатическая боль – это боль, которая возникает или может быть спровоцирована поражением или дисфункцией нервной системы. Патогенез хронической нейропатической боли обусловлен гиперактивацией глутаматергической системы и зависит от активации рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR) [1,2]. Ключевую роль в управлении ионной проводимостью NMDAR играет натрий-кальциевый обменник (NCX) [3]. Предполагается, что опосредованное воздействие на NMDA-рецепторы селективных блокаторов NCX могут быть эффективны для купирования синдрома хронической нейропатической боли [4]. Клинические испытания показывают, что препараты, опосредованно воздействующие на NMDAR, более

безопасны из-за меньших побочных эффектов и меньших дозировок [7]. Препарат KB-R7943 известен как селективный блокатор натрий-кальциевого обменника (NCX) [3]. Показано [5], что NCX опосредованно влияет на ионную проводимость ионотропных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR), участвующих в патогенезе нейропатического болевого синдрома [6]. Сформулирована гипотеза, что KB-R7943 может обладать анальгетической активностью для купирования нейропатической боли. Фармакокинетические характеристики KB-R7943, необходимые для оценки его противоболевого действия, изучены недостаточно. Представленная работа направлена на изучение распределения KB-R7943 в целевых отделах мозга, характеризующихся наибольшей экспрессией NCX, а также в плазме крови, сердце и моче в зависимости от времени после внутривенного введения препарата.

Методика: Основная группа исследования – здоровые крысы-самцы линии Wistar, возраст 4,5 месяцев, которым однократно внутривенно был введён препарат KB-R7943 в дозировке 20 мг/кг ($n=10$, масса 369 ± 15 г). Группа контроля – здоровые крысы ($n=3$, масса 345 ± 8 г). Через 1, 6 и 24 часа после введения препарата проводился забор крови, мочи и взятие образцов тканей гипоталамуса, гиппокампа и сенсомоторной коры. Выделение образцов тканей отделов головного мозга проводили после проведения перфузии верхней части туловища крысы раствором PBS, а образцы тканей гомогенизировали. Содержание KB-R7943 в полученных пробах плазмы, мочи и гомогенатов тканей отделов головного мозга проводили методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Результаты: Анализ содержания KB-R7943 установил, что препарат проникает через гематоэнцефалический барьер во все исследуемые отделы мозга крыс и достигает максимальной концентрации через 1 час после внутривенного введения, через 6 часов концентрация препарата падает в 2 раза, а через сутки еще уменьшается на порядок. Установлено, что в период от 1 часа

до 6 часов после введения препарата максимальная концентрация KB-R7943 наблюдается в гиппокампе 3,8 мкг/г (в пересчете на метилсульфонат), что в 2 раза выше, чем в гипоталамусе и сенсомоторной коре.

Анализ образцов плазмы крови показал аналогичную динамику изменения концентрации препарата во времени: максимальное значение наблюдается через 1 час, через 6 часов – падение в 2 раза, через 24 часа – еще в 5 раз. Накапливание препарата в сердечной мышце происходило медленнее, максимальное значение концентрации соответствует 6 часам, но и падение концентрации через 24 часа не значительно.

Вещество сохраняется в тканях в течение 24 часов после введения, однако большая часть препарата интенсивно выводится из организма. В моче обнаружены два соединения, являющиеся метаболитами KB-R7943. Предложена возможная структура метаболитов. Установлена зависимость содержания метаболитов в моче от времени после введения препарата. Максимальная концентрация метаболита А наблюдается через 1 час после введения. Метаболиты присутствуют в моче крыс в течение 24 часов после введения препарата.

Заключение: Исследование содержания KB-R7943 в тканях головного мозга показало, что вещество достигает целевых отделов головного мозга и депонируется в них в течение 24 часов после внутривенного введения. Установленное распределение препарата подтверждает принципиальную возможность воздействия KB-R7943 на исследуемые молекулярные мишени. Результаты данной работы будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке противоболевой терапии на основе KB-R7943.

Исследование проведено по программе гранта РФФИ 20-515-18008 Болг_а.

Литература:

1. Colloca L., Ludman T., Bouhassira D., Baron R., Dickenson A.H., Yarnitsky D., Freeman R., Truini A., Attal N., Finnerup N.B., Eccleston C., Kalso E., Bennett D.L., Dworkin R.H., Raja S.N. Neuropathic pain // Nat Rev Dis Primers. – 2017 – V. 3:17002
2. Inquimbert P., Moll M., Latremoliere A., Tong C.K., Whang J., Sheehan G.F., Smith B.M., Korb E., Athié M.C.P., Babaniyi O., Ghasemlou N., Yanagawa Y., Allis C.D., Hof P.R., Scholz J. NMDA Receptor Activation Underlies the Loss of Spinal Dorsal Horn Neurons and the Transition to Persistent Pain after Peripheral Nerve Injury // Cell Rep.- 2018 – V. 23, N.9 – PP. 2678-2689. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.107.
3. Sibarov D.A., Abushik P.A., Poguzhelska ya E.E. , Bolshak ov K.V., Antonov S.M. Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB - R7943 or lithium reveals its role in Cadependent N-methyl-D-aspartate receptor inactivation // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2015. – V. 355. – P. 484-495.
4. Huang Y., Wen L.L., Xie J.D., Ouyang H.D., Chen D.T., Zeng W.A. Antinociceptive effectiveness of the inhibition of NCX reverse-mode action in rodent neuropathic pain model // Mol Pain. – 2019 – 15:1744806919864511.
5. Sibarov D.A., Poguzhelskaya E.E., Antonov S.M. Downregulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization by sodium-calcium exchangers: a role of membrane cholesterol // BMC Neurosci. – 2018. – V. 19. – N.1. – P.73. doi: 10.1186/s12868-018-0475-3.
6. Petrenko A.B., Yamakura T., Baba H., Shimoji K. The role of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review // Anesth Analg. – 2003. – V. 97. – N.4. – PP. 1108-1116. doi: 10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55.
7. Stepanenko Y.D., Boikov S.I., Sibarov D.A., Abushik P.A., Vanchakova N.P., Belinskaia D., Shestakova N.N., Antonov S.M. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block // Sci Rep. – 2019. – V. 9. -N. 1. – P. 19454. doi: 10.1038/s41598-019-56072-z.

THE STUDY OF KB-R7943 DISTRIBUTION IN ORGANS AND DEPARTMENTS OF THE BRAIN IN RATS AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION USING LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH A MASS SPECTROMETRIC DETECTOR

Dashieva V. Zh. ^{1,2}, *Borodin M. A.* ³, *M. V. Belyakov* ⁴, *Sukhov I.B.* ^{1, 2, 3},
Chistyakova O.V. ¹, *Shestakova N.N.* ¹

1 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

2 Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

3 Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

4 Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningrad region, Russia

E-mail: sukhov.ivan@gmail.com

Abstract: KB-R7943 is known as a selective sodium-calcium exchanger (NCX) blocker. It has been shown that NCX indirectly affects the ionic conductivity of ionotropic N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) involved in the pathogenesis of neuropathic pain syndrome. It has been hypothesized that KB-R7943 may have analgesic activity for the relief of neuropathic pain.

To test this hypothesis, at the first stage, a study was carried out to determine KB-R7943 distribution in tissue samples of rats after intravenous administration of the drug by liquid chromatography with mass spectrometric detection after extraction of the analyzed drug (analyte) from the matrix, purification and concentration of the extract.

Key words: KB-R7943; neuropathic pain; HPLC-MS / MS method; rat.

УДК 159.929

СЕРЫЕ ВОРОНЫ СПРАВИЛИСЬ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВАРИАНТОМ
ЭЗОПОВА ТЕСТА ТОЛЬКО ПОСЛЕ ОБУЧЕНИЯ С НЕСКОЛЬКИМИ
ТИПАМИ ОБЪЕКТОВ

**Диффинэ Е.А., Кубенко К.Н., Булгакова Л.Р., Чеплакова М.А.,
Смирнова А.А.**

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: diffinenok@gmail.com

Аннотация:

Эзопов тест оценивает способность добыть приманку, плавающую на поверхности воды в узком цилиндре вне пределов досягаемости, путем помещения в него тонущих объектов. Мы исследовали способность серых ворон с модифицированным вариантом этого теста (с пятью типами цилиндров и двумя типами объектов).

Ключевые слова: Эзопов тест, понимание причинно–следственных отношений, орудийная деятельность, серые вороны

При помощи Эзопова теста оценивают способность субъекта добывать приманку плавающую на поверхности воды в узком цилиндре вне пределов досягаемости, путем поднятия уровня воды за счет помещения в нее тонущих объектов. Решение этой задачи с первых проб может свидетельствовать о понимании структуры задачи и/или наличии представления о свойстве тонущих объектов поднимать уровень воды. В противном случае в решение задачи вносит вклад обучение в ходе тестирования. При этом, субъект может обучиться либо последовательности необходимых действий, либо начать понимать структуру задачи. Наибольшее число подобных исследований проведено с врановыми птицами. Лишь в одной работе на новокаледонских воронах (Taylor et al., 2011) оценивали их способность справиться с этим тестом спонтанно (без какого либо предварительного обучения). Четыре вороны в ходе 5 проб так и не смогли найти способ решения простейшего варианта этой задачи – им предъявляли один цилиндр с водой и приманкой на ее поверхности и несколько камней. В остальных исследованиях птиц вначале обучали помещать камни в цилиндр для получения приманки. В некоторых работах их обучали помещать камни в пустой цилиндр с откидывающимся дном (Cheke et al., 2011; Logan et al., 2016); в других – в цилиндр с водой (Bird, Emery, 2009,

Taylor et al., 2011). После этого проводили тесты, в которых птицам предлагали выбрать между двумя цилиндрами: один из которых, был заполнен водой на $\frac{2}{3}$ (из него можно было добыть приманку, помещая тонущие объекты в воду), а другой был либо пустым, либо заполненным песком или водой на $\frac{1}{3}$. В другом варианте теста использовали один цилиндр с водой, и предлагали птицам выбрать между подходящими (например, тонущими) и не подходящими (плавающими) для решения задачи объектами. Метаанализ полученных на врановых птицах данных указывает на то, что эти птицы в большинстве случаев решали эти задачи не с первой пробы, а благодаря обучению в ходе повторных предъявлений теста (Hennefield et al., 2018, Ghirlanda S., Lind J, 2017). Результаты полученные на разных видах врановых птиц заметно различаются. Например, сойки (Cheke et al., 2011; Logan et al., 2016) обучаются решению подобных задач гораздо менее успешно чем грачи (Bird, Emery, 2009) и новокаледонские вороны (Taylor et al., 2011; Jelbert et al., 2014; Logan et al., 2014). В целом остается неясным, обучались ли птицы чему-то большему, чем повторению действий, приближающих приманку.

Методика и результаты. Целью нашей работы было выяснить, могут ли серые вороны справиться с Эзоповым тестом спонтанно (без обучения). В случае отрицательного ответа на первый вопрос, мы собирались выяснить, может ли обучение привести к возможности решения этой задачи в новой ситуации, что свидетельствовало бы о понимании ее структуры и/или формировании представления о свойстве тонущих объектов поднимать уровень воды.

Исследование проводили на 8-ми птицах: на четырех полугодовалых (Родя, Джо, Женя, Дятел), двух трехлетних (Клара, Малышка) и двух старше 10 лет (Глаз, Шнобель). Всем птицам вначале дали возможность ознакомиться со свойствами компонентов задачи сначала в жилом вольере (месяц), а затем в экспериментальной клетке (5 серий по 15 мин каждая). Для этого к стенке вольера или экспериментальной клетки прикрепляли прозрачные пластиковые цилиндры, часть из которых была заполнена водой или песком либо доверху,

либо на $\frac{1}{3}$, а некоторые были пустыми (приманку в цилиндры не помещали). Перед цилиндрами размещали поддон с камнями и кусочками пробки. Несмотря на то, что вороны часто помещают различные пищевые и непищевые объекты в установленные в вольере пластиковые тазы с водой, или в прямоугольные плоские поилки в экспериментальной клетке, в цилиндрах, установленных в вольере, за весь месяц были обнаружены только 4 кусочка пробки, а в экспериментальной клетке вороны не помещали в них никакие объекты.

Далее провели модифицированный нами вариант Эзопова теста, в котором птицам нужно было выбирать между двумя типами объектов (камнями и кусочками пробки) и пятью типами цилиндров (два были заполнены водой и песком до уровня, на полсантиметра ниже доступного воронам, т.е. примерно на $\frac{2}{3}$; два были заполнены водой и песком на $\frac{1}{3}$ и один был пустым). В каждый из цилиндров помещали личинку мучного хрущака, привязанную к кусочку пробки. Поддон с камнями и кусочками пробки размещали около противоположной стенки клетки. Ворона могла достать приманку, поместив 3–5 камней в цилиндр, заполненный водой на $\frac{2}{3}$. Использование пяти цилиндров и проведение лишь трех тестовых сессий (по 10 мин каждая) уменьшало вероятность первого случайного правильного решения и влияние обучения на результат теста. Ни одна из восьми ворон не справилась с Эзоповым тестом (за 3 сессии они не поместила в цилиндры никакие объекты).

С четырьмя птицами (Джо, Родя, Женя, Дятел) затем провели простейший вариант Эзопова теста с одним цилиндрами и тремя камнями, расположенными у его основания (3 сессии по 10 минут каждая). Ни одна из четырех ворон с ним не справилась (они не помещали камни в цилиндр).

Далее всех ворон обучали помещать тонущие объекты в цилиндр, заполненный водой на $\frac{2}{3}$ (на ее поверхности плавала приманка). Четырех ворон (Родя, Джо, Женя, Дятел) обучали помещать в цилиндр камень, а четырех других (Шнобель, Глаз, Малышка, Клара) – гайку. Объект помещали на прозрачную платформу,

закрепленную на краю цилиндра. После того как ворона 5 раз получала приманку, сбрасывая объекты в воду, платформу перемещали ниже. Шесть ворон из восьми удалось обучить поднимать объекты с пола и помещать их в цилиндр за 17 (Родя), 24 (Дятел) и 51 (Джо), 5 (Клара), 15 (Глаз) и 23 (Малышка) пробы (пробу считали выполненной, когда ворона добывала приманку с поверхности воды).

Для того, чтобы получение приманки было ассоциировано со всеми типами цилиндров, а не только с заполненным водой на $\frac{2}{3}$, птицам дали возможность получить приманку из остальных 4-х типов цилиндров (их предъявляли одновременно). Для того, чтобы приманка стала доступной, в нижней части трех из них (заполненных водой и песком на $\frac{1}{3}$ и пустом) проделали отверстия, а в четвертый цилиндр песок насыпали почти доверху. Провели столько проб, чтобы каждая из ворон получила приманку из каждого из этих четырех типов цилиндров не меньшее число раз, чем ранее из цилиндра, заполненного водой на $\frac{2}{3}$. Анализ первых пяти проб этой серии показал, что две птицы (Родя и Дятел) помещали в эти цилиндры камни, хотя делать это для получения приманки не требовалось.

Далее повторно провели Эзопов тест с пятью типами цилиндров и двумя типами объектов (камнями и кусочками пробки, размещенными около противоположной стенки клетки). Ни одна из шести ворон за три десятиминутные тестовые сессии не добыла приманку. Только три птицы помещали в цилиндры какие-либо объекты. Родя бросил 3 камня в цилиндр, заполненный водой на $\frac{2}{3}$, а следующий камень он положил в цилиндр, заполненный песком на $\frac{2}{3}$. Дятел поместил 2 камня и 1 кусочек пробки в цилиндр, заполненный песком на $\frac{2}{3}$, и 3 камня – в цилиндр, заполненный водой на $\frac{2}{3}$. Глаз поместил кусочек пробки и камень в цилиндр, заполненный песком на $\frac{1}{3}$. Надо отметить, что для трех птиц (Малышка, Глаз, Клара) камни были новыми объектами – их обучали помещать в цилиндр гайки. Отрицательный результат второго теста свидетельствует о том, что обучения с одним

цилиндром и одним типом объектов оказалось недостаточным для того, чтобы вороны могли решить эту задачу в новой ситуации – с пятью цилиндрами, новым типом тонущего объекта и объектами, размещенными не рядом с цилиндрами.

Следующие серии проводили с тремя воронами (Малышка, Глаз, Клара). Выясняли, смогут ли птицы справиться с тестом если его упростить: расположить объекты около цилиндров или заменить новые объекты на знакомые. Длительность каждой сессии увеличили до 20 минут. Вначале камни и кусочки пробки поместили около цилиндров. Ни одна из ворон с задачей не справилась (птицы не помещали в цилиндры никакие объекты). После этого заменили камни на гайки (объекты, которые были использованы при обучении), вновь разместив их около противоположной стенки клетки. Одна из птиц (Клара) справилась с тестом: она добывала приманку из цилиндра, заполненного водой на $\frac{2}{3}$ в каждой из трех 20–минутных сессий (она ни разу не помещала в цилиндры кусочки пробки). Для двух других ворон задачу дополнительно упростили, поместив гайки и кусочки пробки около цилиндров. Ни одна из них и в этом случае не достала приманку. Глаз в двух пробах из трех помещал гайки в цилиндр, заполненный песком на $\frac{1}{3}$. Малышка помещала гайки во все типы цилиндров, кроме пустого, но приманку достать ей не удалось. Таким образом, лишь одна из трех ворон справилась с тестом с пятью цилиндрами, но только в том случае, когда ей предоставили знакомые объекты.

Далее мы выясняли, могут ли вороны справиться с Эзоповым тестом в новой ситуации (с пятью цилиндрами и новым типом объектов) после обучения с двумя новыми объектами. Трех ворон обучили добывать приманку из единственного цилиндра, заполненного водой на $\frac{2}{3}$, вначале при помощи черных болтов, а затем – серебристых цилиндров (объекты размещали около основания цилиндра). Все три птицы с первой пробы начали помещать новые объекты в цилиндр и добывать приманку. Для того, чтобы получение приманки

было ассоциировано со всеми типами цилиндров, а не только с использованным в ходе обучения, птицам вновь дали возможность получить приманку из остальных 4-х типов цилиндров. После этого вновь провели Эзопов тест с пятью цилиндрами и новым типом объектов (золотистыми цилиндрами), которые разместили около цилиндров. С тестом справилась лишь одна из трех ворон - Клара. Она добывала приманку во всех трех тестовых сессиях, и не помещала объекты в другие цилиндры.

Заключение.

В целом можно заключить, что Эзопов тест оказался для ворон сложным. Ни одна из 8-ми ворон не справилась с его модифицированным вариантом (с пятью типами цилиндров и двумя типами объектов) спонтанно. Ни одна из 4-х ворон не справилась с простейшим вариантом этого теста - с одним цилиндром и одним типом объектов. Обучения с одним типом объектов оказалось недостаточным для того, чтобы вороны справились с этой задачей в новой ситуации - с пятью цилиндрами, новым типом тонущего объекта и объектами, размещенными не рядом с цилиндрами. После обучения с одним типом объектов лишь одна из трех ворон решила Эзопов тест с пятью цилиндрами и двумя типами объектов, но лишь тогда, когда ей предоставили знакомые тонущие объекты. После обучения с двумя новыми типами объектов лишь эта же ворона справилась с Эзоповым тестом с пятью цилиндрами и новым типом тонущего объекта.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ (проект №20-015-00287А), в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121032500080-8) и при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

Литература

1. Bird C.D., Emery N.J. Rooks use stones to raise the water level to reach a floating worm. // Curr. Biol – 2009 – Vol. 19 – PP. 1410–1414. doi:10.1016/j.cub.2009.07.033.
2. Ghirlanda S., Lind J. ‘Aesop’s fable’ experiments demonstrate trial-and-error learning in birds, but no causal understanding // Anim. Behav – 2017 – Vol. 123 – PP. 239–247. doi:10.1016/j.anbehav.2016.10.029.
3. Hennefield L., Hwang H.G., Weston S.J., Povinelli D.J. Meta-analytic techniques reveal that corvid causal reasoning in the Aesop’s Fable paradigm is driven by trial-and-error learning. // Anim. Cogn. – 2018 – Vol.21 – PP. 735–748. doi:10.1007/s10071-018-1206-y.
4. Taylor A., Elliffe D., Hunt G., Emery N., Clayton N., Gray R. New Caledonian crows learn the functional properties of novel tool types // PLoS One – 2011 – Vol. 6 – №12 – PP. P.e26887. doi:10.1371/journal.pone.0026887.
5. Cheke L., Bird C., Clayton N. Tool-use and instrumental learning in the Eurasian jay (*Garrulus glandarius*) // Anim. Cogn. – 2011 –Vol. 14 – №3 – PP. 441–455. doi:10.1007/s10071-011-0379-4.
6. Logan C., Harvey B., Schlinger B., Rensel M. Western scrub-jays do not appear to attend to functionality in Aesop's Fable experiments // PeerJ – 2016 – Vol. 4 – PP. e1707. doi:10.7717/peerj.1707.
7. Jelbert S., Taylor A., Cheke L., Clayton N., Gray R. Using the Aesop’s Fable Paradigm to Investigate Causal Understanding of Water Displacement by New Caledonian Crows // PLoS One – 2014 – Vol. 9 – № 3 – PP. e92895. doi:10.1371/journal.pone.0092895.
8. Logan C., Jelbert S., Breen A., Gray R., Taylor A. Modifications to the Aesop’s Fable Paradigm Change New Caledonian Crow Performances // PLoS One – 2014 – Vol. 9 – № 7 – PP. e103049. doi:10.1371/journal.pone.0103049.

HOODED CROWS COPEd WITH THE MODIFIED VERSION OF THE AESOP TEST ONLY AFTER TRAINING WITH SEVERAL TYPES OF OBJECTS

Diffine E.A., Kubenko K.N., Bulgakova L.R., Cheplakova M.A., Smirnova A.A.

Departure of Biology, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, Russia

Abstract: The Aesop’s test assesses the ability to catch bait floating on the surface of the water in a narrow cylinder out of reach by placing drowning objects in

it. We investigated the ability of hooded crows with a modified version of this test (with five types of cylinders and two types of objects).

Key words: Aesop's fable paradigm, understanding cause-and-effect relationships, tool-use, hooded crows

УДК 57.024

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМНОЙ И КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА МЫШЕЙ В СИТУАЦИЯХ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ НОВИЗНЫ

Докукин Н.В.¹, Ивашкина О.И.^{1,2}, Торопова К.А.^{1,2}, Рогожникова О.С.¹,
Анохин К.В.^{1,3}

¹ *Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия.*

² *НБИКС-центр НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.*

³ *ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия.*

E-mail: nikita.dokukin@student.msu.ru

Аннотация: Работа посвящена проверке предположения о том, что процессы нейрональной пластичности и формирования памяти зависят от новизны информации о внешней среде, в то время как электрическая и кальциевая активность мозга преимущественно отражают информацию о среде как таковой вне зависимости от ее новизны.

Ключевые слова: детекция новизны; кодирование информации мозгом; немедленный ранний ген *c-fos*; оптоволоконная фотометрия

На сегодняшний день не существует общепринятой теории о том, какие механизмы обеспечивают детекцию новой информации в мозге; неизвестно, как связаны между собой изменяющиеся при предъявлении новых стимулов электрическая, биохимическая и геномная активность нейронов, какие области мозга задействованы в этом процессе в большей степени. В данной работе мы исследовали геномную и кальциевую активность мозга мышей в ситуациях разной степени новизны и разном уровне насыщения обстановки стимулами. Для этого была использована задача свободного обследования мышами открытого поля (ОП), пустого или обогащенного, отличие которых состояло в наличии зрительных ориентиров на стенах и объектов на полу.

Методика: В эксперименте по оценке геномной активности мозга приняло участие 5 групп мышей ($n=10\div 11$ в каждой); две обследовали ОП в течение четырех сессий (каждая группа – свой вариант, пустое или обогащенное), еще две группы помещали в ОП лишь один раз; мыши контрольной группы проводили все время в домашней клетке, то есть в обстановке, лишенной какой-либо новизны.

Оценку геномной активности мозга проводили с помощью иммуногистохимического окрашивания тонких срезов мозга для выявления экспрессии немедленного раннего гена *c-fos*. Спустя 90 минут (пик экспрессии *c-fos*) после последней или единственной сессии обследования ОП животных умерщвляли, декапитировали, проводили окрашивание срезов, а затем съемку под микроскопом. Подсчет *c-Fos*⁺ клеток проводили на основании диапазона размеров ядер и интенсивности их окраски. Плотность клеток рассчитывали как отношение количества положительных по *c-Fos* ядер к площади области мозга на срезе

(кол-во клеток/мм²). Анализировали плотность клеток в пре- и инфраламбической областях префронтальной коры, областях 1 и 2

цингулярной коры, гранулярной и дисгранулярной областях ретроспленальной коры (РСК), полях CA1, CA3 и зубчатой фасции дорсального гиппокампа, а также теменной ассоциативной коре и бочонковых полях первичной соматосенсорной коры.

Для регистрации кальциевых ответов мозга был использован метод оптоволоконной фотометрии; в эксперименте участвовало 2 группы животных ($n=7$ в каждой), которых помещали четырежды в пустое или обогащенное поле соответственно. У одной и той же группы оценивали активность как при помещении в новую обстановку в первый раз, так и при помещении во все последующие разы, то есть по мере снижения уровня новизны. С помощью аденоассоциированного вирусного вектора проводили трансдукцию генетически-кодируемого кальциевого сенсора NCaMP7 в нейроны РСК и CA1. После инъекции проводили вживление оптических волокон с внешним диаметром 125 мкм, длина которых составила 0.9 мм для РСК и 1.65 мм для CA1.

Значения сигнала из каждой области регистрировали с временным интервалом 0,2 с в течение 10 минут проведения каждой сессии. Данные о флуоресценции сенсорного белка обрабатывали при помощи математических пакетов, написанных на языке программирования Python. Данные от ретроспленальной коры и поля CA1 обрабатывали отдельно. Из сигнала вычитали базовый уровень методом расчета скользящего среднего, относительно которого выделяли повышенную активность регистрируемых зон. Наблюдаемый рост сигнала считался значимым кальциевым событием в случае не менее чем 10% превышения над фоновым уровнем. Массив данных, содержащий информацию о величине относительного изменения сигнала (df/f) и соответствующего ему изменения поведения животного, анализировали на предмет возможной корреляции событий. Во всех сессиях эксперимента для каждого животного и отдельной структуры анализировали активность по величине средней амплитуды пика и числу регистрируемых пиков в минуту.

Результаты: Количество информации в среде не влияло значимым образом на экспрессию немедленного раннего гена *c-fos*: ни в одной из исследованных областей мозга уровень экспрессии не зависел от того, обследовали ли животные пустое или обогащенное поле. При этом уровень экспрессии *c-fos* был чувствителен к степени новизны ОП: он снижался по мере снижения новизны обстановки, независимо от ее насыщения стимулами. Такой паттерн изменения геномной активности наблюдался в большинстве исследованных регионах мозга (ассоциативных и соматосенсорной областях неокортекса). Интересно, что уровень экспрессии *c-fos* в полях СА1 и СА3 дорсального гиппокампа был низким и не зависел ни от новизны, ни от количества информации в обследуемом ОП.

Наиболее выраженные изменения в экспрессии по мере снижения новизны обстановки были обнаружены в РСК, тогда как в поле СА1 гиппокампа степень новизны слабо влияла на экспрессию *c-fos*.

В связи с этим мы выбрали ретросплениальную кору и поле СА1 гиппокампа как области мозга, по-разному реагирующие на изменение степени новизны контекста, в качестве регионов интереса для регистрации суммарной кальциевой активности.

Кальциевая активность (количество и амплитуда пиков кальциевого ответа) РСК и СА1 не изменялась при повторных обследованиях одной и той же обстановки, то есть при уменьшении степени ее новизны. При этом и в РСК, и в СА1 кальциевая активность усиливалась при обследовании безопасной для животного пристеночной зоны по сравнению с центром ОП. Также мы не обнаружили различий в параметрах активности данных регионов при обследовании пустого и обогащенного ОП: количество информации не влияло на активность ретросплениальной коры и поля СА1 гиппокампа.

Заключение: Данные экспрессии *c-fos* могут указывать на участие процессов пластичности, опосредованных экспрессией немедленных ранних генов, в кодировании новизны когнитивной информации, но не ее количества. Анализ результатов оптоволоконной фотометрии позволяет предполагать, что кальциевая активность ретроспленциальной коры и поля CA1 гиппокампа не участвует в кодировании новизны информации – не было обнаружено изменений в зависимости от того, является ли окружающая обстановка новой или знакомой.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-801) и междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект»

GENOMIC AND CALCIUM ACTIVITY IN THE MOUSE BRAIN IN SITUATIONS WITH DIFFERENT NOVELTY LEVELS

N.V. Dokukin¹, O.I. Ivashkina^{1,2}, K.A. Toropova^{1,2}, O.S. Rogozhnikova¹, K.V. Anokhin^{1,3}

¹ *Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

² *NBICS-center, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

³ *Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia*

E-mail: nikita.dokukin@student.msu.ru

Abstract: The work is to test the assumption that neuronal plasticity and memory formation depend on the novelty of information about the environment, while the electrical activity of the brain mainly reflects information about the environment per se regardless of its novelty.

Key words: novelty detection; information encoding in brain; *c-fos* immediate early gene; fiber-optic photometry

The research has been supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant No. 075-15-2020-801) and the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University "Brain, Cognitive Systems, Artificial Intelligence"

УДК 57.086+576.35

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ 5-ЭТИНИЛ-2'-ДЕЗОКСИУРИДИНА НА
ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ГИППОКАМПА
ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ

Ермолаева Е.В.^{1,2}, Иванова А.А.^{2,3,4}, Лазуткин А.А.^{2,4}

¹ *ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), Москва, Россия*

² *ФГБУН Институт Высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

³ *Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский институт»,
Москва, Россия.*

⁴ *Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва,
Россия*

E-mail: lazutkin.a.a@gmail.com

Аннотация: EdU – недавно разработанный синтетический аналог тимидина, для широкого применения которого необходим подбор доз, не оказывающих антипролиферативного влияния на стволовые клетки мозга. Мы показали, что EdU не влияет на деление клеток в дозе 40 мг/кг, но обладает выраженным антипролиферативным эффектом в дозе 123 мг/кг.

Ключевые слова: пролиферация; нейрогенез; 5-бром-2'-дезоксинуридин; 5-этинил-2'-дезоксинуридин

Введение: Синтетические аналоги нуклеотидов широко применяются в клинической медицине и научных исследованиях для изучения деления клеток, их миграции и дифференцировки. Более 30 лет и по сей день в различных исследовательских работах используют галогенсодержащий аналог тимидина – 5-бром-2'-дезоксинуридин (BrdU), который встраивается в ДНК во время S-фазы клеточного цикла, а затем детектируется при помощи иммуногистохимической реакции [1, 2, 3]. Необходимость маркировать отдельные стадии пролиферации клеток двумя и более метками, а также сложности в стандартизации процедуры выявления меченых BrdU клеток, привели к необходимости поиска новых синтетических аналогов тимидина для исследования пролиферативной активности в мозге. В начале 2000-х был создан новый тимидиновый аналог – 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU), который вместо атома брома содержит терминальную алкильную группу на 5'-позиции пиримидина, способную ковалентно связываться с флуоресцентно меченым азидом в присутствии ионов одновалентной меди с помощью реакции циклоприсоединения, или “клик-реакции”. [4, 5, 6, 7].

Влияние BrdU на деление, выживаемость и дифференцировку клеток, а также его возможные токсические эффекты достаточно хорошо изучены как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Влияние EdU на эти процессы изучено слабее, а существующие исследования проведены только на культурах клеток. Как для BrdU, так и для EdU были показаны антипролиферативные эффекты на

клеточных линиях [8, 9, 10, 11] и отсутствие влияния на пролиферацию *in vivo* [9, 12]. Данные о выживаемости и индуцировании клеточной гибели для обоих тимидиновых аналогов на сегодняшний момент остаются противоречивыми [6, 8, 9, 13, 14]. В этой связи, целью нашей работы было исследование эффектов разных доз EdU на пролиферативную активность клеток гранулярного слоя зубчатой извилины гиппокампа.

Методика: Эксперимент был проведен на 14 самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 3 месяцев на начало эксперимента. Животные были разделены на 3 группы, которым внутрибрюшинно вводили физ.раствор ($n=4$), либо EdU в дозе 40 мг/кг ($n=5$) или 123 мг/кг ($n=5$). Через 48 ч после первой инъекции мышам внутрибрюшинно вводили BrdU (150 мг/кг) для оценки эффектов EdU на последующие клеточные деления. Перфузию и извлечение мозгов проводили через 2 ч после последней инъекции. Далее на вибротоме из одного полушария изготавливали серийные саггитальные срезы толщиной 50 мкм и проводили иммуногистохимическое окрашивание BrdU и выявление EdU методом клик-гистохимии. Съемку срезов проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Fluoview FV10i (Olympus, объектив 60x). Количество делящихся клеток анализировали в гранулярном слое зубчатой фации гиппокампа на 7-8 срезах с мозга в программе Imaris 7.6.4 (Bitplane). Статистический анализ был проведен в программе GraphPad Prism 9.2.0 с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса. За уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты: Было показано, что количество делящихся клеток, меченых EdU было достоверно более низким при использовании дозы 123 мг/кг по сравнению с дозой 40 мг/кг. Также было показано достоверно меньшее число BrdU-положительных клеток в группе EdU [123мг/кг] по сравнению с контрольной группой, которой вводили физ.раствор. При этом не было выявлено статистически значимых отличий между числом BrdU⁺ клеток в мозге животных, которым вводили физ.раствор или EdU в дозе 40 мг/кг. Также не

было обнаружено значимой разницы в числе клеток, содержащих одновременно обе метки, между животными, которым вводили разные дозы EdU.

Таким образом, у мышей, получивших высокую дозу EdU, нами было показано уменьшение числа выживших клеток, включивших EdU. Более высокая доза также снижала пролиферативную активность в гранулярном слое зубчатой фации гиппокампа, о чем свидетельствует меньшее число BrdU-положительных клеток в группе с высокой дозой EdU. При этом отсутствие разницы в числе колокализованных клеток может свидетельствовать о том, что сам факт получения EdU в большей дозе не влияет на дальнейшую пролиферативную активность: если делящаяся клетка выжила, то влияний на ее дальнейшие деления на коротких сроках высокая доза EdU не оказывает.

Заключение: Было показано, что однократное введение EdU в дозе 40 мг/кг не оказывает существенного краткосрочного влияния на деление клеток гиппокампа. При этом EdU в дозе 123 мг/кг приводит как к снижению числа выживших меченых клеток через 48 ч после инъекции, так и к снижению числа в последующем делящихся клеток. Таким образом нами были показаны антипролиферативные эффекты высокой дозы EdU в гранулярном слое зубчатой фации гиппокампа.

Литература:

1. Taupin Ph.. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation // Brain. Res Rev. – 2007 – Vol.53 - №1 – PP. 198-214. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.08.002.
2. Tang X., Falls D.L., Li X., Lane T., Luskin M.B.. Antigen-retrieval procedure for bromodeoxyuridine immunolabeling with concurrent labeling of nuclear DNA and antigens damaged by HCl pretreatment // J Neurosci – 2007 – Vol.27 - №22 - PP. 5837–5844. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5048-06.2007.
3. Breunig, J.J., Sarkisian, M.R., Arellano, J.I., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Sojitra, S., Wang, B., Flavell, R.A., Rakic, P., Town, T.. Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling // Proc Natl Acad Sci USA - 2008 – Vol. 105 - №35 – PP. 13127-13132. doi: 10.1073/pnas.0804558105.

4. Chehrehasa, F., Meedeniya A.C.B., Dwyer, P., Abrahamsen, G., Mackay-Sim, A.. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system // *J Neurosci Methods* – 2009 – Vol. 177 - №1 - PP. 122-130. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.006.
5. Salic A. and Mitchison, T.J.. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2008 – Vol. 105 - №7 - PP. 415-420. doi: 10.1073/pnas.0712168105.
6. Ross, H.H., Rahman, M., Levkoff, L.H., Millette, S., Martin-Carreras, T., Dunbar, E.M., Reynolds, B.A., Laywell, E.D.. Ethynyldeoxyuridine (EdU) suppresses in vitro population expansion and in vivo tumor progression of human glioblastoma cells // *J Neurooncol* – 2011 – Vol. 105 - № 3 - PP. 485-498. doi: 10.1007/s11060-011-0621-6.
7. Haskins J.S., Su C., Maeda J., Walsh K.D., Haskins A.H., Allum A.J., Froning C.E. and Kato T.A.. Evaluating the Genotoxic and Cytotoxic Effects of Thymidine Analogs, 5-Ethynyl-2-Deoxyuridine and 5-Bromo-2-Deoxyuridine to Mammalian Cells // *Int. J. Mol. Sci* – 2020 – Vol. 21 - №18 – PP. 6631. doi:10.3390/ijms21186631.
8. Diermeier, S., Schmidt-Bruecken, E., Kubbies, M., Kunz-Schughart, L.A., Brockhoff, G.. Exposure to continuous bromodeoxyuridine (BrdU) differentially affects cell cycle progression of human breast and bladder cancer cell lines // *Cell Prolif.* – 2004 – Vol. 37 - № 2 - PP. 195-206. doi: 10.1111/j.1365-2184.2004.00296.x.
9. Lehner, B., Sandner, B., Marschallinger, J., Lehner, C., Furtner, T., Couillard-Despres, S., Rivera, F.G., Brockhoff, G., Bauer, H.S, Weidner, N., Aigner, L.. The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival // *Cell Tissue Res* - 2011 – Vol. 345 - №3 - PP. 313-328. doi: 10.1007/s00441-011-1213-7.
10. Cappella, P., Gasparri, F., Pulici, M., Moll, J.. Cell Proliferation Method: Click Chemistry Based on BrdU Coupling for Multiplex Antibody Staining // *Curr Protoc Cytom.* – 2015 – Vol. 7 - №72 – PP. 7.34.1-7.34.17. doi: 10.1002/0471142956.cy0734s72.
11. Pereira, P.D., Serra-Caetano, A., Cabrita, M., Bekman, E., Braga, J., Rino, J., Santos, R., Filipe, P.L., Sousa, A.E. and Ferreira, J.A.. Quantification of cell cycle kinetics by EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)-coupled fluorescence-intensity analysis // *Oncotarget.* – 2017 – Vol. 8 – №25 – PP. 40514-40532. doi: 10.18632/oncotarget.17121.
12. Cattani, A., Ayali, A., Barnea, A.. The BrdU cell birth marker does not affect the recruitment of subsequent cell divisions in the adult bird brain // *BioMed Res. Int.* – 2015 – Vol. 1 - №11 – PP. 1-11. doi:10.1155/2015/126078.
13. Diermeier-Daucher S., Clarke, S.T., Hill, D., Vollmann-Zwerenz, A., Bradford, J.A., Brockhoff, G.. Cell Type Specific Applicability of 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for Dynamic Proliferation Assessment in Flow Cytometry // *Cytometry A* – 2009 – Vol. 75 - №6 - PP. 535-546. doi: 10.1002/cyto.a.20712.
14. Shevchouk O.T., Ball, G.F., Cornil, C.A., Balthazart G.. Studies of HVC Plasticity in Adult Canaries Reveal Social Effects and Sex Differences as Well as

Limitations of Multiple Markers Available to Assess Adult Neurogenesis // PLoS One. – 2017 – Vol.12 - №1 - PP. 1-31. doi: 10.1371/journal.pone.0170938.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект» и гранта РНФ 19-15-00247

THE DOSE-DEPENDENT EFFECT OF 5-ETHYNYL-2'-DEOXYURIDINE ON CELL PROLIFERATIVE ACTIVITY IN THE ADULT MOUSE HIPPOCAMPUS

Ermolaeva E.V.^{1,2}, Ivanova A.A.^{2,3,4}, Lazutkin A.A.^{2,4}

¹ *I.M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)*

² *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

³ *National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

⁴ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

E-mail: lazutkin.a.a@gmail.com

Abstract: EdU is a recently developed synthetic analogue of thymidine. The wide use of EdU requires the selection of doses without antiproliferative effects on brain stem cells. We have shown that EdU does not impair cell division at a dose of 40 mg/kg, and has a pronounced antiproliferative effect at a dose of 123 mg/kg.

Key words: proliferation; neurogenesis; 5-Bromo-2'-deoxyuridine; 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine

УДК 612.821

ХРОНИЧЕСКАЯ ДИСФУНКЦИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-
НАДПОЧЕЧНИКОВОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКИМ
ИНСУЛЬТОМ И ОТДАЛЕННЫМИ ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ
РАССТРОЙСТВАМИ

Жанина (Касаткина) М.Ю.^{1,2}, Фрейман С.В.^{1,2}, Дружкова Т.А.¹, Владимирова Е.Е.³, Еремина Н.Н.³, Гехт А.Б.¹, Гуляева Н.В.^{1,2}

¹ Научный практический психоневрологический центр им З.П. Соловьева,
Москва, Россия

² Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,
Россия

³ Городская клиническая больница им. М.П. Кончаловского, Москва Россия
e-mail: marina.kasatkina@ihna.ru

Аннотация: Получены результаты, подтверждающие хроническую дисфункцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, ассоциированную с ишемическим инсультом, и позволяющие предположить вовлеченность этой дисфункции в патогенез отсроченных постинсультных когнитивных и аффективных расстройств.

Ключевые слова: ишемический инсульт, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, кортизол, депрессивное расстройство, когнитивное снижение

Депрессия и деменция – самые распространенные психоневрологические осложнения после инсульта. Зачастую они коморбидны [1], что осложняет постановку диагноза и затрудняет выбор подходящего лечения. Предполагается, что данные осложнения возникают в результате дистантного повреждения гиппокампа, обусловленного дисфункцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) и нейровоспалением [2]. При гиперактивации ГГНО происходит избыточная секреция глюкокортикоидов, что может привести к повреждению структур мозга, чувствительных к ним, таких как гиппокамп. В свою очередь, нарушение функционирования гиппокампа является причиной развития многих когнитивных и эмоциональных расстройств [3]. В докладе представлены данные первого этапа клинического исследования, которое является частью большого трансляционного экспериментально-клинического проекта, направленного на выяснение

глюкокортикоид-зависимых механизмов развития отдаленных когнитивных и аффективных расстройств после фокального повреждения мозга.

Цель данного этапа исследования – оценить функциональную активность ГГНО по уровням кортизола, адренокортикотропного гормона (АКТГ), отношению кортизол/дегидроэпиандростерон (ДЭА), уровню α -амилазы в крови и в слюне пациентов на 1, 30, 180, 365 сутки после ишемического инсульта и проанализировать ассоциацию этих показателей с развитием постинсультных депрессивного расстройства и когнитивного снижения.

Материалы и методы: В продолжающееся исследование было включено 43 пациента после ишемического инсульта; (33 мужчины, 10 женщин), возраст - $56 \pm 9,7$ лет. Критериями исключения были: ишемический/геморрагический инсульт в анамнезе, ЧМТ с остаточными очаговыми изменениями на КТ/МРТ, тяжелые соматические заболевания, алкогольная и наркотическая зависимость. Тяжесть инсульта, оцененная по NIHSS, у всех пациентов была легкая/умеренная (<15 баллов), очаг поражения не затрагивал структуры лимбической системы.

Группа контроля состояла из 8 добровольцев, не отличавшихся от экспериментальной выборки по возрасту и полу, без инсульта или ЧМТ в анамнезе, без депрессии и когнитивного снижения на момент участия в исследовании. Все участники исследования подписали информационное согласие. Исследование было одобрено этической комиссией НПЦ психоневрологии им. З.П.Соловьева и ГКБ им. М.П. Кончаловского.

На 1, 30, 180 и 365 сутки после инсульта у пациентов были отобраны пробы крови и слюны для определения уровня кортизола, АКТГ, ДЭА и α -амилазы; у здоровых добровольцев – пробы слюны для определения уровня кортизола и α -амилазы.

Психиатрический диагноз был поставлен на основании собеседования и результатов тестирования по шкалам HADS (Hospital Anxiety and Depression

Scale), HDRS (Hamilton Rating Scale for Depression), BDI (Beck Depression Inventory), MoCA (Montreal Cognitive Assessment).

Статистический анализ проводили в среде программирования R, с использованием библиотек ggplot2, ggpubr, dunn.test. Для определения типа распределения данных использовали критерий Шапиро-Уилка. Для данных с нормальным распределением применялся дисперсионный анализ ANOVA и t-test Стьюдента. При распределении данных, отличным от нормального, применяли непараметрический дисперсионный анализ: Краскела-Уоллиса с post-hoc критерием Данна; а также критерии Манна-Уитни и Вилкоксона (при связанных выборках). При множественных сравнениях применяли поправку Бонферрони.

Результаты: Через 1 год после инсульта было диагностировано легкое/умеренное когнитивное снижение у 23 пациентов (53.5% от всех пациентов с инсультом), легкое депрессивное расстройство у 11 (25.6% от всех пациентов с инсультом). Коморбидность этих заболеваний наблюдалась у 7 больных (28% от всех больных депрессией и деменцией).

Таблица 1. Количественное распределение пациентов с постинсультными осложнениями по группам.

Группа пациентов	Число	%
Пациенты с когнитивным снижением без депрессивного расстройства	14	32.5 % (от общего числа пациентов n=43)
Пациенты с депрессивным расстройством без когнитивного снижения	2	4.65 % (от общего числа пациентов n=43)
Пациенты с депрессивным расстройством и когнитивным	2	4.65 % (от общего числа пациентов n=43)

снижением, зарегистрированными в разных точках (не одновременно)		
Пациенты с депрессивным расстройством и когнитивным снижением в одном временном промежутке (коморбидность)	7	28 % (от числа пациентов с когнитивным снижением и депрессивным расстройством n=25) 16.28 % (от общего числа пациентов n=43)

При лабораторном исследовании было найдено, что уровень кортизола в слюне пациентов на всех рассмотренных сроках после инсульта был достоверно выше, чем в контрольной группе.

У пациентов, имеющих в первый год после инсульта когнитивное снижение, уровень кортизола в слюне в острейшем периоде (в первые сутки после инсульта) был достоверно выше, чем у пациентов, имеющих в первый год после инсульта депрессивное расстройство. У пациентов с коморбидностью депрессия/когнитивное снижение в первый год после инсульта уровень α -амилазы в слюне на первые сутки был выше, чем у пациентов, у которых коморбидность не наблюдалась.

Уровень АКТГ в плазме крови у пациентов с постинсультными депрессивным расстройством и когнитивным снижением был ниже, чем у пациентов после инсульта без этих проявлений. На 30-е и на 180-е сутки (тенденция) этот показатель снижался у пациентов, у которых депрессивное расстройство было диагностировано на 180-е сутки; у пациентов с когнитивным снижением, диагностированным на 180-е сутки, в этот период уровень АКТГ был снижен.

Определение уровня кортизола в сыворотке крови в силу его высокой индивидуальной вариабельности не выявило достоверных различий у пациентов с постинсультной депрессией и деменцией по сравнению с

пациентами без этих последствий инсульта. Однако анализ отношения кортизол/ДЭА показал его увеличение у пациентов с деменцией, возникшей в течение первого года после инсульта. Статистически значимо это изменение было на 180-е сутки.

Соотношение АКТГ/кортизол было снижено у пациентов с депрессивным расстройством на 30-е сутки после инсульта, а у пациентов с когнитивным снижением - на 180-е сутки, при этом депрессивное расстройство и когнитивное снижение было диагностированы на 180-е сутки после инсульта.

Заключение:

1. У всех пациентов в первые сутки после инсульта происходит активация ГГНО, что на данном этапе может быть интерпретировано как проявление адаптивной реакции организма на острый стресс.
2. Повышенный уровень кортизола в слюне и пониженный уровень АКТГ в плазме крови у пациентов, наблюдаемые на протяжении первого года после инсульта, могут свидетельствовать о продолжительном постинсультном нарушении механизма обратной связи и дисфункции ГГНО.
3. Нарушения ГГНО наиболее выражены у пациентов, имеющих отсроченные постинсультные психоневрологические проявления.
4. Полученные результаты подтверждают хроническую дисфункцию ГГНО, ассоциированную с ишемическим инсультом, и позволяют предположить вовлеченность этой дисфункции в патогенез постинсультных когнитивных и аффективных расстройств.

Продолжение клинического исследования.

Набор больных с инсультом и добровольцев контрольной группы продолжается, завершающая точка наблюдения и обследования участников исследования - 2 года. Начат анализ данных МРТ пациентов, участвующих в исследовании, с целью оценить состояние структур мозга, в первую очередь гиппокампа.

Исследование выполняется при поддержке гранта РФФ № 21-75-20112

Литература:

1. Tene O., Shenhar-Tsarfaty S., Korczyn A.D., Kliper E., Hallevi H., et al. Depressive symptoms following stroke and transient ischemic attack: is it time for a more intensive treatment approach? results from the TABASCO cohort study. // The Journal of Clinical Psychiatry. – 2016 – Vol. 77 – PP. 673-680. doi: 10.4088/JCP.14m09759
2. Gulyaeva N.V. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. // J Neurochem. – 2019 – Vol. 44 – PP. 1306-1322. doi: 10.1007/s11064-018-2662-0
3. Podgorny O.V., Gulyaeva N.V. Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: Contribution of subgranular neurogenesis. // J Neurochem. – 2021 – Vol. 157 – PP. 370-392. doi: 10.1111/jnc.15265

CHRONIC DYSFUNCTION OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL SYSTEM IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE AND DELAYED NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS

Zhanina (Kasatkina) M.Y.^{1,2}, Freiman S.V.^{1,2}, Druzhkova T.A.¹, Vladimirova E.E.³,
Eremina N.N.³, Guekht A.B.¹, Gulyaeva N.V.^{1,2}

¹ Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow, Russia,

² Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia,

³State Budgetary Institution Konchalovsky City Clinical Hospital of Moscow City
Health Department, Moscow, Russia

Annotation: The results of the study confirm the chronic dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis associated with ischemic stroke and suggest the involvement of this dysfunction in the pathogenesis of delayed post-stroke cognitive and affective disorders.

Key words: ischemic stroke, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cortisol, depressive disorder, cognitive decline

УДК 575.224

ФОРМИРОВАНИЕ КРАТКОСРОЧНОЙ ПАМЯТИ У DROSOPHILA
MELANOGASTER С ПОДАВЛЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА LIMK1 В
ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ И ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ

**Заломаева Е.С.^{1,2,3}, Тураева С.К.¹, Медведева А.В.², Журавлев А.В.²,
Никитина Е.А.^{1,2}**

¹*ФГБОУ ВО Российский государственный педагогический университет им. А.И.
Герцена, Санкт-Петербург, Россия*

²*ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург,
Россия*

³*Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, Санкт-Петербург,
Россия*

E-mail: Zalomaeva.E@yandex.ru

Аннотация: В работе исследована способность к формированию памяти у линий *Drosophila melanogaster* с нейроспецифическим подавлением экспрессии гена *limk1*. Ген *limk1* кодирует белок LIMK1 - ключевой фермент в реорганизации актинового цитоскелета. Способность к формированию памяти оценивали с помощью метода условно-рефлекторного подавления ухаживания.

Ключевые слова: *limk1*; дофаминергические нейроны; холинергические нейроны; обучение; память

На сегодняшний день одной из актуальных проблем современной науки является понимание этиологии и патогенеза различных нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), к которым относят болезнь Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона и др. Данные заболевания являются результатом сложного взаимодействия неблагоприятных внешних факторов, а также индивидуальных особенностей генома, предрасполагающих к развитию болезни [1]. Один из ведущих факторов НДЗ – когнитивные нарушения. Основой обучения и памяти служит синаптическая пластичность нервной системы, в обеспечении которой важную роль играет реорганизация актинового цитоскелета. Ключевым ферментом данного процесса является LIMK1 [2]. Также известно, что изменения экспрессии гена *limk1* приводят к нейрокогнитивным патологиям. Анализ нуклеотидной последовательности гена *limk1 D. melanogaster* выявляет 71% гомологии с геном *limk1 H. sapiens*, в связи с чем *D. melanogaster* является наиболее удобным модельным объектом для осуществления данного исследования [3].

Цель: провести анализ формирования и динамики изменения краткосрочной памяти у самцов дрозофилы с нейроспецифическим подавлением синтеза LIMK1 в дофаминергических и холинергических нейронах.

Методика: Для подавления экспрессии гена *limk1* у самцов *D. melanogaster* методом РНК-интерференции применяли систему скрещивания Gal4/UAS. Исследование проводили с использованием гибридов с нарушением экспрессии гена *limk1* в дофаминергических нейронах (7009x26294) и холинергических нейронах (6793x26294), а также гибридов без нарушения таковой экспрессии: 7009x36303 и 6793x36303, соответственно. Способность к обучению и формированию памяти оценивали методом условно-рефлекторного подавления ухаживания (УРПУ) самца за оплодотворенной самкой. Для выработки УРПУ 5-суточного самца, не имеющего опыта полового поведения, помещали в специальную камеру с оплодотворенной самкой линии дикого типа *Canton-S* на 30 мин. Для оценки эффективности обучения вычисляли индекс обучения (ИО) сразу после обучения и спустя 60 минут после обучения. Для статистического анализа использовали двусторонний тест рандомизации.

Результаты: Исследование показало, что ИО у гибрида с подавлением синтеза *limk1* в дофаминергических нейронах 7009x26294 достоверно не отличался от 0, в то время, как у гибрида без подавления синтеза *limk1* 7009x36303 наблюдали достоверные отличия от 0 сразу после обучения (рис. 1). В то же время гибриды с подавлением синтеза *limk1* в холинергических нейронах продемонстрировали высокую способность к обучению, однако сохранить память в течение 60 минут оказались способны только гибриды без подавления синтеза *limk1* (6793x36303) (рис. 2). ИО мух линии 6793x26294 спустя 60 минут после обучения достоверно снизился по сравнению с ИО сразу после тренировки, а также достоверно отличался от ИО линии 6793x36303.

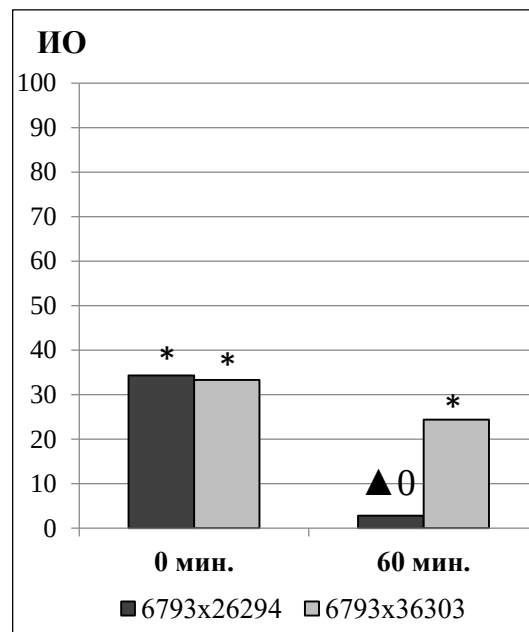
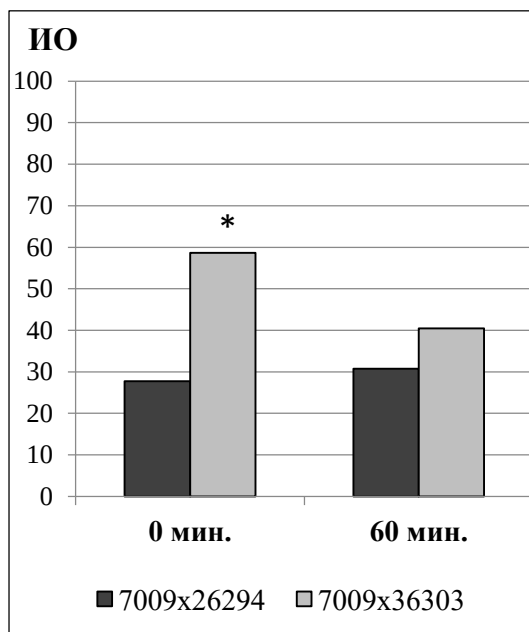


Рисунок 1. Индексы обучения у гибридов с подавлением *limk1* в дофаминергических нейронах.

Рисунок 2. Индексы обучения у гибридов с подавлением *limk1* в холинергических нейронах.

Примечание:

* - ИО достоверно отличается от 0 (нулевая линия) , $p < 0,05$;

0 –ИО достоверно отличается от 0 мин. своей линии, $p < 0,05$;

▲ –ИО достоверно отличается от контроля, $p < 0,05$.

Закключение: Таким образом, мухи с подавлением синтеза *limk1* в холинергических нейронах продемонстрировали высокую способность к формированию памяти, но низкую способность к её сохранению, в то время, как мухи с подавлением синтеза *limk1* в дофаминергических нейронах показали низкую способность к формированию памяти, но оказались способны сохранить память на том же уровне в течение часа. Полученные данные свидетельствуют о том, что процессы забывания у мух линии с нейроспецифическим подавлением синтеза *limk1* в холинергических нейронах выражены в большей степени. Этот факт открывает широкие перспективы для дальнейшего изучения роли активного врождённого забывания в становлении и сохранении памяти при дефектах гена *limk1*.

Работа поддержана грантом РФФИ (№20-015-00300 А).

Литература

5. Савватеева–Попова Е.В., Никитина Е.А., Медведева А.В. От нейрогенетики к нейроэпигенетике // Генетика. 2015. Т.51. №5. С. 613–624.
6. Ковалева Т.С., Максимова Н.С., Жуков И.Ю., Першин В.И., Мухина И.В., Гайнуллин М.Р. Кофилин: молекулярно-клеточные функции и роль в функционировании нервной системы // Нейрохимия. 2019. Т. 36. №1. С. 14-23.
7. Reiter L.T., Potocki L., Chien S., Gribskov M., Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster* // Genome Res. 2001. V. 11. №6. P. 1114-1125.

SHORT-TERM MEMORY FORMATION IN DROSOPHILA MELANOGASTER WITH SUPPRESSION OF LIMK1 GENE EXPRESSION IN DOPAMINERGIC AND CHOLINERGIC NEURONS

Zalomaeva E.S.^{1,2,3}, Tyraeva S.K.¹, Medvedeva A.V.², Zhuravlev A.V.², Nikitina E.A.^{1,2}

¹ *Herzen State Pedagogical University, St. Petersburg, Russia*

² *Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

³ *Institute of Bioregulation and Gerontology of the NWO RAMS, St. Petersburg, Russia*

Abstract: The ability to form memory in *Drosophila melanogaster* strains with neurospecific suppression of *limk1* gene expression was investigated. The *limk1* gene encodes the LIMK1 protein - a key enzyme in the reorganization of the actin cytoskeleton. The ability to form memory was evaluated using the conditioned courtship suppression paradigm.

Key words: *limk1*; dopaminergic neurons; cholinergic neurons; learning; memory

УДК 57.024

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ АКТИВАЦИИ МОЗГА ПРИ
ФОРМИРОВАНИИ И БЛОКАДЕ РАЗВИТИЯ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО
СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА У МЫШЕЙ

Заморина Т.А.¹, Торопова К.А.², Ивашкина О.И.², Анохин К.В.²

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия*

² *Курчатовский комплекс НБИКС и ИТ-технологий, НИЦ "Курчатовский
Институт", Москва, Россия*

Аннотация: В работе исследован паттерн активности структур мозга при формировании и нарушении развития посттравматического стрессового расстройства в модели у мышей. Показаны отличия в активации ряда структур системы страха мозга при развитии расстройства по сравнению с формированием нормальной аверсивной памяти.

Ключевые слова: посттравматическое стрессовое расстройство; аверсивное обучение; память; c-fos; блокада синтеза белка

Согласно литературным данным, более двух третей людей переживают травмирующее событие по крайней мере один раз в жизни [4]. По разным оценкам от 15% до 35% людей развивают посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) вследствие острой психологической травмы [2, 5, 7, 8]. ПТСР представляет собой нарушение эмоционального статуса и реакций на стрессорные ситуации и сопровождается рядом симптомов, таких как гиперреактивность, навязчивые воспоминания о травме, нарушение памяти, повышение тревожности и бдительности, приступы агрессии и др. [2]. Несмотря на широкую распространенность данного состояния, большое количество исследований и значительные расходы общества, связанные с потерей трудоспособности пациентами с ПТСР, на данный момент механизмы формирования данного расстройства остаются неизвестными.

Развитие ПТСР связывают с изменением в функционировании ряда областей мозга, большинство из которых являются структурами системы страха. Это такие области, как миндалина, гиппокамп, префронтальная кора, околотоводопроводное серое вещество и другие [3].

Известно, что развитие ПТСР можно нарушить, если воздействовать на травматическую память в момент формирования. Например, блокада синтеза

новых белков в мозге способна приводить к амнезии как в случае формирования нормальной, так и травматической памяти [6]. Однако неизвестно, возвращается ли к норме активность мозга при подобном нарушении развития ПТСР.

В данной работе мы исследовали активность мозга при формировании и нарушении развития ПТСР в модели на мышах. В данной модели, разработанной Siegmund и Wotjak [8], индукция ПТСР происходит вследствие нанесения сильного неизбежного электрокожного раздражения (ЭКР) лап, что приводит к развитию у животных ряда симптомов ПТСР: аномально сильной ассоциативной памяти об обстановке нанесения ЭКР, поведенческой сенситизации, повышенной тревожности, признаков эмоциональной тупости, социальной замкнутости, гиперреактивности [1, 8]. Модель позволяет инициировать у животных развитие данных симптомов и исследовать активность мозга животных как при формировании, так и при извлечении памяти о травме.

Методика: Для индукции ПТСР животных однократно подвергали травматическому опыту в новой обстановке, где они получали 3 удара током силой 1,5 мА и длительностью 10 с. Другую группу животных обучали условно-рефлекторному замиранию (УРЗ) на обстановку (1 удар током силой 1,0 мА и длительностью 2 с), при этом мыши формировали аверсивную память, не сопряженную с симптомами ПТСР. Животных контрольной группы также помещали в новую обстановку, но не наносили ЭКР. Через семь дней мышей тестировали в той же обстановке для оценки ассоциативной памяти. На следующий день проводили тест на сенситизацию, помещая животных в новую обстановку, отличную от экспериментальной, где подавали новый незнакомый звук (громкость 80 дБ, частота 9 кГц), который в норме не вызывает у мышей страха [10].

Чтобы сравнить паттерны активности мозга мышей при формировании нормальной аверсивной и травматической памяти мы получали образцы мозга животных через 90 минут после индукции ПТСР или обучения УРЗ и проводили иммуногистохимическое определение и подсчет нейронов, положительных по белку c-Fos, синтез которого индуцируется в клетках, получивших новую информацию и участвующих в формировании памяти [6, 11].

Для сравнения активности мозга при развитии и нарушении развития ПТСР, а также при формировании нормальной аверсивной памяти использовали четыре группы животных: с травматической, аверсивной и нарушенной травматической памятью, а также контрольную группу животных, которые находились в домашней клетке и не получали экспериментальных воздействий. Нарушение травматической памяти индуцировали, вводя животным блокатор синтеза белка циклогексимид (100 мг/кг) за 30 минут до нанесения ЭКР, тогда как животные групп с ненарушенной травматической и нормальной аверсивной памятью получали инъекцию физраствора в то же время. Через неделю животных снова помещали в обстановку нанесения ЭКР для тестирования ассоциативной памяти, после чего через 90 мин брали образцы мозга. Затем методом клеточного Fos-картирования сравнивали активность следующих областей мозга мышей при извлечении травматической памяти: фронтальная, прелимбическая, инфралимбическая, цингулярная области коры, миндалина, гиппокамп, околосредовое серое вещество, паравентрикулярное ядро таламуса. Ранее для этих областей было показано участие в системе страха у человека и животных [3].

Результаты: Сразу после получения ЭКР животные групп ПТСР и УРЗ демонстрировали более длительное время замирания в обстановке эксперимента, чем контрольные животные. При этом мыши группы ПТСР замирали больше, чем мыши группы УРЗ. Через семь дней в той же обстановке обе группы животных замирали достоверно дольше, чем контрольная группа.

При предъявлении незнакомого звука в новой обстановке обе группы животных, ПТСР и УРЗ, замирали больше, чем контрольные животные, при этом у животных с ПТСР уровень замирания был значимо выше, чем у животных группы УРЗ, что указывает на развитие у них сенситизации - одного из ключевых проявлений ПТСР. Таким образом, воспроизведенная нами модель развития ПТСР позволяет формировать у животных травматическую память, отличающуюся от нормальной аверсивной памяти более высоким уровнем страха у животных непосредственно после получения травматического опыта и при извлечении ассоциативной памяти, а также развитием выраженной сенситизации.

При анализе активности мозга мы обнаружили, что обучение УРЗ привело к активации миндалины, прелимбической, инфралимбической и цингулярной областей коры, а также полей СА1 и СА3, но не зубчатой фасции гиппокампа. В свою очередь формирование травматической памяти сопровождалось активацией тех же областей мозга, но латеральное и базолатеральное ядра миндалины, а также прелимбическая кора и зубчатая фасция гиппокампа, активировались сильнее при формировании ПТСР, чем при аверсивном обучении.

Введение циклогексиимида не оказало острого эффекта на поведение животных сразу после нанесения ЭКР. Однако при тестировании памяти об опасной обстановке через 7 дней после нанесения ЭКР животные, получившие циклогексиимид перед травматическим опытом, замирали значимо меньше, чем животные, получившие физраствор при индукции ПТСР, и не отличались от мышей с нормальной аверсивной памятью. Таким образом, блокада синтеза белка при индукции ПТСР нарушила формирование травматической памяти, в то время как ассоциативный компонент памяти оставался сохранным.

Уровень экспрессии c-fos при извлечении нарушенной травматической памяти у животных, получивших инъекцию циклогексиимида перед индукцией ПТСР, был достоверно ниже, чем у животных с развившейся травматической

памятью, в базолатеральном и центральном ядрах миндалины, цингулярной коре, паравентрикулярном ядре таламуса, околосредовом сером веществе и поле СА3 гиппокампа. При этом, активность большинства исследованных структур не отличалась у животных с нарушенной травматической памятью и у контрольных животных, не получавших экспериментального воздействия. Таким образом, блокада синтеза белка при индукции ПТСР привела к нормализации уровня активности мозга мышей при извлечении памяти.

Заключение: Сопоставление паттернов активности мозга мышей при индукции ПТСР и обучении условному рефлексу замирания показало, что формирование травматической и аверсивной памяти сопровождается активацией сходного набора структур головного мозга. При этом ряд структур (миндалины и прелимбическая кора) при индукции ПТСР активируются сильнее, чем при формировании аверсивной памяти.

Введение ингибитора синтеза белка циклогексимида перед индукцией ПТСР приводит к нарушению формирования травматической памяти, что отражается в нормализации уровня активации ряда структур мозга, в том числе прелимбической коры и базолатерального ядра миндалины при извлечении памяти о травматическом воздействии, а поведение у животных при нарушении развития ПТСР соответствует таковому у животных с нормальной аверсивной памятью. Таким образом, показано, что блокада синтеза белка в момент получения травматического опыта приводит к изменению поведения и паттернов активности мозга в сторону характерных для извлечения нормальной аверсивной памяти – то есть существенно нарушает развитие ПТСР в модели на мышах.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные

системы, искусственный интеллект», а также грантов РФФИ №19-015-00534 и №20-015-00427.

Литература

1. Торопова К. А., Анохин К. В. Моделирование посттравматического стрессового расстройства у мышей: нелинейная зависимость от силы травматического воздействия // Журн. высш. нерв. деят. 2018. V. 68. № 3. P. 378–394.
2. Breslau N., Chilcoat H. D., Kessler R. C., Peterson E. L., Lucia V. C. Vulnerability to assaultive violence: further specification of the sex difference in post-traumatic stress disorder // Psychol. Med. 1999. V. 29. № 4. P. 813–821.
3. Izquierdo I., Furini C. R. G., Myskiw J. C. Fear Memory // Physiol. Rev. 2016. V. 96. № 2. P. 695–750.
4. Javidi H., Yadollahie M. Post-traumatic stress disorder // Int J Occup Env. Med (The IJOEM). 2012. V. 3. № 1 January.
5. Kessler R. C. Posttraumatic stress disorder: the burden to the individual and to society. // J. Clin. Psychiatry. 2000. V. 61 Suppl 5. P. 4.
6. Kozlovsky N., Matar M. A., Kaplan Z., Kotler M., Zohar J., Cohen H. The immediate early gene Arc is associated with behavioral resilience to stress exposure in an animal model of posttraumatic stress disorder // Eur. Neuropsychopharmacol. 2008. V. 18. № 2. P. 107–116.
7. Malloy P. F., Fairbank J. A., Keane T. M. Validation of a multimethod assessment of posttraumatic stress disorders in Vietnam veterans. // J. Consult. Clin. Psychol. 1983. V. 51. № 4. P. 488.
8. Meneses E., Kinslow K., McKenney M., Elkbuli A. Post-Traumatic Stress Disorder in Adult and Pediatric Trauma Populations: A Literature Review // J. Surg. Res. 2021. V. 259. P. 357–362.
9. Siegmund A., Wotjak C. T. Toward an animal model of posttraumatic stress disorder // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006. V. 1071. № 1. P. 324–334.
10. Siegmund A., Wotjak C. T. A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear // J. Psychiatr. Res. 2007. V. 41. № 10. P. 848–860.
11. Zhang L., Zhou R., Xing G., Hough C. J., Li X., Li H. Identification of gene markers based on well validated and subcategorized stressed animals for potential clinical applications in PTSD // Med. Hypotheses. 2006. V. 66. № 2. P. 309–314.

BRAIN ACTIVATION PATTERNS IN FORMATION AND PREVENTION OF POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER IN MICE

Zamorina T.A.¹, Toropova K.A.², Ivashkina O.I.², Anokhin K.V.²

¹ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

² *Neuroscience Lab, NBICS-center, NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia*

Abstract: The pattern of activation of brain structures during the development and prevention of post-traumatic stress disorder (PTSD) was investigated in a mouse model. Differences were shown in the level of activation of the structures of the fear network of the brain during the development of PTSD and the formation of aversive memory.

Key words: posttraumatic stress disorder; fear learning; memory; c-fos; protein synthesis inhibition

УДК 612.017.2

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НОВЫХ РЕЖИМОВ ГИПОКСИЧЕСКОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ В МОДЕЛИ ТЯЖЕЛОЙ ГИПОКСИИ У КРЫС

Зенько М.Ю.

*ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург,
Россия.*

E-mail: zenkomichail@mail.ru

Аннотация: Гипоксия, особенно большой длительности или интенсивности, является угрожающим жизни состоянием, не менее важной является ее роль как

патофизиологического звена многих заболеваний человека и животных [1]. Трехкратное прекондиционирование (ПреК) с использованием умеренной гипобарической гипоксии (350 мм рт. ст., 2 часа) ранее показало себя как эффективный метод выработки адаптации к тяжелой гипоксии и пост-стрессорным расстройствам в моделях на крысах [2]. Однако для дальнейшего изучения методов подобного прекондиционирования в рамках трансляционной медицины и физиологии на других видах, особенно для человека, необходимо уменьшение выраженности гипоксии с сохранением эффективности его применения [3,4].

Ключевые слова: тяжелая гипоксия, прекондиционирование, адаптация, тренировка

Целью работы являлось изучение эффективности применение новых режимов гипоксического посткондиционирования в модели тяжелой гипоксии у крыс.

Методика: Исследование было выполнено на взрослых крысах-самцах линии Вистар (200-220 г), полученных из ЦКП «Биоколлекция» ИФ РАН. При проведении экспериментов были соблюдены принципы, изложенные в директивах Европейского Совета (2010/63/EU). Новые режимы гипоксического ПреК представляли из себя вариации со снижением «высоты», кратности, продолжительности гипоксического воздействия или с дополнительным применением фармакологического агента: 1) классическое ПреК (5км, 3 раза, 2 часа); 2) уменьшение длительности - 5 км, 3 раза, 1 час; 3) уменьшение «высоты» - 3,5км, 3 раза, 2 часа; 4) уменьшение кратности - 5км, 1 раз, 2 часа; 5) совместно с введением глюкокортикостероида дексаметазона (0,8 мг/кг, в.б.) 5км, 1 раз, 2 часа. После прохождения различного ПреК крысы всех групп, кроме интактного контроля, подвергались воздействию тяжелой гипоксии (180 мм рт. ст, 3 часа), после чего, производился подсчет выживаемости животных, а развитие нарушений оценивалось в неврологических тестах Бедерсона,

«постановки конечности» (placing test) и подтягивания, а также поведенческих тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт».

Результаты: По показателям выживаемости и неврологического статуса режим однократного ПреК с введением глюкокортикостероида по эффективности был сопоставим с трехкратным ПреК. Остальные режимы имели меньшую эффективность, наиболее сильно влияло снижение «высоты» ПреК, наименьшее – кратности. По результатам этих и предыдущих данных [5] стрессорный выброс или искусственное введение глюкокортикоидных гормонов, по-видимому, является важным механизмом действия гипоксического ПреК.

Заключение: Однократное ПреК с введением дексаметазона может быть предложено как новый эффективный режим ПреК в модели тяжелой гипоксии и как перспективный метод для изучения его эффективности при пост-стрессорных расстройствах.

Литература

1. Semenza, G.L. Hypoxia and human disease - and the Journal of Molecular Medicine. // J Mol Med. – 2007 – V. 85 – PP. 1293–1294. doi:10.1007/s00109-007-0285-z.
2. Рыбникова Е.А., Миронова В.И., Пивина С.Г. Гипоксическое прекондиционирование предотвращает развитие постстрессорных депрессивных состояний у крыс // Доклады Академии наук. – 2006 – Т. 411 – № 1 – С. 122-125.
3. Savla J.J., Levine B.D., Sadek H.A. The effect of hypoxia on cardiovascular disease: friend or foe? // High altitude medicine & biology. – 2018 – V. 19 – №. 2 – PP. 124-130. doi: 10.1089/ham.2018.0044.
4. Neubauer J.A. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. // Journal of applied physiology. – 2001 V. 90 – №. 4 – PP. 1593-1599. doi:10.1152/jappl.2001.90.4.1593.
5. Зенько М.Ю., Рыбникова Е.А. Роль глюкокортикоидных гормонов в стресс-протективных эффектах гипоксического посткондиционирования в моделях депрессии и посттравматического стрессового расстройства у крыс // Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. – 2020 – Т. 70 – №. 6 – СС 825-836. doi: 10.31857/S0044467720060131.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-015-00336.

COMPARATIVE EFFICACY OF NEW HYPOXIC PRECONDITIONING MODES IN THE MODEL OF SEVERE HYPOXIA IN RATS

Zenko M. Y.

Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, Russia.

E-mail: zenkomichail@mail.ru

Abstract: Hypoxia, especially of long duration or intensity, is a life-threatening condition, no less important is its role as a pathophysiological link in many human and animal diseases. Triple preconditioning (PreC) using moderate hypobaric hypoxia (350 mm Hg, 2 hours) has previously shown to be an effective method for developing adaptation to severe hypoxia and post-stressors disorders in rat models. However, to further investigate methods of such preconditioning within translational medicine and physiology on other species, especially for humans, it is necessary to reduce the severity of hypoxia while maintaining its effectiveness.

Key words: severe hypoxia, preconditioning, adaptation, training

УДК 612.821

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ФМРТ И ЭЭГ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ
УГНЕТЕНИЕМ СОЗНАНИЯ ДО И ПОСЛЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ рТМС
Зигмантович А.С.¹, Копачка М.М.², Александрова Е.В.², Смирнов А.С.²,
Шарова Е.В.¹, Окнина Л.Б.¹

¹ - *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии*

Российской академии наук

² - *ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко Минздрава*

России

e-mail: alexzig@ihna.ru

Аннотация: Восстановление сознания пациентов в форме посткоматозных бессознательных состояний при тяжелой черепно-мозговой травме относится к числу актуальных медико-социальных проблем. Анализ механизмов формирования подобных состояний и уточнение их информативных диагностических показателей нуждается в дополнениях на базе современных методических подходов. Для определения степени согласованности изменений гемодинамических и биоэлектрических показателей были проведены индивидуальные сравнительные исследования сетей покоя фМРТ и коннективности ЭЭГ в покое и во время прослушивания акустических стимулов у пациентов с позитивной динамикой состояния под действием курсовой ритмической транскраниальной магнитной стимуляции. Выявлено значительное соответствие зон изменения коннективности ЭЭГ при акустической нагрузке с динамикой топографии височной и речевой сетей покоя фМРТ, значимых для успешности восстановления сознания.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, посткоматозные бессознательные состояния, фМРТ, коннективность ЭЭГ, рТМС

Зачастую тяжелая черепно-мозговая травма является основополагающим фактором длительного нарушения сознания [1, 2]. Оценка анатомической и функциональной сохранности мозга, а также его потенциальных возможностей посредством использования разномодальных методологических подходов (фМРТ, ЭЭГ, ВП) относится к числу актуальных клинико-нейрофизиологических проблем [3, 4].

В последнее время в разных областях нейробиологии активно используется термин *connectivity* - связанность областей мозга (анатомическая и функциональная), как основа обеспечения состояния покоя и разных вариантов церебральной деятельности [5, 6]. Получено много данных [7, 8, 9, 10] об информативности оценки показателей коннективности ЭЭГ и фМРТ для характеристики состояния сознания при церебральной патологии, в том числе, в контексте анализа функциональных нейронных сетей фМРТ покоя [11, 12]. В литературе описаны от 7 до 15 сетей покоя фМРТ (СПфМРТ), устойчиво воспроизводимых как в индивидуальных, так и в групповых исследованиях у здоровых людей, но нарушаемых при патологии [13]. К числу значимых для восстановления сознания при его угнетении относят такие СПфМРТ как сеть пассивной работы мозга или режима по умолчанию (DMN), сенсомоторную, сеть управляющих функций (исполнительного контроля), латеральные лобно-теменные и аудиторную (слуховую) [14, 15]. По данным наших предыдущих ЭЭГ исследований, к их числу может относиться также речевая сеть [16].

Настоящее исследование является пилотным и было направлено на выявление особенностей нейросетевой организации мозга при посттравматическом угнетении сознания по данным фМРТ покоя и коннективности ЭЭГ. При этом в качестве «инструмента», способного изменять уровень нейрональной возбудимости и улучшать клиническое состояние пациентов, в работе использовался перспективный для нейрореабилитации метод ритмической транскраниальной стимуляции (рТМС) [17].

Методика. Детальный анализ СПфМРТ и ЭЭГ коннективности был проведен у 3-х пациентов (в возрасте 31-35 лет) с посттравматическим угнетением сознания и его изменением после курсовой рТМС лобных отделов полушарий [18], проводившейся в разные сроки после ТЧМТ (от 17 дней до 4,5 лет). Один из них исходно пребывал в вегетативном состоянии, двое в состоянии акинетического мутизма, согласно [19] или минимального сознания по шкале [20]. После курса рТМС у 2-х пациентов отмечено улучшение

состояния с переходом на одну и две стадии восстановления (от вегетативного состояния и акинетического мутизма - к мутизму с пониманием речи и выполнением инструкций), у одного – улучшение в пределах состояния акинетического мутизма, но с появлением эмоциональных реакций.

Наряду с клинико-неврологической оценкой, у пациентов проводился контроль фМРТ покоя и ЭЭГ (в состоянии покоя и при акустической нагрузке) до и после курсовой рТМС.

Контрольную группу здоровых испытуемых для фМРТ исследования составили 15 человек, для ЭЭГ-исследования – 8 человек.

Исследование фМРТ 3.0 Тл выполнялось на магнитно-резонансном томографе General Electric Signa HDxt (США) в состоянии покоя с закрытыми глазами в течение 10 мин 12 сек. Последующая обработка проводилась на базе пакета программ FSL по алгоритму, разработанному ранее в нашей лаборатории [21]. Оценивали топографию и количественные показатели 6 СПфМРТ, перечисленных во введении.

ЭЭГ записывали на оборудовании фирмы Нейроботикс (Россия) от 32 электродов по системе 10-10% в состоянии спокойного бодрствования и при прослушивании песенных отрывков. Стимульная презентация - 6 песенных отрывков (знакомых, незнакомых), число повторений каждого – 11, длительность предъявления – 4 с. Межстимульный интервал варьировал от 5 до 7 с. Последующий анализ проводили в программе Brainstorm [22] на базе MatLab с использованием коэффициента корреляции Пирсона и нелинейной причинности по Грейнджеру. Эпоха анализа - 600 мс, шаг анализа 1 мс. Анализируемый частотный диапазон 1-15 Гц.

Функциональные связи ЭЭГ рассчитывались и визуализировались в программе для всех электродов. При визуализации количество их на схемах было сокращено до 16 (Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, T3, T4, C3, C4, T5, T6, P3, P4, O1, O2).

Поскольку при использовании метода Грейнджера не выработаны общепринятые значения порогов визуализации, в настоящем исследовании выбран порог корреляционного анализа 0,5 для определения максимально выраженных отличий, а затем определяли направленность выявленных связей по Грейнджеру.

Результаты и обсуждение. Показано, что для всех 3-х исследованных пациентов сети покоя фМРТ отличны от нормы количеством выявляемых сетей (уменьшением их числа) и пространственной организацией (асимметричностью, нарушением характерной для нормы временной синхронизации активности внутрисетевых составляющих.) Степень этих нарушений сопряжена с уровнем угнетения сознания. Выявление и нормализация топологии речевой сети покоя фМРТ характерны для двух пациентов с выраженной позитивной динамикой сознания.

Отмечено определенное соответствие топографии сетей покоя фМРТ и паттерна коннективности ЭЭГ покоя, касающееся зон неспецифической активации, причастных к формированию нескольких СПфМРТ (лобных, центральных, теменно-затылочных, височных). Оценка ЭЭГ при аудиторных нагрузках способствует выявлению функциональных возможностей, скрытых в состоянии покоя. Прослушивание стимулов дает более полную и четкую оценку работы и сохранности аудиторной и речевой нейронных сетей.

Подтверждено, что терапевтическая рТМС лобных отделов полушарий способна активировать нейронные сети покоя либо их отдельные компоненты с тенденцией к нормализации сетевой топологии. Это наиболее характерно для пациентов с качественными позитивными изменениями состояния после рТМС до состояния минимального сознания с пониманием речи (мутизм с пониманием речи, 2 наблюдения), отражая вероятное восстановление межполушарных и внутриполушарных протяженных функциональных связей.

Заключение. У пациентов с ПКБС нарушения топологии и интенсивности сетей покоя фМРТ сопряжены с уровнем угнетения сознания. Тенденция к

нормализации показателей СПфМРТ, и речевой, в частности, характерна для пациентов с выраженной позитивной динамикой сознания. Пространственная организация коннективности ЭЭГ при сложной акустической нагрузке согласуется с топографией компонентов акустической и речевой сетей покоя фМРТ. Полученные данные подтверждают информативность оценки коннективности ЭЭГ в покое и при акустической стимуляции для диагностики и прогнозирования состояния сознания.

Список литературы

- 1) Потапов А. А. Рошаль Л. М., Лихтерман Л. Б. и др. Черепно-мозговая травма: проблемы и перспективы //Вопросы нейрохирургии им. НН Бурденко. – 2009. – №. 2. – С. 3-8.
- 2) Giacino J.T., Fins J.J., Laureys S., Schiff N.D. Disorders of consciousness after acquired brain injury: the state of the science //Nature Reviews Neurology. – 2014. – Т. 10. – №. 2. – С. 99-114.
- 3) Greicius M. Resting-state functional MRI: a novel tool for understanding brain networks in neuropsychiatric disorders //Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry. – Academic Press, 2016. – С. 247-262.
- 4) Coquelet N., De Tiège X., Destoky F. et al. Comparing MEG and high-density EEG for intrinsic functional connectivity mapping //NeuroImage. – 2020. – Т. 210. – С. 116556.
- 5) Friston K. J., Frith C. D., Liddle P. F. et al. Functional connectivity: the principal-component analysis of large (PET) data sets //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1993. – Т. 13. – №. 1. – С. 5-14.
- 6) Мартынова О. В. Сушинская-Тетерева А. О., Балаев В. В. и др. Корреляция функциональной связанности областей мозга, активных в состоянии покоя, с поведенческими и психологическими показателями //Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. – 2016. – Т. 66. – №. 5. – С. 541-555.
- 7) Boldyreva G. N., Zhavoronkova L. A., Sharova E. V. et al. Electroencephalographic intercentral interaction as a reflection of normal and pathological human brain activity //The Spanish journal of psychology. – 2007. – Т. 10. – №. 1. – С. 167-177.
- 8) Шарова Е.В., Челяпина М.В., Коробкова Е.В. и др. ЭЭГ-корреляты восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы //Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени НН Бурденко. – 2014. – Т. 78. – №. 1. – С. 14-25.
- 9) Cacciola A., Naro A., Milardi D. et al. Functional brain network topology discriminates between patients with minimally conscious state and unresponsive wakefulness syndrome //Journal of clinical medicine. – 2019. – Т. 8. – №. 3. – С. 306.

- 10) Carrasco-Gómez M., Keijzer H. M., Ruijter B. J. et al. EEG functional connectivity contributes to outcome prediction of postanoxic coma //Clinical Neurophysiology. – 2021. – Т. 132. – №. 6. – С. 1312-1320.
- 11) Demertzi A., Gomez F., Crone J. S. et al. Multiple fMRI system-level baseline connectivity is disrupted in patients with consciousness alterations //Cortex. – 2014. – Т. 52. – С. 35-46.
- 12) Demertzi A., Tagliazucchi E., Dehaene S. et al. Human consciousness is supported by dynamic complex patterns of brain signal coordination //Science advances. – 2019. – Т. 5. – №. 2.
- 13) Gilbert N., Bernier R. A., Calhoun V. D. et al. Diminished neural network dynamics after moderate and severe traumatic brain injury //PloS one. – 2018. – Т. 13. – №. 6. – С. e0197419.
- 14) Caeyenberghs K., Leemans A., Heitger M. H. et al. Graph analysis of functional brain networks for cognitive control of action in traumatic brain injury //Brain. – 2012. – Т. 135. – №. 4. – С. 1293-1307.
- 15) Sharp D. J., Scott G., Leech R. Network dysfunction after traumatic brain injury //Nature Reviews Neurology. – 2014. – Т. 10. – №. 3. – С. 156-166.
- 16) Зигмантович А. С., Окнина Л. Б., Копачка М. М. и др. Функциональные вейвлет-связи в состоянии покоя, отражающие восстановление сознания у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой //Физиология человека. – 2021. – Т. 47. – №. 2. – С. 22-31.
- 17) Копачка М. М., Шарова Е. В., Александрова Е. В. и др. В поисках эффективного алгоритма ритмической транскраниальной магнитной стимуляции в нейрореабилитации после тяжелой черепно-мозговой травмы //Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени НН Бурденко. – 2019. – Т. 83. – №. 6. – С. 111-119.
- 18) Kopachka M., Sharova E., Alexandrova E. et al. P76-S Therapeutic possibilities of transcranial magnetic stimulation in patients after traumatic brain injury (updated report) //Clinical Neurophysiology. – 2019. – Т. 130. – №. 7. – С. e115.
- 19) Доброхотова Т. А., Потапов А. А., Зайцев О. С. и др. Обратимые посткоматозные бессознательные состояния //Социальная и клиническая психиатрия. – 1996. – Т. 6. – №. 2. – С. 26-36.
- 20) Мочалова Е. Г., Легостаева Л. А., Зимин А. А. и др. Русскоязычная версия пересмотренной шкалы восстановления после комы—стандартизированный метод оценки пациентов с хроническими нарушениями сознания //Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова. Спецвыпуски. – 2018. – Т. 118. – №. 3. – С. 25-31.
- 21) Гаврон А. А., Шарова Е. В., Смирнов А. С. и др. Групповой и индивидуальный фМРТ анализ основных сетей покоя здоровых испытуемых //Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова. – 2019. – Т. 69. – №. 2. – С. 150-163.

- 22) Tadel F., Baillet S., Mosher J. C. et al. Brainstorm: a user-friendly application for MEG/EEG analysis //Computational intelligence and neuroscience. – 2011. – T. 2011.

COMPARATIVE FMRI AND EEG ANALYSIS OF THE BRAIN FUNCTIONAL
ACTIVITY IN PATIENTS WITH POSTTRAUMATIC SUPPRESSION OF
CONSCIOUSNESS BEFORE AND AFTER THERAPEUTIC RTMS

**Zigmantovich A.S.¹, Kopachka M.M.², Alexandrova E.V.², Smirnov A.S.²,
Sharova E.V.¹, Oknina L.B.¹**

¹ - *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy
of Science*

² - *Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery*

e-mail: alexzig@ihna.ru

Summary. The recovery of consciousness in patients in the form of post-comatose unconsciousness after severe traumatic brain injury is one of the most challenging medical and social issues. The analysis of the formation mechanisms of such conditions and the refinement of their informative diagnostic indicators require some additional information based on modern methodological approaches. To determine the degree of coherence of changes in hemodynamic and bioelectric parameters the following research has been carried out: individual comparative studies of fMRI resting networks and EEG connectivity at rest as well as while listening to acoustic stimuli in patients with positive dynamics of the state under the influence of repetitive transcranial magnetic stimulation. We have discovered a significant correspondence of the zones of changes in the EEG connectivity under acoustic load with the dynamics of the topography of the temporal and speech networks of fMRI resting state, which are significant for the success of the consciousness restoration.

Key words: traumatic brain injury, post-comatose unconsciousness, fMRI, EEG connectivity, rTMS

РОЛЬ МОДУЛЯЦИИ НАТРИЙ-КАЛИЕВОЙ АТФАЗЫ В
НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДАХ И КАЛЬЦИЕВОМ
ГОМЕОСТАЗЕ В НЕЙРОНАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ
ЭКСАЙТОТОКСИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

**Иванова М.А.¹, Абушик П.А.¹, Карелина Т.В.¹, Степаненко Ю.Д.¹,
Сибаров Д.А.¹, Антонов С.М.¹.**

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

E-mail: etrnlrddl@gmail.com

Аннотация: Одним из механизмов обострения нейродегенеративных заболеваний является эксайтотоксический стресс клеток, опосредованный ионным дисбалансом и нарушением работы внутриклеточных систем. Причиной чаще являются патологическое накопление гомоцистеина и глутамата. В данной работе было изучено влияние 0,1–1 нМ убаина на внутриклеточную передачу сигналов Ca^{2+} , напряжение внутренней митохондриальной мембраны и жизнеспособность клеток в первичных культурах кортикальных нейронов крыс при нейротоксическом воздействии глутамата и гомоцистеина. Таким образом, мы продемонстрировали роль модуляции Na/K-АТФазы убаином и изучили часть механизмов, лежащих в основе нейропротекторного эффекта, что предполагает существование различных потенциальных фармакологических методов лечения гипергомоцистеинемии и эксайтотоксичности глутамата.

Ключевые слова: гомоцистеин, глутамат, убаин, кальций, нейропротекция

В мозге гомоцистеин и глутамат действуют как агонисты рецепторов глутамата, гиперактивация которых способна привести к развитию апоптоза и некроза нейронов [1]. Na/K-АТФаза обеспечивает ионный баланс клеток. В последних исследованиях показано, что Na/K-АТФаза также действует как преобразователь сигналов [2]. Убаин — кардиотонический стероид, может специфически связываться с Na/K-АТФазой и ингибировать ее активность. Однако, в субнанолярных концентрациях, убаин способен модулировать ее работу и, посредством метаболитных каскадов, регулировать ионный баланс клетки.

Методика: В данной работе мы изучили влияние 0,1-1 нМ убаина на передачу сигналов внутриклеточного кальция, митохондриального мембранного потенциала и жизнеспособность клеток в первичных культурах кортикальных нейронов крыс при воздействии 100 мМ гомоцистеина и 100 мМ глутамата. Кроме того, оценили участие некоторых протеинкиназ в эффектах убаина в течении 4 и 24 часового действия.

Результаты: Как нейротоксический агент, после 4 часов действия, гомоцистеин вызывал уменьшение митохондриального потенциала на 20%, тогда как глутамат — на 70%. После эксайтотоксического воздействия гомоцистеина и глутамата уровень живых клеток уменьшался на 30% и 45%, соответственно. Субнанолярный убаин оказывал немедленное (после 4 часов) и отложенное (после 24 часов) нейропротекторное действие на клетки, уменьшая кальциевую перегрузку внутриклеточных депо и падение мембранного потенциала. Эффект наблюдался так же в снижении уровня апоптоза на 35% на фоне действия глутамата и на 20% — гомоцистеина. При длительных эксайтотоксических действиях убаин также предотвращал развитие апоптоза в культуре нейронов. Было выявлено, что данные механизмы опосредованы через протеинкиназу А и протеинкиназу С для гомоцистеина, но не для глутамата.

Заключение: Внутриклеточные сигнальные каскады на фоне как краткосрочного и долгосрочного эксайтотоксического действия глутамата и гомоцистеина различаются по многим аспектам нейротоксического действия, включая интенсивность цитозольного накопления Ca^{2+} и потерю напряжения митохондриальной внутренней мембраны, однако выравнивание ионного баланса в нейронах достаточно для предотвращения как развития некроза, так и апоптоза в кортикальных нейронах. В этих условиях эксайтотоксического стресса нейропротекторный эффект убаина является результатом ускорения оттока ионов Ca^{2+} из нейронов. Данный механизм, опосредованный работой Na/K-АТФазы и Na/Ca-обменника, позволяет избежать митохондриальной дисфункции и предотвратить развитие проапоптотических каскадов в клетке.

Литература

8. Deep SN, Mitra S, Rajagopal S, Paul S, Poddar R. GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca^{2+} influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death. // *Neurobiology* – 2019 – Vol. 294 – PP. 11154-11165. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008820>.
9. Ivanova MA, Kokorina AD, Timofeeva PD, Karelina TV, Abushik PA, Stepanenko YuD, Sibarov DA, Antonov SM. Calcium Export from Neurons and Multi-Kinase Signaling Cascades Contribute to Ouabain Neuroprotection in Hyperhomocysteinemia. // *Biomolecules* – 2020 – Vol. 10 - №8 – PP. 1104 - 1122. <https://doi.org/10.3390/biom10081104>.

ROLE OF Na^+/K^+ -ATPASE MODULATION IN NEUROPROTECTIVE SIGNALING CASCADES AND CALCIUM HOMEOSTASIS AGAINST EXCITOTOXICITY IN RAT CORTICAL NEURONS

Ivanova M.A.¹, Abushik P.A.¹, Karelina T.V.¹, Stepanenko Yu. D.¹, Sibarov D.A.¹, Antonov S.M.¹

¹ *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint-Petersburg, Russia*

Abstract: One of the mechanisms of neurodegenerative diseases is cell excitotoxic stress, mediated by ionic imbalance and functional disruption of intracellular subsystems. The causes are more often pathological accumulation of homocysteine and glutamate. In this work, we studied the effect of 0.1–1 nM ouabain on intracellular Ca^{2+} signaling, mitochondrial membrane potential, and cell viability in primary cultures of rat cortical neurons under the neurotoxic effects of glutamate and homocysteine toxic insults. The involvement of several kinases in ouabain-mediated effects and its potential neuroprotective effect has been identified. Involvement of some kinases in ouabain-mediated effects was evaluated. Therefore, we have demonstrated the role of Na/K-ATPase modulation by ouabain and studied some of the mechanisms underlying the neuroprotective effect, which suggests the existence of different appropriate pharmacological treatments for hyperhomocysteinemia and glutamate excitotoxicity.

Key words: homocysteine, glutamate, ouabain, calcium, neuroprotection

УДК 612.821

Детектирование спонтанных потенциалов действия в записях активности нейронов неокортекса с использованием паттернов ЭЭГ в качестве предикторов

Иджилова О.С., Смирнов И.В., Малышев А.Ю.

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

E-mail: olgaidzh@gmail.com

Аннотация: Для нейронов первичных сенсорных областей неокортекса характерно наличие спонтанной активности, которая проявляется в виде пачек потенциалов действия и маскирует истинный ответ нейрона на сенсорную стимуляцию в ходе эксперимента. В данной работе был предложен алгоритм детектирования и удаления спонтанных потенциалов действия из записей активности нейронов, обученный на предикторах, извлеченных из ЭЭГ.

Ключевые слова: первичная зрительная кора, спонтанная активность, ориентационная селективность, ЭЭГ, вейвлет-преобразование

Введение

Известно, что во время сна и схожих с ним состояний в мозге могут возникать вспышки генерализованной активности, которые могут играть роль в обработке накопившейся информации [1]. Однако во время экспериментов, включающих сенсорную стимуляцию и параллельную регистрацию отдельных нейронов, спонтанная активность в виде потенциалов действия накладывается на ответы клеток на стимуляцию и таким образом выступает в роли шума. Часто подобная активность нерегулярна и не может быть эффективно исключена простыми способами (такими как вычитание средней частоты потенциалов действия в качестве базовой линии). Но поскольку у этой активности может существовать удаленный источник, общий для значительной области неокортекса, мы предположили, что ее появление можно предсказать по активности в другой области коры, также затронутой общим возбуждением. С этой целью мы создали алгоритм и обучили его предсказывать возникновение спонтанных потенциалов действия в экстраклеточных записях активности нейронов первичной зрительной коры. В качестве предикторов были взяты наборы признаков, извлеченных из ЭЭГ, которая одновременно регистрировалась в теменной коре. В дальнейшем с помощью этого алгоритма были обработаны записи, сделанные во время зрительной стимуляции, и оценено влияние такой обработки на величину измеряемых параметров рецептивных полей нейронов.

Методы

Эксперименты были выполнены на мышах линии C57BL под уретановой анестезией. Активность нейронов первичной зрительной коры регистрировалась экстраклеточно. Одновременно производилась запись одноканальной ЭЭГ в области теменной коры. Потенциалы действия, зарегистрированные в нейронах первичной зрительной коры в отсутствие зрительной стимуляции, рассматривались как спонтанные. Для обучения

модели на ЭЭГ были выделены эпизоды, которые сопровождались появлением (класс 0) либо отсутствием (класс 1) спонтанных потенциалов действия. К каждому такому эпизоду применялось вейвлет-преобразование, и из его коэффициентов формировались наборы признаков для обучающей выборки. Далее с помощью обученной таким образом модели производилась классификация ЭЭГ в скользящем окне на записях стимуляции, и те потенциалы действия, которые были классифицированы как спонтанные, были исключены из дальнейшего анализа. Эффективность работы алгоритма оценивалась путем сравнения величин индексов селективности, рассчитанных по исходным и обработанным записям.

Результаты

Пачки спонтанных потенциалов действия зачастую сопровождаются характерным паттерном на ЭЭГ (медленноволновой пик с нисходящим «гребнем»; рис. 1). Благодаря этому оказалось возможным успешно предсказывать возникновение спонтанной активности в нейроне зрительной коры с помощью анализа частотных составляющих соответствующего эпизода ЭЭГ. После «очистки» записи с помощью обученной модели значение индекса ориентационной селективности значительно повысилось, что свидетельствует о достаточной эффективности предложенного нами алгоритма.

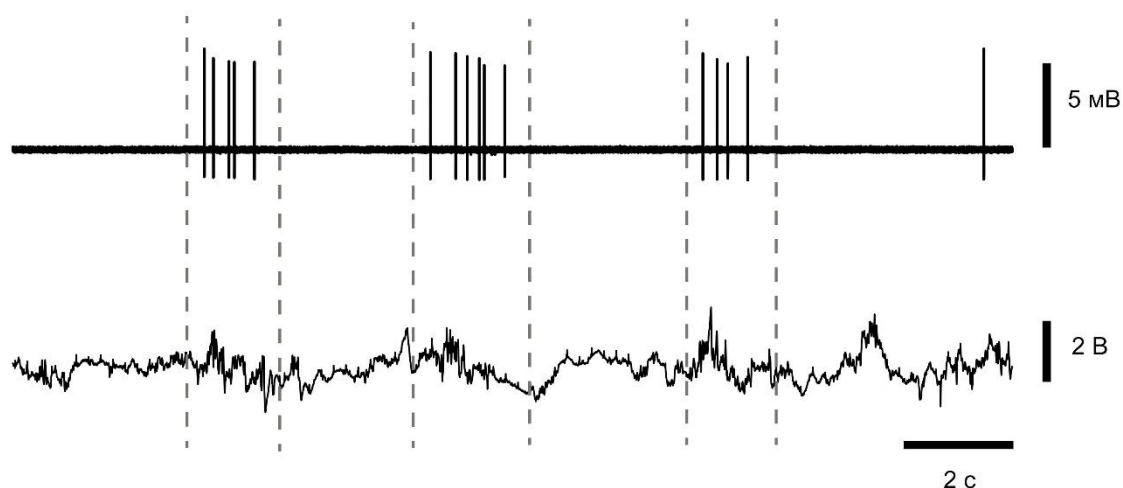


Рис. 1. Пачки спонтанных потенциалов действия зачастую сопровождались характерным паттерном на ЭЭГ. Пример экстраклеточной записи спонтанной активности нейрона первичной зрительной коры (вверху) и соответствующий участок записи с теменного электрода ЭЭГ с «гребнями» (внизу). Пунктирными линиями обозначены приблизительные границы всплеск.

Заключение

Мы предполагаем, что оба наблюдаемых явления — характерный паттерн на ЭЭГ и спонтанная активность в нейронах V1 — обусловлены медленноволновой синхронизованной активностью неокортекса, о которой неоднократно сообщалось ранее другими авторами (например, [2], [3]). Эта взаимосвязь используется в предлагаемом здесь алгоритме, который позволяет с помощью постобработки записей повысить качество оценки параметров рецептивных полей нейронов первичной зрительной коры.

Литература

1. Luczak A, Barthó P, Marguet SL, Buzsáki G, Harris KD. Sequential structure of neocortical spontaneous activity in vivo. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007 – Vol. 104 – PP. 347-352. doi: 10.1073/pnas.0605643104.
2. Steriade M, Nuñez A, Amzica F. Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *The Journal of Neuroscience*. – 1993 – Vol. 13 – № 8 – PP. 3266-3283. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-08-03266.1993.

3. Volgushev M, Chauvette S, Mukovski M, Timofeev I. Precise long-range synchronization of activity and silence in neocortical neurons during slow-wave oscillations [corrected]. The Journal of Neuroscience. – 2006 – Vol. 26 – № 21 – PP. 5665-5672. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0279-06.2006.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 20-15-00398.

Detection of spontaneous action potentials in extracellular recordings of neocortical neurons using EEG predictors

Idzhilova O.S., Smirnov I.V., Malyshev A.Yu.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

Abstract: Spontaneous activity is characteristic of the neurons of neocortical sensory areas. During electrophysiological recording, it manifests itself as spontaneous bursts of action potentials, which mask the neuron's true response to the presented sensory stimuli. In this study, we propose a machine learning algorithm for detection and elimination of spontaneous action potentials from extracellular recordings, using EEG predictors.

Key words: primary visual cortex, spontaneous activity, orientation selectivity, EEG, wavelet transform

УДК 612.823

ВЛИЯНИЕ ЭПИЛЕПСИИ И КОМОРБИДНОЙ ДЕПРЕССИИ НА МОРФОЛОГИЮ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА

Иерусалимский Н.В.^{1,2}, Самотаева И.С.^{1,2}, Каримова Е.Д.^{1,2}

¹ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии»

Российской академии наук, Москва, Россия.

²ГБУЗ «Научно-практический психоневрологический центр имени З.П.

Соловьева» Департамента здравоохранения города Москвы, Россия.

Аннотация: Эпилепсия зачастую сопровождается коморбидной депрессии, что может отражаться на течении и характере эпилепсии. В работе проводилась оценка влияния височной эпилепсии и коморбидной депрессии на морфологические особенности структур головного мозга. Морфометрический анализ проводился по данным МРТ испытуемых, группы пациентов сравнивали между собой и с группой контроля.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография; височная эпилепсия; депрессия; морфометрический анализ

Эпилепсия - наиболее распространенное хроническое неврологическое заболевание, которым страдают около 65 миллионов человек в мире. Коморбидная депрессия (у 40% пациентов) значительно усугубляет последствия припадков, также является фактором риска. Результаты ряда работ по морфометрии головного мозга указывают на возможную общую патофизиологию депрессии и эпилепсии [1].

Гипотеза исследования: развитие эпилепсии влияет на морфологические особенности структур головного мозга, наличие при этом коморбидной депрессии может усугублять данные негативные проявления заболевания.

Цель исследования: Оценить влияние височной эпилепсии и коморбидной депрессии на морфологические особенности структур головного мозга.

Методика: Обследовано 80 пациентов с височной эпилепсией (17-60 лет, из них 38 - с коморбидной депрессией) и 48 здоровых испытуемых сопоставимого возраста. МРТ-исследование головы проводилось по эпилептическому протоколу на томографе с напряженностью 1,5 Т; степень выраженности депрессивного расстройства определялась врачами-психиатрами на основе

шкалы депрессии Бека (BDI-II). Для определения объемов подкорковых структур и толщины корковых структур МРТ-данные были обработаны с помощью программного обеспечения FreeSurfer 6.0 и затем проанализированы в программе SPSS Statistics 17.0 IBM.

Нормальность распределения индивидуальных величин объемов и толщин была проверена с использованием метода Колмогорова-Смирнова, гомогенность дисперсий с помощью критерия Левена. Для структур, которые показали значимые отклонения от нормального распределения был применен непараметрический тест Краскала-Уоллеса, по фактору группы - пациенты с эпилепсией и депрессией, пациенты с эпилепсией без депрессии и здоровые испытуемые. Для структур с незначимым отклонением от нормального распределения был проведен однофакторный дисперсионный анализ по фактору группы. Для коррекции эффекта множественных сравнений была применена поправка Холма-Бонферрони. Парные сравнения для структур, имеющих равные дисперсии распределений по группам, были проведены с использованием апостериорного критерия Тьюки, для имеющих разные дисперсии распределений по группам – с использованием критерия Даннета. Далее на рисунках объемы и толщины приведены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты: В результате морфометрического анализа было обнаружено значимое снижение объема таламуса (Рис.1.) билатерально (($F=$; $p=$), левое полушарие (10,639; 0,000) и правое полушарие (9,405; 0,000)) и увеличение объемов сосудистого сплетения билатерально (левое полушарие ($\chi^2 = 11,612$; $p= 0,003$) и правое полушарие ($F= 6,792$; $p=0,002$)), а также значимое снижение толщины энторинальной ($F=8,968$; $p=0,000$) и задней поясной коры ($F=6,576$; $p=0,002$) в левом полушарии (Рис.2.) у пациентов с эпилепсией по сравнению с группой контроля.

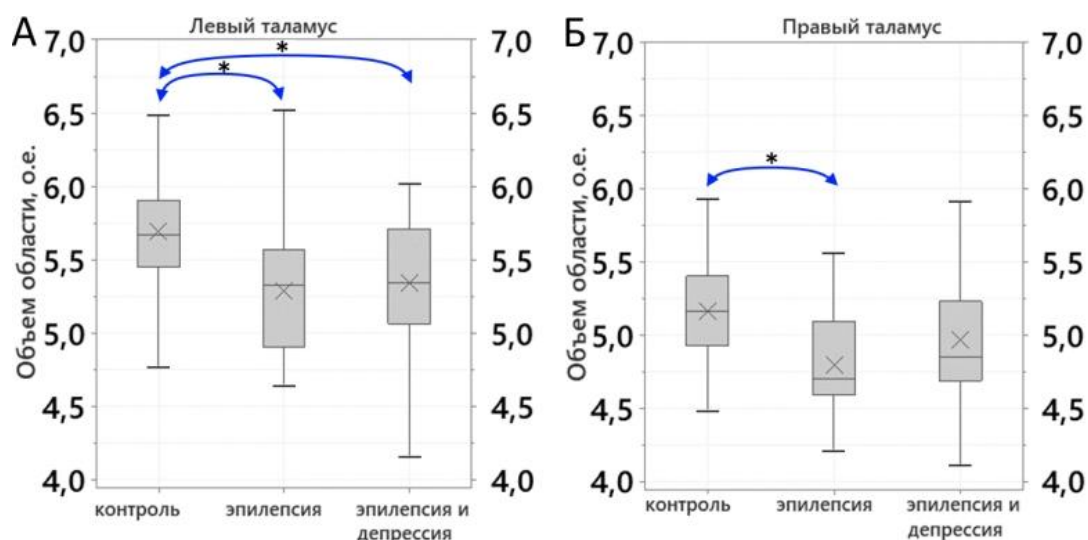


Рис. 1. Объем левого (А) и правого (Б) таламуса. Вертикальные планки обозначают медианы, 1й и 3й квартили и их 2 стандартных отклонения.

* – достоверные отличия между двумя группами испытуемых, post-hoc тест Тьюки, $p < 0.05$. А) группы – контроль-эпилепсия $p=0,000$; контроль-эпилепсия с депрессией $p=0,001$;

Б) группы – контроль-эпилепсия $p=0,000$.

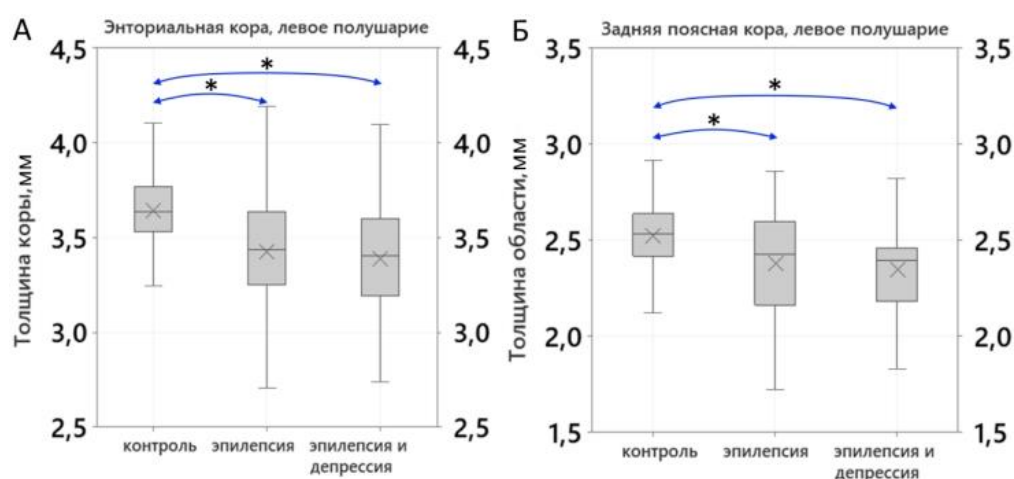


Рис. 2. Толщина энторинальной коры (А) и задней поясной коры (Б) в левом полушарии. Вертикальные планки обозначают медианы, 1й и 3й квартили и их 2 стандартных отклонения.

* – достоверные отличия между двумя группами испытуемых, post-hoc тест Тьюки, $p < 0.05$. А) группы – контроль-эпилепсия $p=0,003$; контроль-эпилепсия с депрессией $p=0,001$;

Б) группы – контроль-эпилепсия $p=0,015$; контроль-эпилепсия с депрессией $p=0,003$.

Заключение: Морфометрический анализ показал значимое увеличение объема левого и правого сосудистого сплетения головного мозга у пациентов с эпилепсией по сравнению с контрольной группой. Также было выявлено значимое снижение объема таламуса билатерально и толщины энторинальной и задней поясной коры в левом полушарии у пациентов с эпилепсией по сравнению с контрольной группой. Причем для сосудистого сплетения, корковых структур и левого таламуса значимые различия со здоровыми добровольцами у пациентов с эпилепсией были вне зависимости от наличия коморбидной депрессии, а для правого таламуса достоверно были меньше объемы только у группы пациентов без депрессией по сравнению с группой контроля.

Таким образом, было обнаружено влияние эпилепсии на морфологию ГМ испытуемых. Отсутствие различий между подгруппами пациентов с эпилепсией может указывать на менее явное влияние депрессии по сравнению с эпилепсией.

Литература

1. Hesdorffer D.C., Lúðvígsson P., Hauser W.A., Ólafsson E., Kjartansson O. Co-occurrence of major depression or suicide attempt with migraine with aura and risk for unprovoked seizure// Epilepsy research. – 2007. - Vol. 75 - No. 2-3, PP. 220-223. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2007.05.001.

EFFECT OF EPILEPSY AND COMORBID DEPRESSION ON THE MORPHOLOGY OF THE BRAIN STRUCTURES IN PATIENTS WITH EPILEPSY

Ierusalimsky N. V.^{1,2}, Samotaeva I. S.^{1,2}, Burkitbayev S. E.^{1,2}, Karimova E. D.^{1,2}

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

²Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Healthcare Department of Moscow, Moscow, Russia.

Abstract: Epilepsy and depression affect the functioning of the brain. The effect of temporal lobe epilepsy and comorbid depression on the morphological features of the brain structures was assessed in the study. Morphometric analysis was carried out according to the MRI data of the subjects, patients groups were compared with each other and with the control group.

Key words: epilepsy; depression; morphometry; MRI

УДК 612.822

СОПОСТАВЛЕНИЕ ПАТТЕРНОВ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *C-FOS* И *ARC* В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ МЫШЕЙ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ И ИЗВЛЕЧЕНИИ ОБСТАНОВОЧНОЙ АССОЦИАТИВНОЙ ПАМЯТИ

Казанская Л.С.¹, Ивашкина О.И.^{2,3}, Торопова К.А.^{2,3}, Анохин К.В.^{1,2}

¹ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия.

²Институт перспективных исследований мозга МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.

³НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.

E-mail: lidia.kazanskaya@gmail.com

Аннотация: В работе проводили оценку индукции немедленных ранних генов *c-fos* и *Arc/Arg3.1* в мозге мышей после формирования и извлечения памяти в задаче условно-рефлекторного замирания на обстановку. Показано, что при

данном воздействии в ряде структур мозга происходит индукция обоих генов, однако только в 30% нейронов экспрессируются одновременно оба гена.

Ключевые слова: немедленные ранние гены; *c-Fos*; *Arc*; нейропластичность; энграмма

Актуальность: Одним из ключевых этапов процесса консолидации долговременной памяти является экспрессия немедленных ранних генов (НРГ), которые запускают пластические изменения в синапсах нейронов. Эти гены часто выступают в роли маркеров нейронной активности и позволяют выявлять энграммные клетки для последующей манипуляции целой энграммой и процессом извлечения памяти у животных [1, 2]. На сегодняшний день известно большое количество НРГ, причём клеточные функции некоторых из них значительно различаются [3]. Однако, вопрос о том, частично или полностью совпадают популяции нейронов, экспрессирующие разные НРГ, изучен недостаточно.

В данном исследовании для сравнения паттернов экспрессии были выбраны НРГ *c-fos* и *Arc/Arg3.1*. Оба этих гена хорошо изучены, проявляют высокую активность в мозге при обучении, могут экспрессироваться в нейронах практически всех отделов мозга и при этом имеют низкий базальный уровень экспрессии [4, 5]. Однако, данные гены имеют различия в структуре промоторов [6], таким образом, они могут экспрессироваться в разное время после когнитивного воздействия или в разных нейронах.

Методика: В исследовании были использованы 5 групп мышей C57Bl/6: а) животные после однократного обучения условно-рефлекторному замиранию на обстановку (n=7); б) активный контроль (АК), взятый после обучения (n=7); в) животные после тестирования памяти (n=7); г) АК, взятый после тестирования памяти (n=7); д) пассивный контроль (ПК), взятый из домашней клетки (n=4). В

ходе обучения животных на 3 минуты помещали в камеру с электродным полом и подавали электро-кожное раздражение (ЭКР) силой 1мА на 2с спустя 2 минуты обследования обстановки. Тестирование памяти происходило через 24 часа после обучения и представляло собой помещение в ту же камеру на 3 минуты без ЭКР. Животные из групп АК проходили через те же процедуры, что и опытные животные, но не получали ЭКР при обучении. Всех животных спустя 90 минут после поведенческих процедур умерщвляли летальной дозой хлоралгидрата и подвергали перфузии с раствором формальдегида. Срезы мозга животных толщиной 50мкм изготавливали на вибраторе, а затем использовали для двойного иммуногистохимического окрашивания на белки *c-Fos* и *Arc*. На изображениях срезов, полученных при помощи конфокального микроскопа Olympus FluoView FV10i, полуавтоматическим методом в программе Imaris был проведён подсчёт числа клеток, меченых по *c-Fos*, по *Arc* и клеток, содержащих обе метки. Последние считались клетками с колокализацией экспрессии. В дальнейшем рассчитывали количество клеток с колокализацией экспрессии относительно всех *c-Fos*⁺ или *Arc*⁺ клеток.

Результаты: Иммуногистохимический анализ показал индукцию *c-fos* и *Arc* в ответ на новизну: было показано увеличение количества *c-Fos*⁺ и *Arc*⁺ во многих исследованных структурах мозга животных экспериментальных групп и групп АК по сравнению с ПК. Однако, между опытной группой и соответствующим АК уровень экспрессии как *c-fos*, так и *Arc* ни в одной структуре значимо не различался.

После обучения уровни экспрессии *c-fos* и *Arc* у животных опытной группы были значимо повышены в ретроспленальной и париетальной коре по сравнению с ПК. При этом в ретроспленальной коре не было значимых различий между количеством *Arc*⁺ и *c-Fos*⁺ нейронов, а в париетальной коре количество *Arc*⁺ клеток было значимо большим, чем количество *c-Fos*⁺ клеток у обученных животных. В гиппокампе как у животных группы обучения, так и у

АК, не наблюдалось увеличение экспрессии *c-fos* и *Arc* по сравнению с ПК, но количество Arc^{+} нейронов значимо превосходило количество $c-Fos^{+}$ нейронов. После тестирования памяти в гиппокампе также не наблюдалось различий в уровне экспрессии генов между ПК и экспериментальной группой, а также группой АК, но численность Arc^{+} клеток в этих группах была значимо большей, чем численность $c-Fos^{+}$ клеток. Похожий паттерн наблюдался и в цингулярной коре, где по обоим генам не было обнаружено значимых различий с ПК, но количество Arc^{+} нейронов была значимо большим, чем количество $c-Fos^{+}$ нейронов только в группе АК. В миндалине и инфралимбической коре уровни экспрессии *c-fos* и *Arc* были повышены по сравнению с ПК, но не различались между собой.

Важно отметить, что независимо от исследуемой структуры мозга, поведенческой задачи и индивидуальных уровней экспрессии *c-fos* и *Arc*, между двумя популяциями меченых клеток было только частичное перекрытие, при котором порядка 30% клеток, экспрессировавших один ген, также экспрессировали второй. Объяснением небольшому перекрытию популяций $c-Fos^{+}$ и Arc^{+} клеток при сопоставимой численности этих популяций может служить их неодинаковое распределение по кортикальным слоям и субполям гиппокампа, которое наблюдалось визуально при подсчёте клеток. Подробный анализ данного явления будет проведён в продолжении данной работы.

Заключение: Наши результаты показывают, что белки $c-Fos$ и Arc не являются эквивалентными маркерами нервной активности, индуцированной стимулом, поскольку они экспрессируются в популяциях клеток, различных более чем на 60%. При этом популяция Arc^{+} клеток насчитывала больше нейронов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2020-801) и

Литература:

10. Ghandour K, Ohkawa N, Fung CCA, Asai H, Saitoh Y, Takekawa T, Okubo-Suzuki R, Soya S, Nishizono H, Matsuo M, Osanai M, Sato M, Ohkura M, Nakai J, Hayashi Y, Sakurai T, Kitamura T, Fukai T, Inokuchi K. Orchestrated ensemble activities constitute a hippocampal memory engram. // Nat Commun. – 2019 – Vol. 10 – № 1 – P. 2637. doi: 10.1038/s41467-019-10683-2.
11. Lacagnina AF, Brockway ET, Crovetti CR, Shue F, McCarty MJ, Sattler KP, Lim SC, Santos SL, Denny CA, Drew MR. Distinct hippocampal engrams control extinction and relapse of fear memory. // Nat Neurosci. – 2019 – Vol. 22 – № 5 – PP. 753-761. doi: 10.1038/s41593-019-0361-z.
12. Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. // Front Mol Neurosci. – 2016 – Vol. 8 – P. 78. doi: 10.3389/fnmol.2015.00078.
13. Herdegen T, Leah JD. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. // Brain Res Brain Res Rev. – 1998 – Vol. 28 – № 3 – PP. 370-490. doi: 10.1016/s0165-0173(98)00018-6.
14. Korb E, Finkbeiner S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. // Trends Neurosci. – 2011 – Vol. 34 – №11 – PP. 591-598. doi: 10.1016/j.tins.2011.08.007.
15. Flavell SW, Greenberg ME. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. // Annu Rev Neurosci. – 2008 – Vol. 31 – PP. 563-590. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.

**COMPARISON OF C-FOS AND ARC GENES EXPRESSION PATTERNS IN
MOUSE BRAIN AFTER CONTEXTUAL ASSOCIATIVE MEMORY
FORMATION AND RETRIEVAL**

Kazanskaya L.S.¹, Ivashkina O.I.^{2,3}, Toropova K.A.^{2,3}, Anokhin K.V.^{1,2}

¹ *P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia.*

² *Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, Russia.*

³ *National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia.*

Abstract: The study evaluated the induction of immediate early genes *c-fos* and *Arc/Arg3.1* in mouse brain after contextual fear conditioning and after memory retrieval. It was shown that the induction of both genes in a number of brain structures occurs after this exposure, however, only 30% of neurons simultaneously express both genes.

Key words: immediate early genes, c-Fos, Arc, neuroplasticity, engram

УДК 612.822.3

ВЛИЯНИЕ АРГИНИНСОДЕРЖАЩЕГО ТРИПЕПТИДА НА МЕДЛЕННЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ НОЦИЦЕПТИВНЫХ НЕЙРОНОВ

Калинина А. Д.¹

*¹ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург,
Россия*

E-mail: kalininaad@infran.ru

Аннотация: Работа направлена на изучение механизма лиганд-рецепторного связывания аргининсодержащего трипептида Ac-RRR-NH₂ с натриевыми каналами Na_v1.8 методом локальной фиксации потенциала. Показано, что действие трипептида на мембрану ноцицептивного нейрона снижает потенциалочувствительность каналов Na_v1.8.

Ключевые слова: аргининсодержащий трипептид, ноцицептивный нейрон, каналы Na_v1.8, метод локальной фиксации потенциала

Ключевую роль в кодировании ноцицептивной информации на уровне первичного сенсорного нейрона играют медленные натриевые каналы $Na_v1.8$ его цитоплазматической мембраны. Изучение сигнальных механизмов, связанных с активацией каналов $Na_v1.8$, представляет интерес как фундаментальная база для разработки новых клинически значимых анальгетических лекарственных препаратов [1].

Ранее нами было показано, что действие гексапептидов, вновь синтезированных на основе аминокислотной последовательности эндогенных белков дефенсинов, приводит к снижению потенциалочувствительности натриевых каналов $Na_v1.8$ [2]. Нами были предприняты попытки выделить наиболее короткие аргининсодержащие пептидные молекулы, полученные на основе молекулы дефенсина и способные эффективно модулировать каналы $Na_v1.8$, поскольку данные пептиды могут претендовать на роль безопасных анальгетических лекарственных субстанций.

Целью данной работы явилось исследование механизма лиганд-рецепторного связывания вновь синтезированного короткого аргининсодержащего пептида $Ac-RRR-NH_2$ с натриевыми каналами $Na_v1.8$.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на изолированных сенсорных нейронах, выделенных из дорзальных ганглиев новорожденных крысят линии *Wistar* методом краткосрочного культивирования. Изменение потенциалочувствительности медленных натриевых каналов $Na_v1.8$ в контроле и после воздействия трипептида регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала («patch-clamp») в конфигурации «регистрация активности целой клетки» («whole-cell recording»).

Результаты. Методом локальной фиксации потенциала была исследована способность трипептида $Ac-RRR-NH_2$ модулировать возбудимость мембраны

ноцицептивных нейронов – снижать потенциалочувствительность медленных натриевых каналов $Na_v1.8$, ответственных за кодирование болевых сигналов. Медленные натриевые токи каналов $Na_v1.8$ регистрировали до и после действия вновь синтезированного трипептида с наружной стороны мембраны сенсорного нейрона (Рис. 1А). Процесс лиганд-рецепторного связывания действующей молекулы с натриевыми каналами отражается изменением величины эффективного заряда (Z_{eff}) активационного воротного устройства. Для определения численного значения величины Z_{eff} нами использовался модифицированный метод Алмерса [3]. В результате проведенной серии экспериментов было получено, что величина Z_{eff} в контроле составила 6.9 ± 0.3 ($n=17$), после действия трипептида Ас-RRR- NH_2 в концентрации 100 нмоль/л величина Z_{eff} значительно снижалась до $Z_{eff} = 4.8 \pm 0.4$ ($n=18$) (Рис. 1Б).

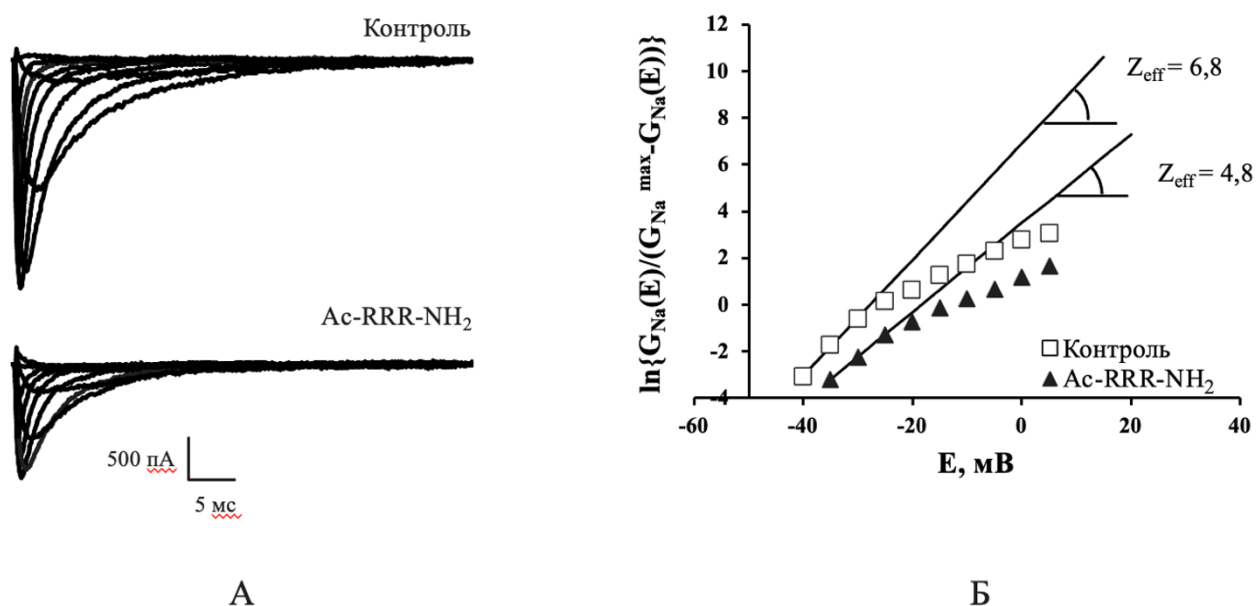


Рисунок 1. Влияние трипептида Ас-RRR- NH_2 на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов $Na_v1.8$

А. Записи семейств медленных натриевых токов, зарегистрированных в контроле (вверху) и после (внизу) действия трипептида.

Б. Влияние трипептида Ас-RRR-NH₂ на величину эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов Na_v1.8. Экспоненциальная функция, представленная в логарифмическом масштабе (ось ординат), позволяет определить величину Z_{eff} по тангенсу угла наклона асимптот, проведенных к начальным участкам этих функций в контроле и после действия трипептида.

Заключение. Согласно нашей гипотезе, лиганд-рецепторное связывание коротких аргининсодержащих пептидов с каналами Na_v1.8 осуществляется за счет образования ион-ионных связей между молекулой натриевого канала и гуанидиновыми группами аргинильных остатков пептида. Для обеспечения возможности наиболее энергетически выгодного связывания гуанидиновые группы в действующей пептидной молекуле должны находиться на определенном пороговом расстоянии друг от друга. В данной работе было показано, что трипептид Ас-RRR-NH₂ способен эффективно связываться с натриевыми каналами Na_v1.8, а также модулировать их потенциалочувствительность. Проведенные квантовохимические расчеты позволили подтвердить ранее высказанную нами гипотезу и определить минимальное пороговое значение расстояния между гуанидиновыми группами в молекулах аргининсодержащих коротких пептидов, которое составляет примерно 10 Å.

Работа выполнена в рамках реализации Программы НЦМУ и при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2020-921 от 13.11.2020).

Литература

1. Krylov B. V. New Non-opioid Analgesics: Understanding Molecular Mechanisms on the Basis of Patch-clamp and chemical Studies / B. V. Krylov, I. V. Rogachevskii, T. N. Shelykh, V. B. Plakhova – UAE: Bentham Science Publishers Ltd., 2017.

2. Плахова В. Б., Рогачевский И. В., Шелых Т. Н., Подзорова С. А., Крылов Б. В. Циклический полипептид PP-14 модулирует потенциалочувствительность медленных натриевых каналов // Сенсорные системы. – 2016. – Т. 30. – № 3. – С. 234-240.
3. Almers W. Gating currents and charge movements in excitable membranes // Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. –1978. – V. 82. – P. 97-190.

EFFECT OF ARGININE-CONTAINING TRIPEPTIDE ON SLOW SODIUM CHANNELS OF NOCICEPTIVE NEURONS

Kalinina A. D.¹

¹Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Abstract: The work is aimed at studying the mechanism of ligand-receptor binding of arginine-containing tripeptide Ac-RRR-NH₂ with sodium channels Na_v1.8 by patch-clamp technique. It has been shown that the action of a tripeptide on the membrane of a nociceptive neuron reduces the potential sensitivity of Na_v1.8 channels.

Key words: arginine-containing tripeptide, nociceptive neuron, Na_v1.8 channels, patch-clamp technique

УДК 612.822

ДОФАМИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ НЕРВНОЙ ПРОВОДИМОСТИ

**Калинина Д.С.^{1,2}, Горский О. В.¹, Сысоев Ю.И.¹, Горяинова А.В.¹,
Муслиенко П.Е.¹**

¹*Институт трансляционной биомедицины Санкт-Петербургского
государственного университета, Санкт-Петербург, Россия.*

²*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: kalinina.dana@gmail.com

Аннотация: Изучение дофаминергической модуляции сенсомоторных функций является актуальной задачей нейрофизиологии и биомедицины. В данной работе проводилось сравнительное исследование моторных вызванных потенциалов до и после инъекции блокатора синтеза дофамина у крыс различным уровнем дофамина.

Ключевые слова: моторные вызванные потенциалы; ЭМГ; нервная проводимость; возбудимость нервной системы

Нигростриарный дофаминергический путь является основным элементом экстрапирамидной системы, который отвечает за бессознательный контроль мышечного тонуса, поддержание позы, мимику и пластичность при различных формах моторного поведения. Нарушение дофаминергической системы приводит к снижению двигательной активности, снижению скорости моторных реакций, состоянию скованности и гипертонусу мышц. Ключевым регулятором активности дофамина (DA) является транспортер DA (DAT). Ранее было показано, что отсутствие DAT у мышей DAT-KO приводит к 7-кратному увеличению внеклеточной концентрации DA [1]. Ингибирование тирозингидроксилазы альфа-метил-р-тирозином (AMPT) приводит к блокированию синтеза катехоламинов и умеренному снижению уровня DA у мышей дикого типа, тогда как у мышей DAT-KO наблюдается почти полное

отсутствие DA [2]. Целью исследования было изучить дофамин-зависимые изменения проводимости и возбудимости у крыс DAT-KO и WT.

Методика: Для исследования использовались самцы крыс с нокаутом гена, кодирующего DAT (DAT-KO, n = 4) и дикого типа (WT, n = 4). Для стимуляции моторной области коры головного мозга были имплантированы мягкие и гибкие кортикальные арреи NeuroPrint (описанные ранее [3]) эпидурально в двигательную зону левой задней конечности под общей анестезией (изофлуран, 1.5%), на 1 мм латеральнее и на 1 мм каудальнее относительно брегмы. Референсный электрод для стимуляции располагался эпидурально над мозжечком на 1 мм каудальнее лямбды. Для записи электромиограммы (ЭМГ) проволочные электроды из нержавеющей стали были имплантированы в медиальные икроножные мышцы левой и правой задней конечностей (L_GM, R_GM), как описано ранее [4]. Референсный электрод ЭМГ был имплантирован подкожно в область плечевого пояса справа. Все эксперименты проводились после 5-8-дневного периода восстановления на крысах в свободном поведении. Моторные вызванные потенциалы регистрировали дважды – без введения веществ и через час после внутрибрюшинного введения 250 мг/кг АМРТ. Моторные вызванные потенциалы индуцировались электрической стимуляцией (A-M Systems) области моторной коры задних конечностей (бифазный импульс 0,5 мс, 300 Гц, 15 мс, 0,6–1,9 мА). Анализ вызванных потенциалов проводился при помощи скрипта Matlab.

Результаты: Избирательное истощение дофаминергических терминалей с помощью АМРТ у DAT-KO крыс приводило к почти немедленной потере локомоторной активности и развитию тяжелого акинетического фенотипа, что ранее было описано для мышей DAT-KO (мышей DDD) [2]. Крысы дикого типа также имели нарушение инициации движения после инъекции АМРТ. Зарегистрированные моторные вызванные потенциалы представляют собой

полисинаптические потенциалы. Скорость проводимости кортикоспинальных трактов, нейроны которых стимулировали, колеблется от 5 до 19 м/с [5], что соответствует нашим результатам: среднее расстояние между областью моторной коры и мышцей задней конечности у крыс составляет около 20 см, и, соответственно, приблизительная скорость проведения импульсов около 8 м/с. Средняя латентность у крыс дикого типа до введения АМРТ составляет $23,42 \pm 0,52$ мс и $22,34 \pm 0,52$ мс у крыс DAT-KO. Блокирование синтеза катехоламинов АМРТ не влияет на латентность у WT ($24,39 \pm 0,38$ мс), но снижает ее у крыс DAT-KO ($19,63 \pm 0,46$ мс). Максимальная ЭМГ активность мышц в ответ на стимуляцию моторной области у крыс дикого типа приходится на 5-25 бины, тогда как у крыс DAT-KO активность распределяется по всем бинам с небольшим увеличением в промежутке от 5 до 35 бина. Однако после инъекции АМРТ распределение амплитуды изменилось: в WT максимум был на 10-25 бинах, тогда как у DAT-KO - на 5-20 бинах. Таким образом, амплитуда моторных вызванных потенциалов увеличивается по сравнению с исходным состоянием без АМРТ в первые 15 бинов у крыс DAT-KO, тогда как у WT она напротив снижена (достоверность различий по тесту Манна-Уитни $P < 0.0286$).

Заключение: Дофамин оказывает возбуждающее воздействие на нервную систему и полученные данные показали, что почти полное отсутствие дофамина у DAT-KO крыс после АМРТ приводит к снижению латентного периода моторных вызванных потенциалов, что может указывать на реорганизацию нисходящих кортикоспинальных проекций в популяции моторных нейронов задних конечностей. Таким образом, дофаминергическая модуляция ГАМК-ергических и глутаматергических нейронов на уровне коры головного мозга, базальных ганглий и мозжечка может оказывать влияние на сенсомоторные функции у крыс DAT-KO.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ МК-2765.2021.1.4 и Министерства науки и высшего образования РФ 075-00408-21-00.

Литература

1. Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, Illiano P, Caffino L, Sanna F, Messa G, Emanuele M, Esposito A, Dorofeikova M, Budygin EA, Mus L, Efimova EV, Niello M, Espinoza S, Sotnikova TD, Hoener MC, Laviola G, Fumagalli F, Adrian, W, Gainetdinov RR. Pronounced Hyperactivity, Cognitive Dysfunctions, and BDNF Dysregulation in Dopamine Transporter Knock-out Rats. // J. Neurosci. – 2018 - Vol. 38 – № 8 – PP. 1959–1972. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1931-17.2018>.
2. Sotnikova, T. D., Beaulieu, J. M., Barak, L. S., Wetsel, W. C., Caron, M. G., Gainetdinov, R. R. Dopamine-independent locomotor actions of amphetamines in a novel acute mouse model of parkinson disease. // PLoS Biology. – 2005 - Vol. 3 – № 8 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030271>.
3. Afanasenkau D, Kalinina D, Lyakhovetskii V, Tondera C, Gorsky O, Moosavi S, Pavlova N, Merkulyeva N, Kalueff AV, Minev IR, Musienko P. Rapid prototyping of soft bioelectronic implants for use as neuromuscular interfaces. // Nature BioMed Eng. - 2020 - Vol. 4 – № 10 – PP. 1010–1022. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00615-7>.
4. Capogrosso M, Wagner FB, Gandar J, Moraud EM, Wenger N, Milekovic T, Shkorbatova P, Pavlova N, Musienko P, Bezard E, Bloch J, Courtine G. Configuration of electrical spinal cord stimulation through real-time processing of gait kinematics. // Nature Protocols. - 2018 - Vol. 13 – № 9 – PP. 2031–2061. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0030-9>.
5. Mediratta N, Nicoll JA. Conduction velocities of corticospinal axons in the rat studied by recording cortical antidromic responses. // J. Physiol. - 1983 - Vol. 336 – № 1– PP. 545–561. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1983.SP014597>.

DOPAMINERGIC REGULATION OF NERVOUS CONDUCTIVITY

Kalinina D.S.^{1,2}, Gorskiy O.V.¹, Sysoev Yu.I.¹, Goryainova A.V.¹, Musienko P.E.¹

¹ *Institute for Translational Biomedicine, St. Petersburg State University, St.*

Petersburg, Russia.

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Abstract: The study of dopaminergic modulation of sensorimotor functions is an actual problem of neurophysiology and biomedicine. The work is aimed at studying dopamine-dependent changes in the conduction and excitability of the nervous system in rats with different levels of dopamine. Here we conducted a comparative study of motor evoked potentials before and after injection of a dopamine synthesis blocker alpha-methyl-p-tyrosine (AMPT) in rats with a knockout of the dopamine transporter gene and wild-type rats.

Key words: motor evoked potentials; EMG; nerve conduction; nervous system excitability

УДК 612.821.2

КЛАССИФИКАЦИЯ ОШИБОЧНОСТИ РЕШЕНИЯ ЛИНГВИСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ НА ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАФИЧЕСКИХ ДАННЫХ МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

Калошин П.Е., Ребрейкина А.Б., Ларионова Е.В., Балаев В.В.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

E-mail: kaloshinpavel@gmail.com

Аннотация: Выявление ошибочных действий – важное направление в анализе ЭЭГ с точки зрения изучения когнитивных функций. Работа направлена на исследование паттернов ошибочного решения лингвистической задачи у детей 7-10 лет. В работе проводился анализ ЭЭГ данных методами машинного обучения.

Ключевые слова: ЭЭГ, машинное обучение

Известно, что электроэнцефалографические данные являются репрезентативными в задачах распознавания когнитивной деятельности человека ([1], [2], [3]). При этом отдельный интерес представляет задача

распознавания ошибочности действий [4], имеющая различные практические применения (например, улучшение быстродействия нейромашинных интерфейсов [5]), а также дающая ценные данные о когнитивных функциях мозга [6].

Методика: В рамках проведенной работы были рассмотрены данные электроэнцефалограммы (ЭЭГ) 29 детей в возрасте 7 - 10 лет (средний возраст 8.7+- 0.8, 13 мальчиков). Детям на экране показывались слова на орфографические правила “жи/ши” и безударные гласные в корне, с ошибками и без. Задачей испытуемых было ответить, правильно ли написано слово на экране. Задачей исследования было распознать ошибки испытуемых по данным ЭЭГ оперативного покоя после совершения ответа (длительность эпохи ЭЭГ 800 мс).

Основными проблемами при решении поставленной задачи были количество и несбалансированность данных. При выбранной сложности эксперимента большинство детей ошибалось менее чем в 10% случаев. Для повышения достоверности качество алгоритмов предсказания тестировалось на 5 испытуемых с уровнем ошибок 20-40%. Были использованы различные стратегии обучения как на сырых данных (метрики, производные от сырого сигнала), так и на спектральной мощности, в т.ч. стратегии балансировки (SMOTE, различные варианты семплирования), стратегии понижения размерности данных (PCA, tSNE, CSP [7]), регуляризации алгоритмов, а также самих алгоритмов классификации (логистическая регрессия, наивный байесовский классификатор, решающие деревья, случайный лес, метод опорных векторов).

Результаты: Оптимальные алгоритмы классификации (в т.ч. стратегии семплирования обучающей выборки) варьируются от человека к человеку. Наилучшая точность для выбранных пяти испытуемых представлена в таблице 1.

№	доля ошибок испытуемого, %	точность алгоритма, %
1	35	52.3 ± 1.34
2	22.8	58.7 ± 1.57
3	27.7	55.9 ± 1.4
4	26.3	57.2 ± 1.19
5	27.2	56.3 ± 2.33

Заключение: Результаты классификации близки к случайным значениям. Низкая точность классификации может быть связана с тем, что данные сильно неоднородны между испытуемыми, соответственно, обобщение требует большего количества экспериментов. В дальнейшем планируется поиск зависимости классификации осознанности ошибочных действий в состоянии покоя с данными вызванных потенциалов, регистрируемых на моторный ответ испытуемых, которые отражают имплицитное распознавание ошибочных действий.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проект № 20-013-00925).

Литература

1. EEG correlates of task engagement and mental workload in vigilance, learning, and memory tasks. Berka C, Levendowski D J, Lumicao M N, Yau A, Davis G, Zivkovic V T, Olmstead R E, Tremoulet P D and Craven P L. б.м. :Aviat. Space Environ. Med, 2007 г.
2. Robust EEG-based cross-site and cross-protocol classification of states of consciousness. al, Engemann D A et. б.м. : Brain, 2018 г.
3. Review and Classification of Emotion Recognition Based on EEG Brain-Computer Interface System Research: A Systematic Review. Al-Nafjan A, Hosny M, Al-Ohali Y and Al-Wabil A. б.м. : Applied Science, 2017 г.
4. The Error-Related Negativity. William J Gehring, Brian Goss, Michael G H Coles, David E Meyer, Emanuel Donchin. б.м. : Perspective Psychology Science, 2018 г.
5. Noise Mitigation for Neural Entity Typing and Relation Extraction. Yadollah Yaghoobzadeh, Heike Adel, Hinrich Schütze. б.м. : Association for Computational Linguistics, 2017 г.
6. The error-related negativity for error processing in interoception. Yafei Tan, Jolien Vandeput, Jiang Qiu, Omer Van den Bergh, Andreas von Leupoldt. б.м. : Neuroimage, 2019 г.
7. **Applying an efficient evolutionary algorithm for EEG signal feature selection and classification in decision-based systems Sajjad Afrakhteh, Mohammad Reza Mosavi, in Energy Efficiency of Medical Devices and Healthcare Applications, 2020**

LINGUISTIC TASKS ERRORS CLASSIFICATION BY ELECTROENCEPHALOGRAPHY DATA DURING RESTING STATE USING MACHINE LEARNING METHODOLOGY

Kaloshin P.E, Rebreikina A.B., Larionova E.V., Balaev V.V.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

E-mail: kaloshinpavel@gmail.com

Annotation: Errors recognition is an important area of EEG research from the point of view of cognitive functions studies. This work is focused on the research of linguistic tasks errors pattern recognition for children of 7-10 y.o. Machine learning algorithms were applied for EEG data analysis.

Key words: EEG, machine learning

УДК 612.821

ПОТЕНЦИАЛЫ СРЕДНЕГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗВАННЫЕ
РАЗЛИЧНЫМИ ЗВУКОВЫМИ СТИМУЛАМИ: АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ
СЛУЧАЕВ

**А.О.Канцерова¹, Л.Б.Окнина¹, Машеров Е. Л.², Подлепич В. В.²,
Вологодина Я. О.², Ланге А.М.³, Зибер И.А.⁴, Пицхелаури Д. И.²**

*¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

*²ФГАУ “Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
имени академика Н.Н. Бурденко” Минздрава России, Москва, Россия.*

³АНОО ВО “Сколковский институт науки и технологий”, Москва, Россия.

*⁴ФГАОУ ВО “Национальный исследовательский университет “Высшая школа
экономики””, Москва, Россия.*

E-mail: anna.kantserova@gmail.com

Ключевые слова: человек; средний мозг; вызванные потенциалы; простой тон;
слог

Аннотация: Настоящая работа представляет собой анализ потенциалов ствола головного мозга человека, регистрируемых в ответ на простые и составные тоны, а также лексические стимулы. Активность среднего мозга регистрировалась во время интраоперационного мониторинга. Регистрирующие электроды временно устанавливались в водопровод мозга. Было выявлено два

типа паттернов электрофизиологической активности: комплекс из двух коротколатентных пиков, появляющийся в начале звука и при изменении частоты тона, а также высокоамплитудный пик, появляющийся после окончания звучания стимула. Комплекс из двух коротколатентных пиков предположительно отражает проведение сигнала по слуховым волокнам среднего мозга, а высокоамплитудный пик может быть связан с обработкой полученного слуховыми структурами ствола мозга сигнала.

Подкорковые сенсорные структуры ранее рассматривались только как нервный путь от периферии к коре головного мозга [1]. Однако сейчас уже обсуждается способность обрабатывать информацию на каждом этапе восходящего слухового пути [2].

Первые попытки получить и оценить нейронную реакцию ствола головного мозга человека в ответ на слуховые стимулы были предприняты 50 лет назад [3]. Акустические стволовые вызванные потенциалы (АСВП), регистрируемые с кожи головы в ответ на щелчки, использовались в клинике для неинвазивной оценки активности слуховых структур ствола головного мозга человека. В последние несколько десятилетий шум и тона, сложные синтезированные звуки, звуки речи и слоги были предложены в качестве стимулов для изучения того, как ствол мозга обрабатывает временные и частотные особенности звука. Тем не менее, записи стволовых потенциалов со скальпа имеют значительные недостатки. Для их измерения обычно используют многочисленные повторения идентичных коротких звуковых стимулов, из-за которых теряется внимание и возникает нейронная адаптация [4]. Более того, предположение, что сигнал, зарегистрированный на скальпе, генерируется в стволе головного мозга, не имеет строгих эмпирических доказательств [5].

Глубинные электроды решили бы большинство этих проблем, но до сих пор нет исследований такого рода. Запись потенциалов из глубинных структур мозга человека возможна только в особых случаях, а единственным способом

регистрации активности ствола головного мозга человека без влияния активности коры больших полушарий является запись глубинных потенциалов во время нейрохирургической операции у пациентов, находящихся в состоянии анестезии. Этот вид записи может выполняться во время интраоперационного мониторинга (ИОМ), проводимого с целью контроля функциональной безопасности структур, расположенных в непосредственной близости от зоны хирургического вмешательства.

Настоящая работа представляет собой анализ потенциалов ствола головного мозга человека, регистрируемых в ответ на простые тоны, последовательности простых тонов, а также лексические стимулы - отдельные слоги. Регистрация выполнена в рамках ИОМ. Регистрацию проводили с помощью макроэлектрода, который временно устанавливался в водопровод мозга.

Методика: Исследуемая группа состояла из 6 взрослых пациентов с опухолью четвертого желудочка или задней части третьего желудочка. Перед операцией пациенты подписывали письменное информированное согласие на проведение расширенного ИОМ, включающего данную регистрацию. Исследование проводилось во время операции, когда пациенты находились в состоянии анестезии.

Глубинный электрод состоял из трех металлических кольцевых контактов шириной 3 мм, закреплённых на пластиковой трубке. Контакты были прикреплены к дистальному концу провода на расстоянии 6,5 мм друг от друга. Два наиболее дистальных контакта были записывающими, а проксимальный – референтным. Заземляющий электрод располагался в проекции левого плечевого сустава.

В качестве стимулов использовались:

1. простые синусоидальные тоны частотой 600, 800, 1000, 2000, 4000 Гц и длительностью 100 мс;

2. последовательности простых синусоидальных тонов, состоящих из участков частотой 600, 800, 1000, 2000, 4000 Гц и встречающиеся в случайной последовательности, длительностью 350 мс;

3. лексические стимулы (слоги и гласные звуки) длительностью от 380 до 455 мс.

Все стимулы были представлены в псевдослучайном порядке, с одинаковой вероятностью появления. Для точной синхронизации звуковых колебаний стимула с электрическими реакциями мозга на электроэнцефалографе был выведен отдельный канал записи, регистрирующий электрические колебания аудиосигнала.

После визуальной оценки качества сигнала биопотенциалы подвергались фильтрации 2-500 Гц. Для наиболее точного нахождения начала стимулов, был разработан специальный алгоритм, который использовал записи аудиоканала регистратора. Вызванные потенциалы (ВП) были получены путем усреднения 25 маркеров начала стимула. Полученный ВП включал предстимульный интервал 100 мс и 600 мс после начала звучания стимула. В качестве контроля были рассчитаны псевдо-ВП. Для этого были выбраны участки записи без звуковых стимулов, и случайным образом размещены 25 маркеров, относительно которых проводилось усреднение. Потенциалы мозга были проанализированы с помощью MATLAB (R2015b, Math Works, США) Brainstorm toolbox.

Результаты: Анализ ВП ствола мозга человека, вызванных в ответ на простые тоны выявил наличие одного комплекса коротколатентных пиков на восходящем фронте тонов частотой 600, 800, 1000 Гц (рис 1 А) и двух комплексов коротколатентных пиков на восходящем фронте тонов частотой 2000 и 4000 Гц (рис 1 Б). В последовательностях на каждую смену тона приходилось по одному комплексу коротколатентных пиков (рис 1 В). Медиана латентностей этих комплексов составляла от 7,6 мс (IQR=1,2 мс) от начала тона.

Такие же комплексы коротколатентных пиков появлялись после начала гласных звуков и в слогах, а затем повторялись на протяжении всего звучания (рис 1 Г). Описанные данные говорят в пользу того, что комплекс из двух коротколатентных пиков отражает проведение сигнала по слуховым волокнам среднего мозга.

После окончания звучания всех рассматриваемых звуковых стимулов следовал высокоамплитудный пик, имеющий медианную латентность для простых тонов 33,3 мс от окончания стимула (IQR=5,5 мс) (рис 1 А, Б), а для последовательностей – 27 мс (IQR=15,4 мс) от окончания стимула (рис 1 В). На ВП, записанных на слоги, высокоамплитудный длиннолатентный пик следовал сразу после последнего комплекса коротколатентных пиков, что позволяет предположить, что данный пик связан с обработкой полученного слуховыми структурами ствола мозга сигнала (рис 1 Г).

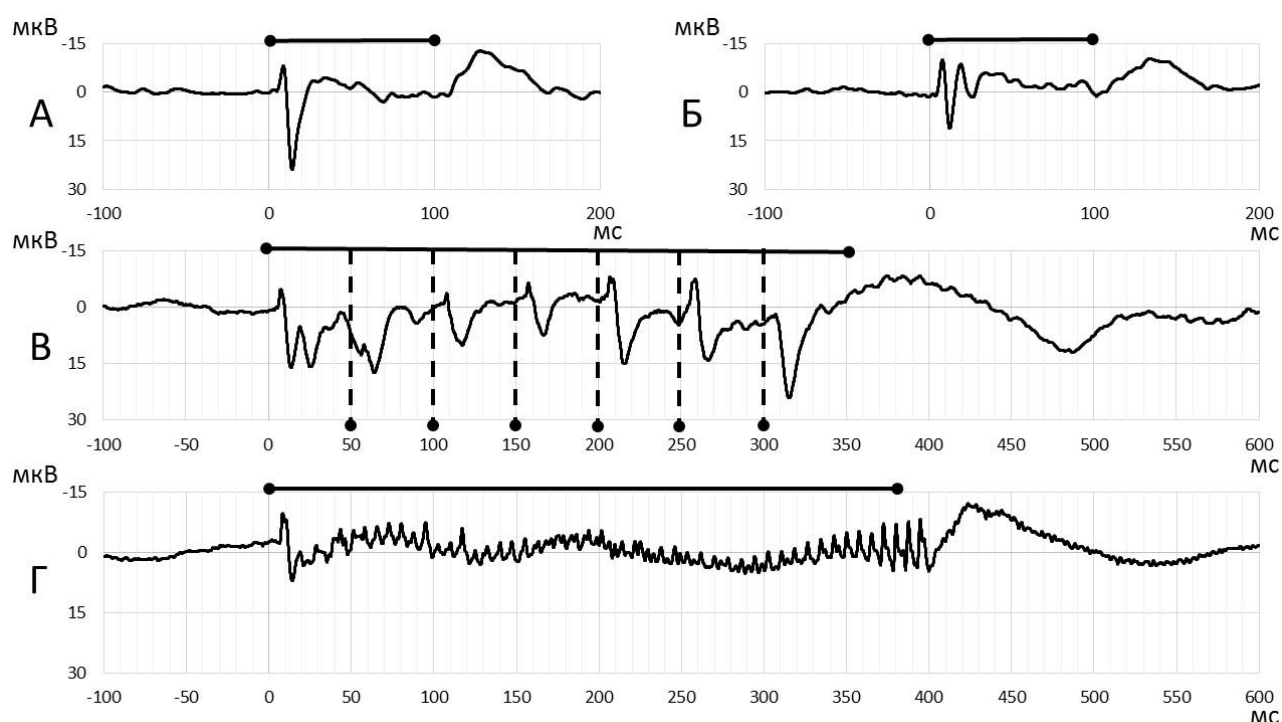


Рис 1. Вызванные потенциалы с глубинного электрода, записанные в ответ на простые тоны (А-600 Гц, Б – 4000 Гц), составной тон (В) и лексический стимул (Г – гласная “О”). Отрезки над графиками обозначают длительность звучания

звукового стимула, а пунктирные вертикальные линии – смену частоты тона в последовательности.

Заключение: ВП, зарегистрированные от ствола головного мозга человека в ответ на простые тоны, последовательности тонов, слоги и гласные звуки включают два типа паттернов электрофизиологической активности: комплекс из двух коротколатентных пиков и высокоамплитудный пик, появляющийся после окончания звучания стимулов. Комплекс из двух коротколатентных пиков предположительно отражает проведение сигнала по слуховым волокнам среднего мозга, а высокоамплитудный пик может быть связан с обработкой полученного слуховыми структурами ствола мозга сигнала.

Литература

1. Walzl E.M. Representation of the cochlea in the cerebral cortex // *Laryngoscope*. 1947. № 12(57). С. 778–787. DOI:10.1288/00005537-194712000-00003.
2. Shen L., Zhao L., Hong B. Frequency-specific adaptation and its underlying circuit model in the auditory midbrain // *Frontiers in Neural Circuits*. 2015. № OCT(9). DOI:10.3389/fncir.2015.00055.
3. Jewett D.L., Williston J.S. Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans // *Brain*. 1971. № 4(94). С. 681–696. DOI:10.1093/brain/94.4.681.
4. Forte A.E., Etard O., Reichenbach T. The human auditory brainstem response to running speech reveals a subcortical mechanism for selective attention // *eLife*. 2017. (6). DOI:10.7554/eLife.27203.
5. Chandrasekaran B., Kraus N. The scalp-recorded brainstem response to speech: Neural origins and plasticity // *Psychophysiology*. 2010. № 2(47). С. 236–246. DOI:10.1111/j.1469-8986.2009.00928.x.

POTENTIALS OF HUMAN MIDBRAIN CAUSED BY VARIOUS SOUND STIMULI: ANALYSIS OF CLINICAL CASES

Kantserova A.O.¹; Oknina L.B.¹; Masherov E.L.²; Podlepich V.V.²; Vologdina Y.O.²; Lange A.M.³; Inna Sieber⁴; Pitskhelauri D.I.²

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *National Medical Research Center of Neurosurgery named after Academician N.N. Burdenko, Ministry of Health, Moscow, Russia*

³ *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia*

⁴ *National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia*

Abstract: The current study represents an analysis of the human brainstem potentials evoked to simple and compound tones, as well as lexical stimuli. Deep biopotentials were recorded together with the intraoperational monitoring of the functional safety of the structures of the midbrain. For this purpose, a macroelectrode was temporarily

installed directly into the cerebral aqueduct. Two types of electrophysiological activity patterns were detected on the recordings of evoked potentials: a complex of two short-latency peaks and a high-amplitude peak that appears after the end of sound stimulus. The complex of two short-latency peaks presumably reflects the signal conduction along the auditory fibers of the midbrain, and the high-amplitude peak may be associated with the processing of the signal received by the auditory structures of the brainstem.

Key words: human, midbrain, evoked potentials, pure tone, lexical stimuli

УДК 612.822

ВЛИЯНИЕ СУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ
КАИНАТА, НА ЭКСПРЕССИЮ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЦИТОКИНОВ В МОЗГЕ КРЫС

Карань А.А.¹, Спивак Ю.С.¹, Сулейманова Л.М.¹, Виноградова Л.В.¹,
Большаков А.П.¹

¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.

E-mail: akartar.n@gmail.com

Аннотация: В данной работе мы использовали модель эпилептических судорог, индуцированных односторонней внутригиппокампальной инъекцией каината, для анализа временной динамики нейровоспаления и влияния на него экзогенных модуляторов эндоканнабиноидных рецепторов. Нейровоспаление оценивалось по уровню экспрессии ряда про- и противовоспалительных цитокинов, измеренному с помощью ПЦР в реальном времени, в ипсилатеральном вентральном гиппокампе, дорсальной и вентральной частях контралатерального гиппокампа, неокортексе, твердой мозговой оболочке, кортикальных оболочках, гиппокампальной оболочке и селезенке. Мы

обнаружили, что судороги, вызванные введением каината, приводят к относительно быстрому развитию нейровоспаления в обеих частях контралатерального гиппокампа, которое почти полностью прекращается через 24 часа. В неокортексе же усиление нейровоспалительного ответа наблюдалось только через 24 часа. Как активация, так и ингибирование каннабиноидных рецепторов приводили к усилению нейровоспаления, однако усиливающий эффект активации наблюдался преимущественно в неокортексе, тогда как эффект ингибирования был сильнее в гиппокампе. Наши данные говорят о том, что нейровоспалительный ответ по-разному регулируется модуляторами каннабиноидных рецепторов в неокортексе и гиппокампе.

Ключевые слова: эпилепсия, нейровоспаление, каиновая кислота (каинат), эндоканнабиноидная система

Одно из определений эпилепсии звучит так: «Хроническое состояние мозга, которое характеризуется устойчивой предрасположенностью к возникновению эпилептических приступов и нейробиологическими, когнитивными, психологическими и социальными последствиями». Данное определение носит общий характер, но за ним скрывается множество состояний, и этиология, и симптоматика, и механизмы эпилептогенеза которых могут значительно отличаться, что затрудняет создание единой модели заболевания. Для преодоления данного препятствия в рамках моделирования осуществляется выбор конкретного типа эпилепсии и его проявления(-ий): электрофизиологического, морфологического (в основном нейродегенерации) и судорожного [1, 2]. В данной работе используется модель эпилептического статуса с введением каиновой кислоты (КА), где воспроизводятся аспекты судорожной активности и нейродегенерации. Воспроизведение сразу двух аспектов сближает каинатную модель именно с заболеванием под названием “эпилепсия”.

Одним из нейробиологических последствий, вызываемых хроническим состоянием мозга, характеризующимся устойчивой предрасположенностью к возникновению эпилептических приступов, в настоящее время считается нейровоспаление. Нейровоспаление – это реакция центральной нервной системы (ЦНС) на различные нарушения, такие как инсульт, травма, инфекция, аутоиммунные заболевания, стресс и повышенная возбудимость нейронной сети, например, во время судорог. Такая реакция включает в себя биосинтез и высвобождение молекул с воспалительными свойствами клетками мозга, в основном активированной микроглией и астроцитами, а также нейронами и клетками сосудистой сети мозга [3, 4, 5].

В настоящее время в рамках исследования нейровоспаления, характерного для многих патологических состояний, рассматривается, в частности, влияние на него эндоканнабиноидной системы (ЭКС) [6], однако, в исследованиях, посвященных эпилепсии, основное внимание сосредоточено на том, как модуляция ЭКС влияет на сетевую нейрональную активность за счет изменения свойств синапсов (возбуждающих и тормозных) через CB1 рецепторы, а связи с нейровоспалением посвящено лишь небольшое количество исследований [7].

Целью данной работы является выявление изменений экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, индуцируемым судорожной активностью, вызванной введением каината, и их связи с активацией каннабиноидных рецепторов.

Методика: У крыс массой 200-300 г линии Wistar в тканях (вентральном отделе левого гиппокампа (VHL), дорсальном отделе правого гиппокампа (DHR), вентральном отделе правого гиппокампа (VHR), правой соматосенсорной коре (C), правой твердой мозговой оболочке (DMR), кортикальных оболочках правого полушария, представляющих собой

неразделенные паутинную и мягкую мозговые оболочки (CMR), правой гиппокампальной оболочке (HMR) и селезенке (Spleen)) определялась относительные концентрации мРНК с помощью ПЦР в реальном времени следующих генов: Osbp, Ywhaz и Hprt (гены «домашнего хозяйства» в качестве нормировочных), Il1b, Il6, Cx3cl1, Ccl2, Tgfb1, Zc3h12a, Tnfa (гены маркеров воспаления) и Cnr1, Cnr2 (гены каннабиноидных рецепторов). Образцы собирались через 3 часа или через 24 часа после односторонней внутригиппокампальной инъекции каината или физиологического раствора свободноподвижному животному через установленную за 2 недели направляющую канюлю. Крыс, которым за час до инъекции каината внутривентрикулярно вводили агонист CB1 и CB2 (WIN55,212-2) или обратный агонист CB1 (AM251), декапитировали через 24 часа после инъекции каиновой кислоты.

Исследование включало следующие экспериментальные группы, где N - число животных в группе:

1. Крысы, инъецированные физиологическим раствором и декапитированные через 3 часа после инъекции (контроль для 2-й группы, N = 9)
2. Крысы, инъецированные каинатом и декапитированные через 3 часа после инъекции (N = 10)
3. Крысы, инъецированные физиологическим раствором и декапитированные через 24 часа после инъекции (контроль для 4-й группы, N = 8)
4. Крысы, инъецированные каинатом и декапитированные через 24 часа после инъекции (N = 8)
5. Крысы, инъецированные каинатом и декапитированные через 24 часа с предварительным введением 5% ДМСО + 0,5% Tween-80 (контроль для 6-й и 7-й групп, N = 9)

6. Крысы, инъецированные каинатом и декапитированные через 24 часа с предварительным введением WIN55,212-2 (N = 8)
7. Крысы, инъецированные каинатом и декапитированные через 24 часа с предварительным введением AM251 (N = 9)

Результаты: Достоверное увеличение экспрессии по сравнению с контролем через 3 часа после инъекции каината показано в вентральном левом гиппокампе (т.е. ипсилатеральном) и дорсальном правом гиппокампе (т.е. контралатеральном) для генов *Ccl2*, *Tgfb1*, *Zc3h12a*, *Il1b*, *Il6*, *Cx3cl1*, *Tnfa*, в вентральном правом гиппокампе (контралатеральном) повышается экспрессия тех же генов, за исключением *Zc3h12a* и *Il6*. Также слабое воспаление наблюдается и в гиппокампальной оболочке, где через 3 часа после инъекции растет относительное количество мРНК *Ccl2*. Через 24 часа и в ипсилатеральном гиппокампе, и в обоих отделах контралатерального гиппокампа сохраняется только повышенная экспрессия *Ccl2*, а в дорсальном правом гиппокампе экспрессия *Cx3cl1* даже снижается по сравнению с контрольными животными. В гиппокампе экспрессия каннабиноидных рецепторов оказывается достаточно устойчивой к воздействию каината, растет лишь относительное количество мРНК *Cnr2* через 24 часа в левом вентральном гиппокампе.

В случае соматосенсорной коры ситуация значительно отличается от наблюдаемой при исследовании гиппокампа. Через 3 часа после инъекции каината наблюдается лишь повышение экспрессии *Ccl2*, которое сохраняется и через 24 часа. Однако через 24 часа после инъекции в коре повышается экспрессия и множества других маркеров воспаления: *Tgfb1*, *Zc3h12a*, *Il1b*, *Cx3cl1*, а также растет относительное количество мРНК обоих каннабиноидных рецепторов: *Cnr2* и *Cnr1*. В кортикальных же оболочках экспрессия исследуемых маркеров воспаления через 3 часа достоверно не менялась, и лишь экспрессия *Cnr2* достоверно выросла через 24 часа после инъекции.

Было обнаружено, что агонист каннабиноидных CB1 и CB2 рецепторов WIN55,212-2 через 24 часа после введения каината в коре и кортикальных оболочках приводит к достоверному увеличению уровням РНК генов *Tnfa* и *Ccl2*, а также наблюдается тенденция к росту экспрессии *Tgfb1* ($p = 0.0830$ и 0.0927 , соответственно). В то время как в правом вентральном гиппокампе наблюдалась тенденция падения его экспрессии ($p = 0.0663$) под воздействием агониста. В коре была выявлена тенденция ($p = 0.0830$) роста экспрессии *Cnr1*. После введения же обратного агониста CB1 рецептора AM251 достоверные различия концентраций мРНК были обнаружены лишь в правом дорсальном гиппокампе, в котором наблюдается рост экспрессии *Il1b* и *Zs3h12a*, однако, в селезенке под воздействием обратного агониста экспрессия *Il1b* падает. Также наблюдались тенденции падения экспрессии *Cx3cl1* в коре ($p = 0.0592$), роста экспрессии *Zs3h12a* в правом вентральном гиппокампе ($p = 0.0907$) и падения в коре ($p = 0.0712$).

Заключение: Индукция эпилептического статуса путем внутригиппокампального введения каината приводит к интенсивному нейровоспалительному ответу через 3 часа в обоих гиппокампах (более сильному в ипсилатеральном гиппокампе), менее интенсивному в гиппокампальных оболочках (повышению экспрессии лишь *Ccl2*) и ослаблению воспалительного ответа через 24 часа; повышенной остается лишь экспрессия *Ccl2* в обоих гиппокампах. В соматосенсорной коре же через 3 часа наблюдается слабый нейровоспалительный ответ (повышение экспрессии лишь *Ccl2*), через 24 часа детектируется значительное повышение экспрессии множества как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, что говорит о более поздней воспалительной реакции в соматосенсорной коре, чем в гиппокампе. Активация CB1 и CB2 рецепторов с помощью WIN55,212-2 привела к усилению воспалительного ответа в соматосенсорной коре и кортикальных оболочках через 24 часа после инъекции каината. Блокада CB1

рецепторов также привела к усилению нейровоспаления в дорсальном контралатеральном гиппокампе через 24 часа после инъекции каината. Эти данные говорят о том, что после судорог, индуцированных внутригиппокампулярным введением каината, воспалительный ответ в гиппокампе и неокортексе по-разному модулируется эндоканнабиноидной системой.

Литература:

1. Engel J. Jr, International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology // *Epilepsia*. 2001. Vol. 42, № 6. P. 796–803.
2. Fisher R.S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy // *Epilepsia*. 2014. Vol. 55, № 4. P. 475–482.
3. Vezzani A. et al. Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures // *J. Neurosci*. 1999. Vol. 19, № 12. P. 5054–5065.
4. Vezzani A., Lang B., Aronica E. Immunity and Inflammation in Epilepsy // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2015. Vol. 6, № 2. P. a022699.
5. Vezzani A. et al. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures // *Brain Behav. Immun*. 2011. Vol. 25, № 7. P. 1281–1289.
6. Walter L., Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation // *Br. J. Pharmacol*. 2004. Vol. 141, № 5. P. 775–785.
7. Cheung K.A.K. et al. The Interplay between the Endocannabinoid System, Epilepsy and Cannabinoids // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20, № 23.

THE EFFECT OF CONVULSIVE ACTIVITY INDUCED BY PENTYLENETETRAZOLE OR KAINATE ON THE EXPRESSION OF PRO AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN RAT BRAIN

**Karan A.A.¹, Spivak Y.S.¹, Suleymanova E.M.¹, Vinogradova L.V.¹, Bolshakov
A.P.¹**

Abstract: In our study, we used a model of seizures induced by unilateral intrahippocampal injection of kainate to analyze the time course of neuroinflammation and modulatory effects of exogenous modulators of endocannabinoid receptors. Neuroinflammation was evaluated by expression level of a number of pro- and anti-inflammatory cytokines in the ipsilateral ventral hippocampus, contralateral dorsal and ventral hippocampus, neocortex, dura mater, cortical meninges, hippocampal meninges and spleen, which was measured by qPCR. We found that kainate-induced seizures lead to relatively rapid development of neuroinflammation in both contralateral hippocampal parts which almost completely ceased in 24 h. In the neocortex, enhancement of neuroinflammatory response was observed only in 24 h. Both activation and inhibition of cannabinoid receptors led to enhancement of neuroinflammation, however, the enhancing effect of activation was observed predominantly in the neocortex, whereas the effect of inhibition was stronger in the hippocampus. Our data suggest that neuroinflammatory response is differently regulated by modulators of cannabinoid receptors in the neocortex and hippocampus.

Key words: epilepsy, neuroinflammation, kainic acid (kainate), endocannabinoid system

УДК [612.821](#)

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ МЮ-РИТМА ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН ПРИ НАБЛЮДЕНИИ И ВЫПОЛНЕНИИ МОТОРНЫХ ЖЕСТОВ

Катермин Н. С., Гуляева А.С., Каримова Е.Д.

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: e.d.karimova@gmail.com

Аннотация: Социальное поведение человека тесно взаимосвязано с активацией зеркальной системы мозга (ЗСМ). Исследование направлено на выявление факторов, влияющих на уровень активации ЗСМ у здоровых взрослых женщин при наблюдении и повторении моторных действий и социальных жестов. Использовали регистрацию ЭЭГ во время функциональных проб и психологические шкалы.

Ключевые слова: зеркальная система мозга; мю-ритм; гендерные особенности; эмпатия.

Функционирование зеркальной системы мозга (ЗСМ) тесно связано с социальным поведением человека. Зеркальная система мозга — система нейронных ансамблей, активирующаяся при социальном взаимодействии индивида так, что наблюдаемые и выполняемые индивидом действия и жесты «проецируются» в схожих корковых и подкорковых представлениях: в моторной, премоторной, префронтальной коре, островке, амигдале и гиппокампе [1]. Зеркальная система мозга была выявлена в 1996 году группой ученых во главе с Д. Риццолатти в премоторной коре приматов [2]. Согласно дальнейшим проведенным исследованиям, функции ЗСМ относятся не только к наблюдению и «проецированию» сенсомоторных стимулов, но и к высшим

психическим процессам: пониманию намерений, эмоций, стратегий мышления другого субъекта, сопереживанию (как части концепции эмпатии), подражанию и обучению. Отдельные исследования направлены на выявление нейробиологического основания такого социо-психологического конструкта, как эмпатия. Психологами еще до открытия ЗСМ был выявлен лежащий в основе эмпатии и социального поведения процесс подражания и ментальной обработки информации о поведении других людей [3]. Также была выявлена взаимосвязь ЗСМ с формированием социальных навыков индивида в том числе в процессе обучения и взросления.

Исследования показывают, что зеркальная система мозга модулирует сенсомоторный мю-ритм ЭЭГ [4-5], что позволяет использовать его для измерения и оценки активности ЗСМ при социальном взаимодействии респондентов. Так, исследования ЗСМ говорят о большей активности данной сети у людей с выраженной эмпатией. Существуют данные о том, что введение окситоцина, который играет решающую роль в формировании родительского поведения, повышало десинхронизацию мю-ритма, а следовательно, и активность ЗСМ [6].

На сегодняшний день наблюдается множество работ, исследующих нейрофизиологические особенности ЗСМ у пациентов с аутизмом, шизофренией, болезнью Паркинсона, а также у здоровых детей [3, 5]. Однако отсутствуют исследовательские работы, выявляющие гендерные, социокультурные и психофизиологические различия в функционировании ЗСМ у взрослых здоровых людей.

В представленной работе мы сосредоточились на выявлении факторов, определяющих нейрофизиологические особенности активации ЗСМ и, как следствие, уровень десинхронизации сенсомоторного мю-ритма ЭЭГ у

здоровых женщин при наблюдении и повторении моторных действий и социальных жестов.

Методика: В исследование вошли данные 30 женщин от 23 до 39 лет.

Критерии включения: оконченное высшее образование, занятость полная или частичная (от 20 часов в неделю).

Критерии исключения: время от последних родов менее 2 лет, грудное вскармливание в настоящий момент или завершённое менее полугода назад, травмы головы, обмороки, судороги, постоянные головные боли, серьезные неврологические расстройства, приём нейрорепрессивных препаратов, высокий уровень депрессии (более 30 по шкале Бека).

На этапе отбора женщины удалённо проходили анкетирование, далее, если по формальным условиям отбора респонденты подходили для исследования, они приглашались в ИВНД и НФ РАН для инструментального исследования. В день эксперимента женщины заполняли психологические и социально-демографические опросники, которые включали шкалу депрессии Бека, шкалу личностной и ситуационной тревожности Спилбергера, шкалу эмоционального интеллекта Холла, шкалу эмпатии Дэвиса, а также вопросы, касающиеся социального положения и состава семьи.

Нейрофизиологическое исследование включало в себя регистрацию 32 канальной ЭЭГ (Brain Products GmbH, Германия) в состоянии покоя и при наблюдении и повторении социальных жестов и простых моторных актов, предъявляемых с помощью видеороликов. Экспериментальная парадигма состояла из 3 видео-блоков: демонстрация движений мужчиной, женщиной и ребёнком. В каждом из трёх блоков испытуемым было последовательно предложено наблюдение статичной картины демонстратора и три вида задач (tasks): наблюдение за движением, самостоятельный повтор увиденного

движения, выполнение движение вместе с демонстратором. При этом использовали четыре типа движений – простой моторный акт (сжатие кисти), движение на запоминание (проба кулак-ребро-ладонь), целенаправленный моторный акт (перемещение мячика в коробку и обратно), эмоциональный социальный жест (хлопки). Перед каждым циклом «наблюдение-повторение-выполнение вместе» записывались фоновые фрагменты (baseline), когда испытуемые смотрели на фоновый светло-бежевый экран монитора. Каждая проба длилась 10 секунд.

Обработка и анализ ЭЭГ осуществлялся с помощью бесплатного пакета MNE Open-source Python package (<https://mne.tools/stable/index.html>). Предварительно все файлы по каждому респонденту «сшивались» в один массив, данные фильтровались (low-pass 40 Гц, high-pass 4 Гц), вычислялись независимые компоненты ICA с помощью алгоритма Infomax, затем после очищения от артефактов использовалось быстрое Фурье-преобразование для вычисления мощностей спектров в диапазоне 8-13 Гц отдельно для каждой пробы, по всем компонентам и каналам ЭЭГ. Для статистического анализа отбирались каналы, расположенные над моторной корой: C3, C4, Cz, FC1, FC2, FC5, FC6. Для оценки уровня десинхронизации мю-ритма рассчитывали относительные изменения мощности сигналов в децибелах: $10\text{LOG} (P \text{ task}/ P \text{ baseline})$. Статистический анализ осуществлялся с помощью программы Statistica 10 StatSoft©.

Результаты: Критерий χ^2 подтвердил нормальность распределения значений относительной мощности мю-ритма в центральных отведениях, в связи с чем в дальнейшем использовали дисперсионный анализ ANOVA повторных измерений (последовательность проб наблюдение-повторение-выполнение вместе) с учётом таких факторов как: демонстратор (male/female/child), возраст (до 30 лет/после 30 лет), наличие детей, фаза менструального цикла, уровень

депрессии, уровень личной и ситуативной тревожности, уровень эмпатии и эмоционального интеллекта. Предварительно ответы по психологическим опросникам были обработаны, полученные баллы переведены в категории высокий/низкий уровень.

Наименьший уровень десинхронизации мю-ритма в центральных отведениях происходил при наблюдении движений ($\text{mean} \pm \text{SD}$: $-0,98 \pm 2,70$ дБ), наибольший – при совместном выполнении движений ($-2,12 \pm 2,50$ дБ), наблюдение статичной фотографии демонстратора практически не вызывало десинхронизацию мю-ритма ($-0,27 \pm 2,11$ дБ).

Наблюдение, повторение и совместное выполнение сжимания кисти и движения на запоминание «кулак-ребро-ладонь» вызывало значимо большую десинхронизацию мю-ритма, чем перемещение мячика и хлопки в ладоши ($F(6, 4752)=6.57$, $p<0.001$, пост-хок критерий Тьюки, $p<0.05$).

В свою очередь фаза цикла и наличие у женщины детей влияет на уровень десинхронизации сенсомоторного мю-ритма: во время менструации и овуляции у женщин достоверно меньше степень десинхронизации мю-ритма (рис. 1), чем во время фолликулярной и лютеиновой фазы (попарно для каждой задачи, тест Тьюки, $p<0,05$).

Дисперсионный анализ с учётом фактора наличия детей у женщин выявил достоверное влияние этого статуса на степень десинхронизации мю-ритма ($F(2, 4756)=19.8$, $p<0.001$) при повторении и совместном выполнении движений (критерий Тьюки, $p<0,05$), (рис.2).

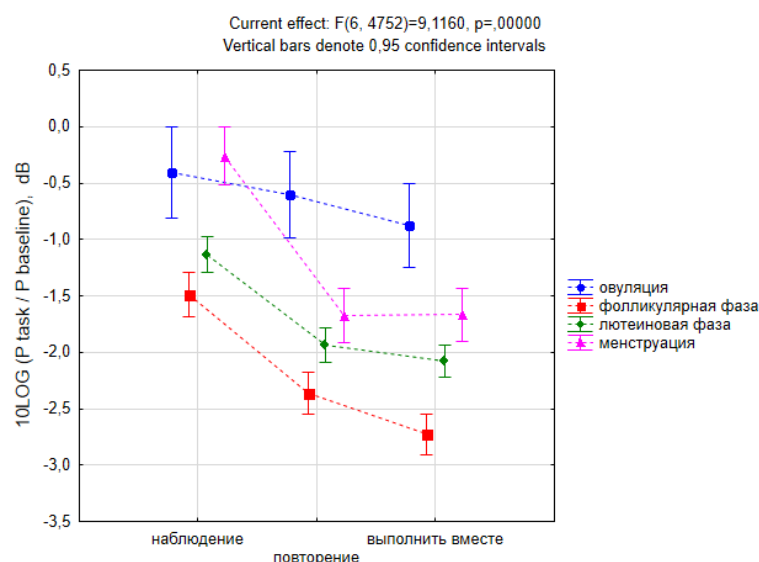


Рис. 1. Степень десинхронизации мю-ритма в дБ у женщин в разные фазы менструального цикла при наблюдении, повторении и совместном выполнении моторных задач.

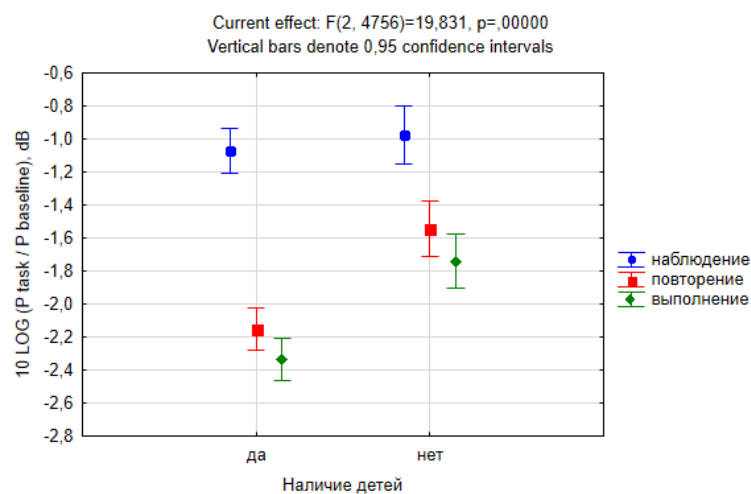


Рис. 2. Степень десинхронизации мю-ритма в дБ у женщин с детьми и без детей. Возраст респонденток, также как и уровень тревожности и депрессии никак не влиял на степень десинхронизации мю-ритма: достоверных отличий выявлено не было.

Заключение: было выявлено статистически значимое влияние фазы менструального цикла и наличия детей на степень десинхронизации мю-ритма ЭЭГ и, соответственно, на уровень функциональной активности моторной коры.

Литература:

1. Campbell M.E.J., Mehrkanoon S., Cunnington R. Intentionally not imitating: Insula cortex engaged for top-down control of action mirroring. // *Neuropsychologia*. – 2018 – 111 – PP. 241–251. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2018.01.037.
2. Gallese V., Fadiga L., Fogassi L., Rizzolatti G. Action recognition in the premotor cortex. // *Brain*. – 1996. – V. 119 – №2 – PP. 593-609. doi: [10.1093/brain/119.2.593](https://doi.org/10.1093/brain/119.2.593).
3. Nishimura Y., Ikeda Y., Suematsu A., Higuchi S. Effect of visual orientation on mu suppression in children: a comparative EEG study with adults. // *Journal of Physiological Anthropology*. – 2018. – V. 37 – №1 – PP. 16. doi: 10.1186/s40101-018-0175-9
4. Bimbi M., Festante F., Coudé G., Vanderwert R.E., Fox N.A., Ferrari P.F. Simultaneous scalp recorded EEG and local field potentials from monkey ventral premotor cortex during action observation and execution reveals the contribution of mirror and motor neurons to the mu-rhythm. // *NeuroImage*. – 2018 – № 175 – PP. 22–31. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.03.037
5. Fox N.A., Bakermans-Kranenburg M.J., Yoo K.H., Bowman L.C., Cannon E.N., Vanderwert R.E., Ferrari P.F., van IJzendoorn M.H. Assessing human mirror activity with EEG mu rhythm: A meta-analysis // *Psychological Bulletin*. – 2016. – V. 142 – №3 – PP. 291–313. doi: [10.1037/bul0000031](https://doi.org/10.1037/bul0000031).
6. Festante F., Ferrari P.F., Thorpe S.G., Buchanan R.W., Fox N.A., Intranasal oxytocin enhances EEG mu rhythm desynchronization during execution and observation of social action: An exploratory study. // *Psychoneuroendocrinology*. – 2020. – V.111 – PP.104467. 10.1016/j.psyneuen.2019.104467

FEATURES OF THE MU-RHYTHM REACTIONS OF HEALTHY WOMEN WHEN OBSERVING AND PERFORMING MOTOR GESTURES

Katermin N.S., Gulyaeva A.S., Karimova E.D.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

Abstract: Human social behavior is closely interrelated with the activation of the mirror neuron system of the brain (MNS). The study is aimed at identifying factors that affect the level of MNS activation in healthy adult women when observing and repeating motor actions and social gestures. EEG registration and psychological testing were used as a research method.

Key words: the mirror neuron system, gender characteristics, empathy

УДК 612.825.58

НАПРАВЛЕННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИСТОЧНИКОВ ЭЭГ СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ ВОООБРАЖЕНИЯ ДВИЖЕНИЙ

Керечанин Я.В.^{1,2}, Бобров П.Д.^{1,3}

*¹ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

*²ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт, Долгопрудный,
Россия*

³ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

E-mail: kerechanin@phystech.edu

Аннотация: Для 83 записей ЭЭГ при помощи МНК выделены 4 источника электрической активности мозга, специфичные для воображения движений. У 8 из 11 испытуемых построением ВАР-модели показано наличие направленного влияния источников мю-ритма в левом и правом полушарии на источники с максимальной активностью на электродах над границей ипсилатеральных премоторных и префронтальных областей.

Ключевые слова: Интерфейс мозг-компьютер, векторная авто-регрессионная модель, метод независимых компонент, направленное взаимодействие.

ЭЭГ широко применяется не только в прикладных, но и в фундаментальных исследованиях принципов работы мозга человека. Из-за наличия объемной проводимости мозга, целесообразно представлять сигнал ЭЭГ в виде суммы активностей источников, локализованных в различных областях коры. Методы независимых компонент широко применяются для оценки таких источников и их локализации при выполнении специфических ментальных задач, однако взаимодействие, и особенно направленное взаимодействие этих источников практически не исследовано.

Целью данной работы являлся поиск источников активности мозга, специфичных для воображения движения рук, и анализ их взаимодействия для большого числа (83) экспериментальных записей ЭЭГ, полученных во время управления ИМК, основанном на воображении движений, с участием 11 здоровых испытуемых.

Методика: Для предварительной частотной фильтрации ЭЭГ применялся метод AWICA [1]. Производилось вейвлет-преобразование сигнала с использованием семейства ортогональных вейвлетов и последующее разложение преобразованного сигнала на независимые вейвлет-компоненты при помощи МНК. Затем отсеивались независимые вейвлет-компоненты, основная частота которых находилась вне заданной полосы пропускания, или активность которых концентрировалась на одном лишь электроде. Отсеянные независимые вейвлет-компоненты обнулялись, все независимые компоненты смешивались при помощи обратного МНК-преобразования в фильтрованный вейвлет-сигнал, к которому применялось обратное вейвлет-преобразование для получения фильтрованного сигнала ЭЭГ.

Выделение источников из фильтрованной ЭЭГ производилось с помощью метода независимых компонент FASTICA [2], основанного на минимизации

функции взаимной информации между компонентами. Для дальнейшего анализа были выделены источники, специфичные для воображения движений и встречающихся наиболее часто у всех испытуемых.

Для оценки частотных характеристик отобранных источников, а также для оценки их направленного и ненаправленного взаимодействия применялось построение VAR-модели выбранного ансамбля. В качестве меры ненаправленного взаимодействия использовалась функция спектральной когерентности [3], в качестве меры направленного взаимодействия – функция изолированной спектральной когерентности [4]. Данная функция, по сравнению с другими мерами взаимного влияния каналов, что важно при их масштаб не определен. Поскольку функция когерентности может принимать пороговое значение, которое характеризует наличие взаимодействия. Для этого строилась VAR-модель полученных сдвигами показаний с течением времени T. После многократного вычисления значения функции изолированной

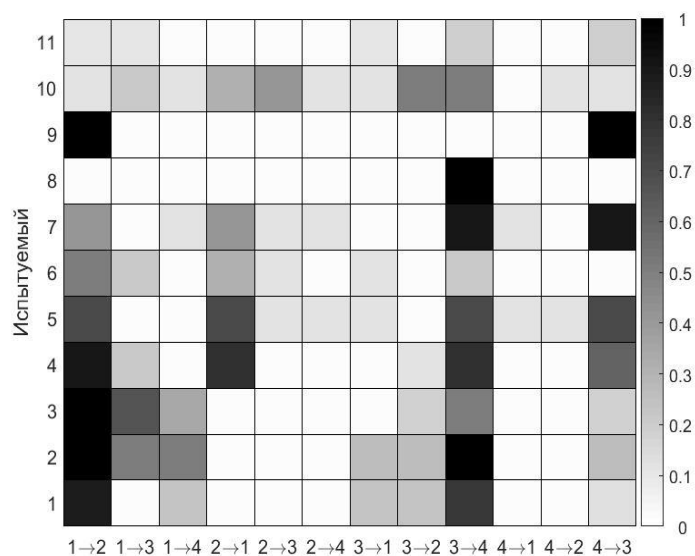


Рисунок 1. Топографические карты (черно-белые окружности), автоспектры (диагональные ячейки) и функция изолированной спектральной когерентности (недиагональные ячейки), типичные для источников 1,2,3,4. На рисунке приведены спектральные функции для трех состояний – отдыха, воображения движения левой руки, воображения движения правой руки (по убыванию яркости линии).

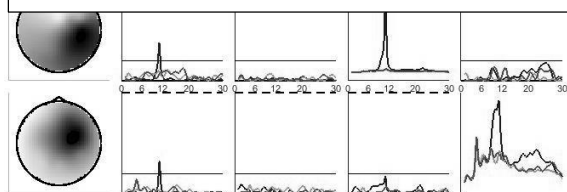


Рисунок 2. Частота выделения направленного взаимодействия, превышающего порог в 0.1 для всех попарных комбинаций источников.

Результаты: Всего было обработано 83 записи ЭЭГ для 11 здоровых испытуемых. Число записей каждого испытуемого варьировалось от 1 до 11. Наиболее специфичными для воображения движений и часто встречающимися у всех испытуемых источниками оказались четыре: источники мю-ритма в левом (1) и правом (3) полушарии и источники с максимальным вкладом в сигнал на электродах на границе премоторных и префронтальных областей левого (2) и правого полушария (4).

Эти источники были найдены в большинстве записей (92% сессий). Их типичные топографические карты, спектры и функция изолированной когерентности для 3 различных экспериментальных состояний (отдых, воображение движения левой руки, воображение движения правой руки) приведены на рис.1. Источники под номерами 1 и 3 неоднократно были локализованы с помощью решения обратной задачи ЭЭГ в предыдущих работах и находятся в глубине центральной борозды левого и правого полушарий [5]. Локализацию источников 2 и 4 предстоит установить.

Для каждой записи определялось максимальное значение функции изолированной спектральной когерентности в альфа-диапазоне (8-13 Гц) для всех 12 комбинаций источников. В качестве пороговой значимости этой функции было взято значение 0.1, что равно удвоенному максимальному

значению этой функции для альфа-диапазона (0.05), встречавшегося среди ВАР-моделей со сдвигом для каждой пары источников. На рис.2. приведена доля записей для каждого испытуемого, в которой значение функции изолированной спектральной когерентности превышало заданный порог для всех 12 комбинаций источников. Видно, что наибольшим образом выражено влияние источника 1 на источник 2 (для 8 из 11 испытуемых встречалось более чем в 40% записей) и влияние источника 3 на источник 4 (также встречалось более чем в 40% записей для 8 из 11 испытуемых). Также относительно часто встречалось влияние источника 4 на источник 3 (для 5 из 11 испытуемых более чем в 40% записей). Согласно рис.1. эти три случая относятся к внутрислобковому взаимодействию.

Обсуждение: Результаты работы подтверждают ранние наблюдения, полученные с участием 2 испытуемых. Отсутствие индивидуальных моделей головы для испытуемых делает невозможной точную локализацию источников 2 и 4, вклад которых наиболее выражен для электродов, расположенных над премоторными или префронтальными областями. Это затрудняет обсуждение природы наблюдаемого явления. Тем не менее, имеются обширные литературные данные, касающиеся специфичной активации премоторных и префронтальных областей во время воображения движений. В то время, как премоторные области могут отвечать за планирование и подготовку движения, области префронтальной коры могут принимать участие в общем планировании поведения, модулировать уровень внимания или обеспечивать работу кратковременной памяти. Полученные результаты, однако, показывают, что модуляция активности в первичных сенсомоторных областях предшествует модуляции активности префронтальных (или премоторных областей), в то время как данные о распространении альфа-ритма говорят, что это распространение направлено от высших, ассоциативных областей. Поэтому полученное направление взаимодействия может соответствовать ситуации,

когда человек концентрирует внимание на сенсорной информации при воображении движения, и механизм кинестетического воображения уже запущен или, соответственно, отключает внимание от сенсорной информации в состоянии покоя. Другой гипотезой, требующей отдельной проверки, является предположение о том, что источники 2 и 4 получаются в результате МНК-разложения одного источника, который находится в первичной сенсомоторной области и виден в ЭЭГ из-за распространения ритма по поверхности центральной борозды, что может описываться моделью поворачивающегося эквивалентного диполя. Действительно, в этой модели топография источника не может считаться неизменной, как это предполагается при применении МНК, который в данном случае может воспринимать потенциал, соответствующий разным положениям эквивалентного диполя как активность разных источников.

Литература

16. Mammone N., F. La Foresta and F. C. Morabito, "Automatic Artifact Rejection From Multichannel Scalp EEG by Wavelet ICA," in IEEE Sensors Journal, vol. 12, no. 3, pp. 533-542, March 2012, doi: 10.1109/JSEN.2011.2115236.
17. Hyvarinen A., Karhunen J., Oja E. Independent component analysis. New-York: Wiley, 2001. pp. 480.
18. Курганский А. В. Некоторые вопросы исследования корково-корковых функциональных связей с помощью векторной авторегрессионной модели многоканальной ЭЭГ // Журнал Высшей Нервной Деятельности им. И.П. Павлова. -2010 Т. 60, № 5, с. 630–649.
19. Pascual-Marqui RD, RJ Biscay, J Bosch-Bayard, D Lehmann, K Kochi, N Yamada, T Kinoshita, N Sadato. Isolated effective coherence (iCoh): causal information flow excluding indirect paths. 2014-02-21. arXiv:1402.4887 [stat.ME]. <http://arxiv.org/abs/1402.4887>.
20. Керечанин Я., Гусек Д., Бобров П., Федотова И., Фролов А. Источники электрической активности областей мозга, вовлеченных в воображение движений // Журнал Высшей Нервной Деятельности им. И.П. Павлова. – 2019. – Т. 69, № 6. – С. 711-725, doi:10.1134/S0044467719060066.

DIRECTED INTERACTION OF EEG SOURCES RESPONSIBLE FOR MOTOR IMAGINATION

Kerechanin Y.V.^{1,2}, Bobrov P.D.^{1,3}

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

³ *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

Abstract: Four sources of electrical activity of the brain, specific for motor imagery, were obtained for 83 EEG recordings using ICA. The results of VAR modelling of the source activity suggest that in 8 of the 11 subjects there is a significant directional influence of the mu-rhythm sources on the sources contributing the most into the signal on the electrodes located over ipsilateral premotor or prefrontal areas.

Key words: Independent component analysis, vector auto-regressive model, brain-computer interface, directed interaction

УДК: 534.76+534.771

ВРЕМЕННЫЕ ПОРОГИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАПРАВЛЕНИЯ ДВИЖЕНИЯ ПО АЗИМУТУ У ПАЦИЕНТОВ С СЕНСОНЕВРАЛЬНОЙ ТУГОУХОСТЬЮ

Клишова Е.А.^{1*}, Гвоздева А.П.¹, Голованова Л.Е.², Андреева И.Г.¹

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

² *Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.
Мечникова, Санкт-Петербург, Россия*

*E-mail: klishova@gmail.com

Ключевые слова: пространственный слух, локализация движущегося источника звука, азимутальное движение, временные характеристики слуха, сенсоневральная тугоухость

Аннотация: Измерены временные пороги для оценки направления движения по азимуту (ПВА) у 31 пациента с сенсоневральной тугоухостью (СНТ). Выявлены факторы, коррелирующие с увеличением порогов ПВА: величина потери слуха и возраст испытуемых для пациентов с легкой степенью СНТ, продолжительность заболевания, асимметрия порогов слуха и наличие ушного шума для пациентов с умеренной СНТ.

При СНТ изменяется речевой слух - снижается разборчивость речи, и пространственный слух - ухудшается ориентация по слуху и способность обнаруживать и выделять полезный целевой сигнал среди множества других сигналов [1]. Процесс локализации движущихся источников звука зависит от способности слуховой системы к обнаружению изменений в спектре сигнала от источника. Наиболее выраженные спектральные изменения сигнала от движущихся источников затрагивают высокие частоты [1-2]. При СНТ в первую очередь повышаются пороги слуха именно на высоких частотах, что должно приводить к ухудшению временных пороговых характеристик слуховой локализации движения. Вместе с тем, при СНТ изменяется кодирование надпороговых сигналов, может наблюдаться ухудшение временного анализа звука. Поэтому возникает вопрос о дифференциальной оценке вклада периферического и центрального компонентов СНТ в возможное снижение пороговых характеристик локализации движения.

Целью работы было оценить время, необходимое для оценки направления движения в горизонтальной плоскости по азимуту (ПВА) в группах пациентов с легкой и умеренной степенью СНТ и выявить факторы, коррелирующие с увеличением ПВА.

В обследовании принял участие 31 взрослый пациент с двусторонней симметричной сенсоневральной тугоухостью. Пациенты были разделены на две группы по степени снижения слуха: группу с легкой СНТ (15 пациентов: 3 мужчин и 12 женщин) и группу с умеренной СНТ (16 пациентов: 6 мужчин и 10

женщин). Разница в величине средних порогов слуха на частотах 0.5, 1, 2 и 4 кГц для левого и правого уха не превышала в группе с легкой СНТ 5 дБ, а в группе с умеренной СНТ – 9 дБ.

Звуковые сигналы, применявшиеся для моделирования движения источника звука в горизонтальной плоскости, представляли собой серии шумовых посылок трапецевидной формы в диапазоне частот 0.2-8.0 кГц. Длительность каждой посылки составляла 22 мс с учетом линейных фронтов нарастания и убывания амплитуды по 4 мс. Пауза между посылками равнялась 3 мс. Длительность сигналов зависела от количества посылок и составляла от 0.075 до 1.5 с. Для моделирования движения источника звука по азимутальной координате звуковые сигналы одновременно подавали на два динамических громкоговорителя, расположенных симметрично слева и справа от пациента под углом 30° каждый на расстоянии 1 м. Амплитуда посылок на протяжении звучания сигнала одновременно линейно увеличивалась на 10 дБ на одном громкоговорителе и уменьшалась на 10 дБ на другом громкоговорителе. В зависимости от баланса амплитуд сигналов на левом и правом громкоговорителе в начале звучания сигналов, такое противонаправленное линейное изменение амплитуд позволяло создавать у пациента иллюзию движения звукового образа от центральной линии головы (0° азимута) влево или вправо, или к центральной линии слева или справа. Оценку порогов по времени для определения направления движения по азимуту (ПВА) выполняли при помощи адаптивной психоакустической методики [4].

Результаты: Обе группы пациентов характеризовались большим межиндивидуальным разбросом пороговых значений: минимальный ПВА составил 0.1 с, а максимальный - 1.2 с. Для определения влияния возраста, потери слуха и продолжительности СНТ у пациентов на величину ПВА для обеих групп был выполнен линейный корреляционный анализ. В группе с легкой СНТ повышение порогов по времени ассоциировалось в основном с двумя параметрами - величиной потери слуха ($R = 0.47$ и 0.51 для левой и

правой полуплоскостей, соответственно) и, в меньшей степени, с возрастом испытуемых ($R = 0.28$ и 0.29). Продолжительность СНТ мало влияла на ПВА у этой группы пациентов. Для пациентов с умеренной СНТ была обнаружена прямая связь средней силы между продолжительностью СНТ ($R = 0.42$ и 0.56) и практически отсутствовали связи возраста и среднего порога слуха с порогом по времени. Связь между асимметрией порогов слуха и ПВА в группе пациентов с легкой степенью СНТ была слабо выражена ($R = -0.21$ и -0.20). В этой группе различия в порогах слуха на левом и правом ухе не превышали 5 дБ. Для пациентов с умеренной СНТ была выявлена прямая связь средней силы между асимметрией порогов слуха и порогом по времени ($R = 0.57$ и 0.57). При исключении из этой группы двух пациентов, у которых разница в порогах слуха для левого и правого уха превышала 5 дБ (по 9 дБ для обоих испытуемых), связь между асимметрией порогов слуха и порогом по времени, как и в группе с легкой СНТ, ослабевала ($R = 0.23$ и $R = 0.21$). Это указывало на слабое влияние небольшой (до 5 дБ) асимметрии порогов слуха на ПВА у пациентов обеих групп.

Таблица 1. Значения коэффициентов линейной корреляции (R) между индивидуальными характеристиками пациентов и величиной порогов по времени для оценки направления движения звукового образа по азимутальной координате при легкой и умеренной СНТ.

Характеристика пациентов	Легкая СНТ		Умеренная СНТ	
	Слева	Справа	Слева	Справа
Возраст	0.28	0.29	0.04	-0.14
Средняя потеря слуха	0.47	0.51	0.04	-0.06
Продолжительность СНТ	-0.11	-0.12	0.43	0.56
Абсолютное значение	-0.21	-0.20	0.57	0.57

разницы порогов слуха на левом и правом ухе (асимметрия слуха)				

У 10 человек в двух обследованных группах был выявлен ушной шум. При ушном шуме происходит изменение нейрональной активности в центральных отделах слуховой системы, а также и во внеслуховых структурах, вовлеченных в функции восприятия, эмоций, памяти и внимания [7-8]. В связи с этим мы оценили влияние наличия ушного шума на слуховое восприятие движущихся источников звука. Медианные значения порогов по времени в группе с легкой СНТ достоверно не различались у пациентов без ушного шума и с ушным шумом (0.25 и 0.30 с, соответственно). Вместе с тем, ушной шум оказывал значимое негативное влияние на величину ПВА у пациентов с умеренной СНТ: при наличии ушного шума данный порог увеличивался более чем в три раза (0,3 с без ушного шума и 1,0 с при наличии ушного шума). Таким образом, у пациентов с легкой степенью СНТ на увеличение порогов ПВА влияли такие факторы, как величина потери слуха и возраст, а у пациентов с умеренной СНТ - продолжительность заболевания, асимметрия порогов слуха и наличие ушного шума.

При легкой и умеренной СНТ диапазон, в котором варьировали индивидуальные значения ПВА, оказался одинаковым и составлял от 0.1 до 1.2 с. По 7 пациентов в каждой из групп при оценке направления движения имели величину порога 0.1 с, что соответствовало среднему значению, полученному нами ранее при норме слуха [4]. Это означает, что сама по себе потеря слуха на высоких частотах при легкой и средней степени СНТ не обязательно приводит к ухудшению ПВА [6].

Увеличение ПВА при симметричной СНТ могло быть вызвано другими причинами - нарушением надпорогового кодирования интенсивности и/или ухудшением слухового временного анализа. Надпороговое кодирование

интенсивности изменяется как следствие сужения динамического диапазона слуха при повышении порогов слышимости и ~~будет~~ становится более выраженным с увеличением потери слуха. При потере слуха до 35 дБ у пациентов не наблюдали случаев, при которых ПВА превышали бы 0.7 с, преимущественно пороги составляли 0.1-0.2 с. При большей потере слуха ПВА могли возрастать до 1.2 с. В группе с легкой степенью СНТ была выявлена связь потери слуха с величиной ПВА. Вместе с тем, даже при потере слуха около 50 дБ ПВА мог практически оставаться в норме или незначительно ее превышать. Таким образом, можно полагать, что нарушение надпорогового кодирования не влияет критическим образом на оценку динамических изменений межшумных различий по интенсивности.

Можно сделать вывод, что для быстрой оценки направления движущегося источника звука существует важный фактор, который не связан непосредственно с величиной потери слуха. В качестве такого фактора мы предполагаем нарушение временного слухового анализа, который возникает как проявление центральных нарушений слуха.

Центральные нарушения слуха могут наблюдаться при СНТ и чаще возникают при большой потере слуха и/или при значительной продолжительности заболевания [9-10]. Поэтому мы рассмотрели связь ПВА с обоими факторами. Существенный рост ПВА наблюдали у пациентов с потерей слуха более 35 дБ. У пациентов с умеренной СНТ была обнаружена прямая связь средней силы между продолжительностью СНТ и величиной ПВА, что указывает на центральные нарушения слуха как на возможную причину, по которой снижается скорость оценки движения источника звука.

Список литературы:

1. Moore B.C.J. Cochlear hearing loss: physiological, psychological and technical issues. 2- nd ed. John Wiley & Sons Ltd, 332 p.

2. Brungart, D. S., Durlach, N. I., & Rabinowitz, W. M. (1999). Auditory localization of nearby sources: II. Localization of a broadband source. *Journal of the Acoustical Society of America*, 106(4, Pt 1), 1956–1968. <https://doi.org/10.1121/1.427943>
3. Lundbeck M, Grimm G, Hohmann V, Laugesen S, Neher T (2017) Sensitivity to angular and radial source movements as a function of acoustic complexity in normal and impaired hearing, *Trends Hear.* 21: 2331216517717152. <https://doi.org/10.1177/2331216517717152>
4. Гвоздева АП, Ситдигов ВМ, Андреева ИГ (2020). Скрининговый метод оценки пространственной и временной разрешающей способности слуха при локализации движения по азимутальной координате. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова*, 106: 1170-1188. <https://doi.org/10.31857/S0869813920090113> [Gvozdeva AP, Sitdikov VM, Andreeva IG (2020). A screening method for assessment of spatial and temporal resolution of the auditory system in case of azimuthal movement localization. *Russ J Physiol* 106:1170-1188. (In Russ).]
5. Gvozdeva AP, Klishova EA, Sitdikov VM, Golovanova LE, Andreeva IG (2021) Minimal time to determine direction of azimuthally moving sounds in moderately severe sensorineural hearing loss. *POMA* 43: 050003. *Acoustical Society of America*. <https://doi.org/10.1121/2.0001451>
6. Андреева ИГ, Гвоздева АП, Огородникова ЕА (2018) Пороговая длительность звуковых сигналов для оценки приближения и удаления их источника при моделировании снижения высокочастотного слуха. *Сенс Сист* 32:277-284. <https://doi.org/10.1134/S0235009218040029> [Andreeva IG, Gvozdeva AP, Ogorodnikova EA (2018) Threshold duration of audio signals for assessment of the proximity and leaving of their source in modeling of the decrease in high-frequency hearing. *Sens Sist* 32: 277-284 (In Russ)].
7. Adjarian, P. Neuroanatomical abnormalities in chronic tinnitus in the human brain / P. Adjarian, D. Hall, A. Palmer // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 2014. – Vol. 45. – P. 119-133.
8. Ridder, D. Phantom percepts: tinnitus and pain as persisting aversive memory networks / D. Ridder, A.B. Elgoyhen, R. Romo, B. Langguth // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2011. – Vol. 108, № 20. – P. 8075-8080.
9. Musiek FE, Chermak GD (2014) *Handbook of Central Auditory Processing Disorder*, 1: Auditory Neuroscience and Diagnosis, San Diego: Plural, 2nd ed.
10. Бобошко МЮ, Гарбарук ЕС, Жилинская ЕВ, Абу-Джамеа А.Х. (2014) Временная разрешающая способность слуховой системы при сенсоневральной тугоухости. *Сенс Сист.* 28:10-15. [Boboshko MYu, Garbaruk ES, Zhilinskaya EV, Abu-Dzhamea A Kh (2014) Temporal resolution of the auditory system in sensorineural hearing loss. *Sens Sist.* 28:10-15. (In Russ)].
11. Andreeva IG, Klishova EA, Gvozdeva AP, Sitdikov VM, Golovanova LE, Ogorodnikova EA. (2020) Comparative assessment of spatial and temporal resolutions in the localization of an approaching and receding broadband noise source in healthy subjects and patients with first-degree symmetric sensorineural hearing loss. *Hum Phys.* 46: 465-472

TEMPORAL THRESHOLDS FOR DETERMINING THE DIRECTION OF
AZIMUTHAL SOUND SOURCE MOTION IN PATIENTS WITH
SENSORINEURAL HEARING LOSS

Klishova E.A.¹, Gvozdeva A.P.¹, Golovanova L.E.², Andreeva I.G.¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian
Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

²*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg,
Russia*

Abstract: Minimal time to determine direction of azimuthal motion (MTAMs) was measured in 31 patients with sensorineural hearing loss. Factors correlating with an increase in MTAMs were revealed: the magnitude of hearing loss and age for patients with mild SNHL, duration of the disease, asymmetry of the hearing thresholds, and the presence of tinnitus for patients with moderate SNHL.

Keywords: spatial hearing, moving sound source localization, azimuthal motion, temporal characteristics of hearing, sensorineural hearing loss

УДК 612.8

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ И
МЕТАБОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В ЛИТИЙ-
ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ЭПИЛЕПСИИ

**Коваленко А.А.¹, Захарова М.В.¹, Колегова П.И.^{1,2}, Дёмина А.В.¹, Шварц
А.П.¹, Зубарева О.Е.¹, Зайцев А.В.¹**

¹*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия*

²*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

e-mail: kovalenko_0911@mail.ru

Аннотация: В исследовании были получены данные об изменениях экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также генов метаботропных глутаматных рецепторов, которые могут лежать в основе развития характерных для эпилепсии нарушений памяти и поведения.

Ключевые слова: эпилепсия; рецепторы глутамата; ОТ-ПЦР; пилокарпин

Эпилепсия — распространенное (1% от мирового населения) хроническое неврологическое заболевание человека [1, 2]. В детском и подростковом возрасте эпилепсия может приводить к нарушению нормального развития мозга и последующим когнитивным дисфункциям. Особенно часто нарушения когнитивных функций встречаются у пациентов с височной эпилепсией [3]. Около 30% пациентов с височной эпилепсией страдают фармакорезистентными формами заболевания [4]. Поиск новых методов лечения затрудняет недостаточная изученность патогенетических механизмов развития эпилепсии и сопутствующих ей нарушений памяти и поведения.

Принято считать, что патогенез эпилепсии связан с нарушением баланса между тормозными и возбуждающими нейромедиаторными системами в различных отделах мозга [5]. Глутамат — основной возбуждающий нейромедиатор центральной нервной системы. Избыточное возбуждение, вызванное глутаматом при судорогах, может приводить к эксайтотоксичности и гибели клеток мозга [6, 7]. Функционирование глутаматергической системы

обусловлено работой рецепторов глутамата, которые подразделяются на два класса (ионотропные и метаботропные).

Ионотропные NMDA- и AMPA-рецепторы являются основными посредниками передачи сигнала. Длительная активация этих рецепторов играет важную роль в формировании и распространении судорожной активности [8]. Нарушение работы NMDA- и AMPA-рецепторов также может привести к дефициту когнитивной и моторной функции вследствие нарушения синаптической пластичности [9]. Нарушение функциональной активности NMDA- и AMPA-рецепторов связано с изменением их субъединичного состава. Метаботропные рецепторы глутамата модулируют работу глутаматергического синапса. К ним относится 8 подтипов рецепторов, разделенных на 3 группы. Группа I включает mGluR1 и mGluR5, данные рецепторы способствуют активации NMDA-рецепторов. Их чрезмерная активация может способствовать эксайтотоксичности. Группа II (mGluR2, mGluR3) и III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) обладают противоположным эффектом на активность NMDA-рецепторов [10, 11]. Благодаря своей модулирующей функции метаботропные рецепторы глутамата являются перспективной мишенью для разработки новых противоэпилептических препаратов. Однако, особенности экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга при развитии острых и хронических судорожных состояний исследованы недостаточно.

Целью данной работы было провести анализ пространственно-временного паттерна экспрессии генов I, II и III групп метаботропных рецепторов глутамата, а также различных субъединиц ионотропных NMDA- и AMPA-рецепторов в мозге крыс в модели хронической эпилепсии.

Методика: Для индукции судорог была использована литий-пилокарпиновая модель височной эпилепсии, для которой характерно после латентного периода развитие хронической фазы, сопровождающейся спонтанными рецидивирующими судорогами. В эксперименте были использованы крысы самцы Wistar в возрасте 7-8 недель, которым вводили р-р LiCl (в/б, 127 мг/кг), затем через 24 часа метилскополамин (в/б, 1 мг/кг), через 30 минут – пилокарпин (ПК, в/б, 20-30 мг/кг, по 10 мг/кг до достижения выраженных судорог). Контрольным животным вместо ПК вводили физиологический раствор. Для анализа были выбраны структуры мозга, предположительно участвующие в патогенезе эпилепсии и формировании сопутствующих когнитивных нарушений — гиппокамп (вентральная и дорзальная области), височная кора. Исследование изменений экспрессии генов субъединиц NMDA- (Grin1, Grin2a, Grin2b) и AMPA- (Gria1, Gria2) рецепторов и метаботропных рецепторов глутамата (Grm1, Grm2, Grm3, Grm4, Grm5, Grm7, Grm8) выполнено методом ОТ-ПЦР в реальном времени в латентную фазу (на 3 и 7 сутки после судорог) и хроническую фазу (60 суток после судорог) литий-пилокарпиновой модели.

Результаты: Экспрессия генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов снижалась во всех исследованных структурах, при чем многие изменения сохранялись через 2 месяца после индукции судорог. Изменение экспрессии гена GluN1 субъединицы NMDA-рецепторов может свидетельствовать об общем изменении числа рецепторов. В частности, ее снижение может являться одним из компенсаторных механизмов, направленных на уменьшение возбуждения мозга. Снижение продукции мРНК субъединицы GluN2a и, как следствие, соотношения GluN2a/GluN2b может свидетельствовать об увеличении доли GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов. Снижение экспрессии гена субъединицы GluA2 AMPA-рецепторов может приводить к увеличению количества Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов, что в свою

очередь приведет к усилению эксайтотоксичного действия глутамата. Возможно, эти изменения вовлечены в формирование постсудорожных нарушений памяти и поведения, которые характерны для литий-пилокарпиновой [12, 13].

В обеих областях гиппокампа выявлено повышение экспрессии гена Grm5 через 3 дня после индукции судорог, что может являться одним из факторов эпилептогенеза, так как данный рецептор относится к I группе и увеличение его экспрессии может способствовать эксайтотоксичности. В гиппокампе и височной коре было обнаружено снижение экспрессии генов Grm4, Grm2, Grm7 и Grm8, которое может приводить к уменьшению их ингибирующей активности и также вносить вклад в эпилептогенез. В то же время, экспрессия гена Grm3 была повышена, возможно, это является одним из компенсаторных механизмов. В хроническую фазу модели большая часть обнаруженных изменений экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата нивелируется.

Заключение: Таким образом, был проведен анализ изменений экспрессии генов метаботропных и ионотропных рецепторов глутамата в мозге крыс в модели хронической эпилепсии. Изменения экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата могут свидетельствовать об изменении работы данных рецепторов и приводить к развитию постсудорожных нарушений памяти и поведения. Наиболее выраженные изменения экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата выявлены в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, характер которых позволяет предположить их участие в эпилептизации мозга. Проведенное исследование способствует более глубокому пониманию функциональных патофизиологических механизмов, лежащих в основе эпилептогенеза, и может явиться основой для разработки новых фармакологических методов коррекции постсудорожных нервно-психических нарушений и предотвращения эпилептизации мозга.

Литература

1. Dupont S. Mémoire et épilepsie. // Biol. Aujourd'hui. – 2010 – Vol. 204 – № 2 – PP. 181–188. doi: 10.1051/jbio/2010005.
2. Leeman-Markowski BA, Schachter SC. Treatment of Cognitive Deficits in Epilepsy. // Neurol. Clin. – 2016 – Vol. 34 – № 1 – PP. 183–204. doi: 10.1016/j.ncl.2015.08.008.
3. Bell B, Lin JJ, Seidenberg M, Hermann B. The neurobiology of cognitive disorders in temporal lobe epilepsy. // Nature Reviews Neurology. – 2011 – Vol. 7 – № 3 – PP. 154–164. doi: 10.1038/nrneurol.2011.3.
4. Rosa DV, Rezende VB, Costa BS, Mudado F, Schutze M, Torres KC, Martins LC, Moreira-Filho CA, Miranda DM, Romano-Silva MA. Circulating CD4 and CD8 T cells expressing pro-inflammatory cytokines in a cohort of mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. // Epilepsy Res. – 2016 – Vol. 120 – PP. 1–6. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2015.11.011.
5. Lasoñ W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. // Pharmacol. Reports. – 2013 – Vol. 65 – № 4 – PP. 787–801. doi: 10.1016/S1734-1140(13)71060-0.
6. Jakaria M, Park, S-Y, Haque ME, Karthivashan G, Kim I-S, Ganesan, P, Choi D-K. Neurotoxic Agent-Induced Injury in Neurodegenerative Disease Model: Focus on Involvement of Glutamate Receptors. // Front. Mol. Neurosci., – 2018 – Vol. 11 – PP. 307. doi: 10.3389/fnmol.2018.00307.
7. Walker MC. Pathophysiology of status epilepticus. // Neurosci. Lett. – 2018 – Vol. 667 – PP. 84-91. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.044.
8. Szczurowska E, Mareš P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. // Physiol. Res. – 2013 – Vol. 62 – PP. S21-38. doi: 10.33549/physiolres.932662.
9. Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA Imbalance Following Traumatic Brain Injury. // Current Neurology and Neuroscience Reports. – 2015 – Vol. 15 – № 5. doi: 10.1007/s11910-015-0545-1.
10. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2010 – Vol. 50 – PP. 295-322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
11. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. // – 1997– Vol. 37 – PP. 205-237. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205.
12. Smolensky IV, Zubareva OE, Kalemenev SV, Lavrentyeva VV, Dyomina AV, Karepanov AV, Zaitsev AV. Impairments in cognitive functions and emotional and social behaviors in a rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. // Behav. Brain Res. – 2019 – Vol. 372 – PP. 112044. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112044>.
13. Inostroza M, Cid E, Menendez de la Prida L, Sandi C. Different emotional disturbances in two experimental models of temporal Lobe Epilepsy in rats. // PLoS One. – 2012 – Vol. 7 – № 6 – PP. 14–17. doi: 10.1371/journal.pone.0038959.

**DYNAMICS OF IONOTROPIC AND METABOTROPIC GLUTAMATE
RECEPTOR GENE EXPRESSION CHANGES IN A LITHIUM-
PILOCARPINE MODEL OF EPILEPSY**

**Kovalenko A.A.¹, Zakharova M.V.¹, Kolegova P.I.^{1,2}, Dyomina A.V., Schwarz
A.P.¹, Zubareva O.E.¹, Zaitsev A.V.¹**

*¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg,
Russia*

²Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

Abstract: The study reported changes in the expression of NMDA- and AMPA-receptor subunit genes as well as metabotropic glutamate receptor genes, which may underlie the development of the memory and behavioral disorders characteristic of epilepsy.

Key words: epilepsy; glutamate receptors; RT-PCR; pilocarpine

УДК 577.25

**АНАЛИЗ УЧАСТИЯ 3'- НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ РНК,
КОДИРУЮЩЕЙ СРЕВ БЕЛОК ORB2 DROSOPHILA MELANOGASTER, В
ФОРМИРОВАНИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПАМЯТИ**

**Козлов Е.Н.¹, Гильмутдинов Р.А.¹, Жукова М.В.¹, Schedl P.³, Токмачева
Е.В.⁴, Шидловский Ю.В.^{1,2}**

¹ФГБУН Институт биологии РАН, Москва, Россия.

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

³ Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ, USA

⁴ ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, С-Петербург, Россия

E-mail: ugin.sfu@gmail.com

Аннотация: СРЕВ белки принимают участие в формировании долговременной памяти посредством активации трансляции мРНК, локализованных в синапсах. Ранее было показано, что делеция кодирующей части гена СРЕВ белка Orb2 у мух *Drosophila melanogaster* приводит к потере долговременной памяти. Мы установили, что 3'-нетранслируемая область мРНК *orb2* также важна для нормального формирования долговременной памяти.

Ключевые слова: 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК; СРЕВ белки; локальная трансляция; долговременная память

Формирование памяти - многоступенчатый процесс, в котором принимают участие белки цитоплазматического полиаденилирования (СРЕВ) [1], способные образовывать комплексы с прионными свойствами и активировать локальную трансляцию мРНК в нейронах [2]. СРЕВ белок дрозофилы Orb2 представлен изоформами А и В, которые формируют амилоид-подобные фибриллы в ответ на стимуляцию синапса [3]. Эти структуры способны поддерживать приобретенную конформацию и активировать трансляцию связанных мРНК, являясь важными участниками процесса «синаптического мечения» [4]. Однако, регуляция трансляции непосредственно белка Orb2, изучена слабо. мРНК Orb2 имеют 5 изоформ, которые отличаются по длине 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) и содержат разное количество СРЕ-последовательностей и потенциально другие регуляторные элементы [5]. В

нашей работе мы изучили влияние делеции 3'-НТО на синтез и локализацию белка Orb2 в мозге дрозофилы.

Методика: С помощью CRISPR/Cas9 системы была удалена большая часть 3'-НТО гена *orb2*. Полученный аллель был назван Orb2R [6]. Для оценки влияния мутации на формирование долговременной памяти дрозофилы использовали метод условно–рефлекторного подавления ухаживания, что является естественной формой обучения у дрозофилы. С помощью ПЦР в реальном времени анализировали влияние делеции на уровень мРНК Orb2 в головном мозге мух. Оценку уровня белка Orb2 в мутантной линии проводили с помощью полуколичественного Вестерн блот-анализа. Для оценки влияния мутации на внутриклеточное распределение белка Orb2 в нейронах получали фракции сомы нейронов и синаптическую фракцию методом градиентного центрифугирования.

Результаты: При анализе влияния мутации на формирования памяти было установлено, что у мух линии Orb2R показатели кратковременной среднесрочной память не отличаются от показателей контрольной линии мух. Однако долгосрочная память у мух Orb2R практически отсутствовала (индекс обучения у контрольной линии составлял 70,9, у линии Orb2R он был равен - 0,03). У мух линии Orb2R с помощью ПЦР в реальном времени мы не обнаружили достоверных различий с контролем в содержании мРНК Orb2 в головном мозге мух. Однако уровень белка Orb2 был снижен относительно контроля приблизительно в 3 раза. При этом содержание белка в соме нейронов достоверно не отличалось в контрольной и в мутантной линиях, в то время как во фракции синапсов мы наблюдали снижение содержания белка Orb2 также приблизительно в 3 раза относительно контроля. Таким образом, делеция 3'-НТО гена *Orb2* приводит к снижению содержания белка Orb2 в зоне синапсов.

Заключение: Мы установили, что для нормального формирования долговременной памяти дрозифилы 3'-НТО гена *orb2* имеет критически важное значение. Снижение уровня белка Orb2 в зоне синапсов приводит к нарушениям активации локальной трансляции целевых мРНК, следствием чего является невозможность перехода памяти из краткосрочной в долгосрочную. Поскольку изучаемая делеция не затрагивает промотор и кодирующую часть гена *orb2*, мы предполагаем, что наличие 3'-НТО обеспечивает возможность активации трансляции белка Orb2 через механизм авторегуляции. Другая возможная роль 3'-НТО *orb2* - участие в транспорте мРНК в зону нейрональных отростков с последующей активацией локальной трансляции. Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 18-74-10051.

Литература

- 21.Ivshina M, Lasko P, Richter JD. Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:393-415. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155831
- 22.Hervas R, Rau MJ, Park Y, et al. Cryo-EM structure of a neuronal functional amyloid implicated in memory persistence in *Drosophila*. *Science.* 2020;367(6483):1230-1234. doi:10.1126/science.aba3526
- 23.Khan MR, Li L, Pérez-Sánchez C, et al. Amyloidogenic Oligomerization Transforms *Drosophila* Orb2 from a Translation Repressor to an Activator. *Cell.* 2015;163(6):1468-1483. doi:10.1016/j.cell.2015.11.020
- 24.Keleman K, Krüttner S, Alenius M, Dickson BJ. Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nat Neurosci.* 2007;10(12):1587-1593. doi:10.1038/nn1996
- 25.Hafer N, Xu S, Bhat KM, Schedl P. The *Drosophila* CPEB protein Orb2 has a novel expression pattern and is important for asymmetric cell division and nervous system function. *Genetics.* 2011;189(3):907-921. doi:10.1534/genetics.110.123646
- 26.Gilmutdinov R, Kozlov EN, Yakovlev KV, et al. The 3'UTR of the *Drosophila* CPEB translation factor gene *orb2* plays a crucial role in spermatogenesis. *Development.* 2021;148(17):dev198788. doi:10.1242/dev.198788

PARTICIPATION OF 3'-UNTRANSLATED REGION OF RNA CODING CPEB PROTEIN ORB2 FROM *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN

FORMATION OF LONG-TERM MEMORY

**Kozlov E.N.¹, Gilmutdinov R.A.¹, Zhukova M.V.¹, Schedl P.³, Tokmatcheva E.V.⁴,
Shidlovskii Y.V.^{1,2}**

¹ *Institute of gene biology RAS, Moscow, Russia*

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³*Department of Molecular Biology, Princeton University, Princeton, NJ, USA*

⁴ *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences St. Petersburg, Russia.*

Abstract: CPEB proteins are involved in the formation of long-term memory through the activation of mRNA translation in synapses. It had been shown previously that deletion of the coding part of the CPEB gene *Orb2* in *Drosophila melanogaster* flies led to loss of long-term memory. We have established that the 3'-untranslated region of *orb2* mRNA is also important for the normal formation of long-term memory.

Key words: 3'-untranslated region of mRNA; CPEB proteins; local translation; long-term memory

УДК 577.25

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНАЦИЙ
АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО АПТАМЕРА И ИНДУКТОРОВ НЕЙРАЛЬНОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА, А ТАКЖЕ НА
КУЛЬТУРЫ, РАЗЛИЧАЮЩИЕСЯ ПО ЭКСПРЕССИИ CD133

Колесникова В.А.¹, Самойленкова Н.С.², Дрозд С.Р.², Павлова Г.В.^{1,2,3}

¹ *ФГБУН ИВНД и НФ РАН, Москва, Россия*

² *НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н. Н. Бурденко, Москва, Россия*

³ *Первый МГМУ имени И. М. Сеченова, Москва, Россия*

E-mail: Barbara-1402@yandex.ru

Аннотация: Перспективным направлением для исследований в области нейронаук является изучение физиологических процессов, характерных для опухолевых стволовых клеток, а также возможности воздействия на них с помощью различных веществ. В работе проводилось исследование влияния комбинаций факторов, влияющих на пролиферацию и дифференцировку клеток нейронального происхождения, на клеточную культуру глиобластомы человека, различающуюся по экспрессии маркера стволовости CD133. Эффективность воздействия оценивалась с помощью МТТ теста на 10^й день эксперимента.

Ключевые слова: мультиформная глиобластома; CD133; аптамеры; малые молекулы; клеточная дифференцировка

Мультиформная глиобластома является одной из самых распространённых злокачественных опухолей головного мозга человека во взрослом возрасте, при которой 5-летняя выживаемость составляет всего 5% [1,2]. Наличие глиомных стволовых клеток может быть причиной резистентности опухоли к существующим видам терапии [3]. Одним из маркеров этих клеток является CD133 [4]. Важным является изучение возможности воздействия на глиомные стволовые клетки с целью выяснения их значимости для выживания опухоли. При этом значимым аспектом является переключение программы клетки с пролиферации на дифференцировку. Поэтому в данной работе использовалось последовательное добавление аптамера с антипролиферативными свойствами и

комбинации из малых молекул, запускающих нейрональную дифференцировку клеток.

Работа направлена на выяснение различий в реакции на добавление комбинации факторов полученных CD133⁺ и CD133⁻ клеток глиобластомы человека.

Методика: Из опухолевой ткани пациента была получена культура G01 глиобластомы человека (резекция была проведена в НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н. Н. Бурденко), характеризующаяся повышенной экспрессией маркера CD133. Из этой культуры с помощью иммуномагнитной сепарации были получены культуры, обогащенные и обедненные по CD133, то есть G01 CD133⁺ и G01 CD133⁻ соответственно.

Были испытаны комбинации антипролиферативных аптамера bi-(AID-1-T) с индукторами нейральной дифференцировки LDN-193189, SB431542, Purmorphamine и нейротрофином BDNF, играющим важную роль в нейрональной дифференцировке. На 10^й день после начала эксперимента была оценена пролиферативная активность G01 CD133⁺ и G01 CD133⁻ культур клеток с помощью МТТ-теста. Также были выбраны комбинации, оказавшие наиболее значительный эффект на изменение пролиферативного потенциала исследованных клеток, которые были проверены на исходной, то есть неразделенной, клеточной культуре глиобластомы человека G01.

Результаты: По результатам МТТ-теста в культуре G01 CD133⁺ при действии всех указанных факторов, то есть аптамера bi-(AID-1-T) в комбинации с нейроиндукторами LDN-193189, SB431542, Purmorphamine и нейротрофином BDNF, происходило полное ингибирование пролиферации клеток этой культуры. Клетки культуры G01 CD133⁻ показали большую чувствительность к исследованным комбинациям факторов: добавление bi-(AID-1-T) и его

комбинации с BDNF, а также использование полного набора факторов привело к остановке пролиферации клеток, комбинации аптамера bi-(AID-1-T) с SB431542 и Purmorphamine вызвали снижение пролиферативной активности клеток этой культуры.

Успешные комбинации факторов, сработавшие на культурах G01 CD133⁺ и G01 CD133⁻, были испытаны на исходной культуре клеток G01. Добавление в эту культуру bi-(AID-1-T) и его комбинации с BDNF привело к почти полному снижению пролиферации клеток, а использование всех исследованных факторов полностью ингибировало деление клеток исходной культуры G01.

Заключение: Полученные результаты говорят о том, что обогащенные и обедненные по CD133 культуры по-разному реагируют на добавление исследованных факторов, в частности, культура G01 CD133⁺ является более устойчивой, что подтверждает наличие у нее свойства стволовости. Найденная комбинация аптамера bi-(AID-1-T) с индукторами нейральной дифференцировки LDN-193189, SB431542, Purmorphamine и нейротрофическим фактором BDNF способствует полному ингибированию пролиферации опухолевых стволовых клеток глиомы, что при клиническом применении может снизить вероятность рецидивов глиобластомы.

Литература

1. Batash R. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review / Batash R., Asna N., Schaffer P., Francis N., Schaffer M. // Current Medicinal Chemistry – 2017. – Т. 24 – № 27 – С.3002–3009.
2. Delgado-López P.D. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities / Delgado-López P.D., Corrales-García E.M. // Clinical and Translational Oncology – 2016. – Т. 18 – № 11 – С.1062–1071.
3. Singh S.K. Identification of human brain tumour initiating cells / Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B. // Nature – 2004. – Т. 432 – № 7015 – С.396–401.
4. Brescia P. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance / Brescia P., Ortensi B., Fornasari L., Levi D., Broggi G., Pelicci G. // Stem Cells – 2013. – Т. 31 – № 5 – С. 857–69.

**STUDY OF THE INFLUENCE OF COMBINATIONS OF
ANTIPROLIFERATIVE APTAMER AND INDUCTORS OF NEURAL
DIFFERENTIATION ON THE PROLIFERATIVE POTENTIAL OF HUMAN
GLIOBLASTOMA CELL CULTURE, AND ALSO ON CULTURES DIFFER
IN CD133 EXPRESSION**

Kolesnikova V.¹, Samoylenkova N.², Drozd S.², Pavlova G.^{1,2,3}

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

*² Institution «N. N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery» of
the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract: A promising direction for research in the field of neuroscience is the study of physiological processes specific for tumor stem cells, as well as the possibility of influencing them with various substances. In this work, we studied the effect of combinations of factors influencing the proliferation and differentiation of cells of neuronal origin on the cell culture of human glioblastoma, which differs in the expression of the stemness marker CD133. The effectiveness of the impact was assessed using the MTT test on the 10th day of the experiment.

Key words: glioblastoma multiforme; CD133; aptamers; small molecules; cell differentiation

УДК 612.821

**ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО
ХОЛИНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗУ, С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9**

Корягина А.А.¹, Спивак Ю.С.¹, Буянова А.А.¹, Большаков А.П.¹,

Дашинимаев Э.Б.², Гуляева Н.В.¹, Степаничев М.Ю.¹

¹ *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии*

РАН, Москва, Россия

² *ФГБУН Институт биологии развития им. Н.Н. Кольцова РАН, Москва,*

Россия

E-mail: koraljona3@gmail.com

Аннотация: Холинергические нейроны ядер переднего мозга обладают способностью синтезировать два классических медиатора: ацетилхолин (АХ) и гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). Для исследования роли холинергических нейронов, в основном, используются различные токсины, действие которых приводит к повреждению и гибели нервных клеток. Такой подход не позволяет выделить функциональную роль каждого из медиаторов в исследуемых процессах. Поэтому для понимания вклада каждого из этих медиаторов в функции мозга необходимо наличие моделей, которые позволяют инактивировать одну нейромедиаторную систему при относительной сохранности второй. В ходе выполнения работы планируется разработать подход на основе системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 для локального ингибирования синтеза АХ в нейронах, при сохранности структуры и функциональных свойств самих клеток.

Ключевые слова: холинацетилтрансфераза, мозг, CRISPR/Cas9, геномное редактирование

Холинергические нейроны ядер переднего мозга представляют собой уникальные клетки, обладающие способностью синтезировать два классических медиатора: ацетилхолин (АХ) и гамма-аминомасляную кислоту

(ГАМК) [1]. Показано, что эти клетки вовлечены в процессы, ассоциированные с регуляцией ритмической активности нейронов неокортекса и гиппокампа [2]. Кроме того, активность этих клеток важна для обучения и формирования памяти. Для исследования роли, которую играют холинергические нейроны в том или ином процессе, в основном, используются различные токсины, действие которых приводит к повреждению и гибели нервных клеток [3,4]. Поскольку холинергические нейроны могут быть источником двух медиаторов, гибель клеток не позволяет выделить функциональную роль каждого из медиаторов в исследуемых процессах. Поэтому для понимания вклада каждого из этих медиаторов в функции мозга необходимо наличие моделей, которые позволяют инактивировать одну нейромедиаторную систему при относительной сохранности второй. Подобная модель не только позволит исследовать роль одной из сохранившихся медиаторных систем, но и выявить особенности функционирования нейронов с частично утраченным фенотипом. В ходе выполнения работы предполагается разработать подход, благодаря которому будет возможно локально ингибировать синтез АХ в нейронах, при сохранности структуры и функциональных свойств самих клеток. Такое исключение холинергической составляющей позволит пронаблюдать изменения в нейронах и их проекционных областях в отсутствие действия других повреждающих факторов.

Целью настоящей работы является разработка и создание системы на основе CRISPR/Cas9 для удаления части гена, кодирующего холинацетилтрансферазу (*CHAT*) и приводящего к инактивации этого гена, в головном мозге мыши и проверка ее функциональности на клетках нейробластомы.

Методика: Работа включала в себя эксперименты, проведенные на культуре клеток нейробластомы мыши NB41A3 и Neuro2A, полученных из Российской коллекции клеточных культур (ИЦ РАН, С.-Петербург, РФ), и на мышях линии

C57Bl/6 (ООО “Кролинфо”, Московская обл., РФ). Культивацию клеток NB41A3 проводили в среде F10, содержащей 10% сыворотки FBS и смесь антибиотиков и антигрибковых препаратов, а клеток Neuro2A - в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки FBS. Дифференцировку клеток осуществляли добавлением фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) в концентрации 20 нг/мл в течении 48 ч. Клетки фотографировали через 48 ч с помощью инвертированного микроскопа Keyence (Keyence Corporation of America, USA) в условиях фазовоконтрастного освещения. Оценку морфологических показателей дифференцировки проводили с использованием программы FIJI (NIH, USA). Для оценки наличия маркеров холинергической трансмиссии использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноблотинг и иммуногистохимическое окрашивание клеток.

Для доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки использовались плазмиды pAAV-EFS-мус-SpCas9, pAAV-U6-gRNA-CMV-GFP, отвечающие за экспрессию белка SpCas9 и гидовых РНК, соответственно. Для оценки работоспособности этой системы проводили котрансфекцию клеток Neuro2A вышеуказанными плазмидами с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) согласно протоколу производителя. Клеточная популяция, экспрессирующая GFP, была отобрана методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Далее методом ПЦР проводили амплификацию фрагмента гена *CHAT*, включающего делецию, клонирование этого фрагмента, отбор клонов и секвенирование по Сэнгеру.

Наработку и очистку AAV проводили согласно протоколу Grieger et. al [5], с минимальными модификациями. Коротко, клетки HEK293TN растили в среде DMEM с добавлением 10% FBS до конfluence 60-80%, за 1 ч до трансфекции среду меняли на бессывороточную, далее клетки котрансфицировали плазмидами pHelper, pAAV2/9n-Rep/Cap и целевыми плазмидами pAAV с ITR. В качестве трансфицирующего агента использовали разветвленный PEI (Sigma-Aldrich, USA). Через 4 ч после трансфекции

проводили смену среды на DMEM с FBS. Через 72 ч клетки механически собирали и лизировали методом заморозки/разморозки. Гомогенаты очищали от дебриса центрифугированием. Далее вирусные векторы очищали с использованием ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола.

В экспериментах *in vivo* использовали мышей C57BL/6. Животных анестезировали 4% изофлураном (30-50 мл/мин) и помещали в стереотаксическую установку. Небольшое отверстие в черепе делали с помощью стоматологического бора. Инъекцию вирусных векторов (титр 10^{10} vg/ul) осуществляли с использованием 10-мкл микрошприца (Hamilton, USA) в медиальную септальную область мозга (координаты от брегмы: AP +0.8, L -1, H -4,1, угол 14°). Объем инъекции составлял 2 мкл, скорость введения 0.5 мкл/мин, в течение введения микрошприц поднимали на 0.2 мм каждые 40 секунд.

Результаты: С помощью биоинформатического анализа были подобраны последовательности генов РНК (гРНК), позволяющие получить делецию длиной 41 пн в 7 экзоне гена *CHAT*. Для подтверждения работоспособности разработанной системы инактивации гена *CHAT* мы планировали протестировать ее на клеточных культурах, в которых есть экспрессия белка ХАТ. Получить первичную холинергическую культуру из мыши затруднительно в виду того, что холинергических нейронов довольно мало, поэтому было решено подобрать иммортализованную клеточную культуру с признаками холинергических нейронов. Согласно каталогу Российской коллекции клеточных культур существует 2 клеточные линии нейробластомы мыши NB41A3 и Neuro2A, в которых по литературным данным детектируется активность ХАТ и ацетилхолинэстеразы [6]. Тем не менее, нам не удалось подтвердить наличие экспрессии мРНК и белка ХАТ, в том числе после проведения дифференцировки клеток. Таким образом, использование этих клеточных культуры для подтверждения изменений в функционировании гена

ХАТ после внесения CRISPR/Cas9 в эти клетки остается под вопросом. Однако мы использовали эти клеточные культуры для детекции делеции в геноме. В частности, наличие делеций в 7 экзоне гена *CHAT* было подтверждено данными секвенирования после трансфекции клеток Neuro2A указанными выше конструкциями для экспрессии белка Cas9 и гидовых РНК.

После адаптации и отработки протоколов наработки и очистки различных серотипов рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) конструкции на базе rAAV2, rAAV8 и rAAV9 вводили в область септо-медиального ядра мозга мыши. Для дальнейшей работы был выбран серотип rAAV9, который показал наилучший результат по заражению нейронов медиального септума, что согласуется с литературными данными [7].

В дальнейшем эксперименте использовали систему, состоящую из двух вирусов: первый нёс ДНК для экспрессии белка Cas9 и маркерного белка *myc-tag*, второй - пару гРНК и GFP для получения заданной делеции. Эффективность заражения этими вирусами продемонстрировали в клеточных культурах HEK293TN и Neuro2A, по уровню флуоресценции GFP. А также было показано, что введение созданных конструкций с медиальную септальную область сопровождалось экспрессией маркеров (белков GFP и *myc-tag*) в нейронах медиальной септальной области.

Заключение: Таким образом, в этой работе были созданы вирусные векторы на основе rAAV9, которые дают возможность применить методику геномного редактирования с использованием CRISPR/Cas9 для направленной модификации генов в мозге животных и культуре клеток нервной ткани. С использованием системы CRISPR/Cas9 впервые удалось получить делецию в гене, кодирующем ХАТ, в клетках нейробластомы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-015-00226).

Литература

1. Takács V.T. et al. Co-transmission of acetylcholine and GABA regulates hippocampal states // Nat. Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 2848.
2. Mitsushima D. Hippocampal Function and Gonadal Steroids. 2012.
3. Bolshakov A.P. et al. Saporin from *Saponaria officinalis* as a Tool for Experimental Research, Modeling, and Therapy in Neuroscience // Toxins . Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 12, № 9. P. 546.
4. Gulyaeva N.V. et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Sporadic Alzheimer's Disease: Studies on Rodent Models in vivo // Biochemistry . 2017. Vol. 82, № 10. P. 1088–1102.
5. Grieger J.C., Choi V.W., Samulski R.J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1, № 3. P. 1412–1428.
6. Thompson J.M., London E.D., Johnson J.E. Jr. Ultrastructural, functional and biochemical characteristics of mouse and human neuroblastoma cell lines // Neuroscience. 1982. Vol. 7, № 7. P. 1807–1815.
7. Haery L. et al. Adeno-Associated Virus Technologies and Methods for Targeted Neuronal Manipulation // Front. Neuroanat. 2019. Vol. 13. P. 93.

CHOLINE ACETYLTRANSFERASE GENE INACTIVATION USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM

**Koryagina A.A.¹, Spivak Yu.S. ¹, Buyanova A.A.¹, Bolshakov A.P.¹,
Dashinimaev E.B.², Gulyaeva N.V.¹, Stepanichev M.Yu.¹**

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Kol'tsov Institute of Developmental Biology, RAS, Moscow, Russia*

E-mail: koraljona3@gmail.com

Abstract: Forebrain cholinergic neurons can release two neurotransmitters: acetylcholine (ACh) and gamma-aminobutyric acid (GABA). Previously, role of cholinergic neurons was studied using various toxins that lead to damage and death of neurons. However, this approach does not allow to differentiate the functional role of each of two neurotransmitters. To shed light upon the individual neurotransmitter contribution to brain function it is necessary to develop models for inactivation of one neurotransmitter with saving another. In current work, we planned to develop a system on the basis of genome editing CRISPR/Cas system for local inhibition of

ACh synthesis in neurons which makes it possible to preserve structures and functional properties of neurons.

Key words: choline acetyltransferase, brain, CRISPR/Cas9, genome editing

УДК 612.821

ДИНАМИКА СИСТОЛИЧЕСКОГО И ДИАСТОЛИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ И
ЧАСТОТЫ ПУЛЬСА У КРЫС ЛИНИИ SHR В ТЕЧЕНИЕ ТРЁХ МЕСЯЦЕВ
ПОСЛЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Кострюков П.А.^{1,2}, Комольцев И.Г.^{1,3}, Гехаева З.К.¹, Салып О.Ю.¹,

Башкатова Д.А.¹, Волкова А.А.¹, Новикова М.Р.¹, Гуляева Н.В.^{1,3}

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии
наук*

² *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
биологический факультет*

³ *Бюджетное Учреждение Здравоохранения Научно-практический
психоневрологический центр им. З. П. Соловьёва Департамента
Здравоохранения г. Москвы
pavelkostrukov075@gmail.com*

Аннотация. Крысы линии SHR (крысы со спонтанной гипертензией) характеризуются повышенным уровнем артериального давления, кортикостерона и ранними когнитивными нарушениями. Задачей данной работы являлось исследование динамики показателей давления и пульса в течение 3 мес после ЧМТ и ложной операции (ЛО) в рамках исследования отдалённых последствий ЧМТ. Было показано, что давление и пульс у крыс изменяются со временем, но не зависят от ЧМТ.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, систолическое давление, диастолическое давление, пульс, пульсовое давление

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является сложной и значимой. Отдалённые последствия ЧМТ характеризуются множеством функциональных проявлений. Данное исследование является частью проекта по изучению влияния ЧМТ на морфофизиологические особенности гиппокампа и тесно связанных с ним комплексных изменений в физиолого-биохимико-морфологических и этологических последствиях ЧМТ у крыс. Изменение давления как отдаленное последствие ЧМТ может служить сопутствующим фактором при развитии когнитивных нарушений, депрессии и эпилепсии. Крысы линии SHR (spontaneously hypertensive rats), кроме спонтанной гипертензии, характеризуются повышенным уровнем кортикостерона и ранними когнитивными нарушениями. Задачей данной работы являлось исследование показателей давления и пульса в течение 3 мес после ЧМТ и ложной операции (ЛО) как часть проекта исследования отдалённых последствий ЧМТ.

Материалы и методы. Исследование проведено на 25 крысах самцах линии со спонтанной гипертензией (SHR), масса около 350 г, возрасте около 6 месяцев. Животные были разделены на 2 группы: ЧМТ (n=15) и ЛО (n=10). На начальном этапе эксперимента проводили хендлинг животных в течение недели. Далее в течение 3-х дней измеряли дважды утреннее и дважды вечернее давление. После ЧМТ измерение проводилось только вечером в течение 3-х месяцев после травмы: на 3 и 7 дни, а также через месяц, 2 и 3 месяца. Моделирование ЧМТ проводили при помощи латерального гидродинамического удара в область правой сенсомоторной коры. Измерение давления проводили с помощью аппарата «Систола» после помещения в иммобилизационные камеры, с поддержкой постоянной температуры около 34⁰С. Измерение давления и пульса проводили на хвосте крысы, на который крепился воздушный валик и манжетка с инфракрасными датчиками. Валик под напором воздуха сжимал проксимальную часть хвоста до 215 мм.рт.ст., и затем сжатие постепенно уменьшалось. В результате фиксировалось

систолическое (СД), диастолическое давление (ДД) и пульс. Пульсовое давление (ПД) считали как разницу СД и ДД. Измерение проводили трижды у каждой крысы с последующим усреднением результатов.

Результаты. До ЧМТ показатель среднего СД, ДД и ПД у всех крыс до краниотомии составлял 179 ± 2 , 139 ± 2 и 40 ± 2 мм. рт. ст.; пульс - 429 ± 7 уд/мин. Для подавляющего большинства измерений показатели были распределены нормально ($p > 0.05$, тест Шапиро-Уилка).

Наблюдали статистическую тенденцию к увеличению СД у крыс при первом измерении давления до ЧМТ ($p = 0.053$, тест Стьюдента) по сравнению со вторым. ДД, ПД и частота пульса при первом измерении, а также все показатели при повторном измерении давления в фоне не отличались при утреннем и вечернем измерении, или между группами ЧМТ и ЛО ($p > 0.05$, тест Стьюдента).

При сравнении СД, ДД, ПД и частоты пульса в группах ЛО и ЧМТ после краниотомии отличия не были обнаружены ни на одной временной точке (3 и 7 дней, 1, 2 и 3 мес.) ($p > 0.05$, тест Стьюдента).

Дисперсионный анализ ANOVA для повторных измерений для показателей СД, ДД, ПД и частоты пульса продемонстрировал, что все 4 показателя достоверно отличаются по фактору времени ($p < 0.001$), но не по фактору группы ($p > 0.05$).

По фактору времени проведен апостериорный анализ (тест Тьюки) и выявлен ряд закономерностей. Через 2 мес. после краниотомии СД было достоверно выше, чем в фоне и на 3 день измерения ($p < 0.05$). ДД через 2 мес. после краниотомии было также выше по сравнению с фоновыми показателями, а также 3-м и 7-м днём после ЧМТ ($p < 0.05$). ПД через 3 мес. после краниотомии у крыс было значимо ниже по сравнению с фоновыми показателями, а также показателями на 3-й и 7-й день после краниотомии ($p < 0.05$). Частота пульса у крыс до травмы была достоверно выше, чем через 1 мес. ($p < 0.05$) и 3 мес. ($p < 0.05$) после краниотомии. На 3-й день после краниотомии частота пульса

была достоверно выше, чем через 1 ($p<0,05$) и 3 мес. после краниотомии ($p<0,05$).

Корреляционный анализ параметров давления и пульса для всех измерений (корреляции Пирсона) выявил достоверную положительную зависимость между СД и ДД ($p<0,001$), а также между СД и ПД ($p<0,001$). Показана также достоверная обратная зависимость между изменениями ДД и ПД ($p<0,001$).

Кроме того, при увеличении частоты пульса увеличивается и ПД ($p<0,05$), а при увеличении ДД происходит уменьшение частоты пульса ($p<0,05$).

Заключение. В данной работе мы изучили изменение показателей давления и частоты пульса в течение 3 мес после ЧМТ и ложной операции (ЛО) в рамках исследования отдалённых последствий ЧМТ у крыс линии SHR со спонтанной гипертензией. Было показано, что артериальная гипертензия имеет характерные изменения, связанные со временем, но нанесение ЧМТ не влияет на изменение этих показателей.

Выводы:

1. У крыс SHR при первом измерении артериального давления было зафиксировано повышенные показатели СД. Различий между утренним и вечерним измерением давления не выявлено.
2. Различия между группами ЛО и ЧМТ по показателям давления после травмы не были обнаружены.
3. Вне зависимости от группы (ЛО или ЧМТ) показатели СД и ДД увеличивались ко 2-му месяцу, а ПД и пульс уменьшались к 3-му месяцу после краниотомии.
4. Наблюдаются достоверные корреляции между показателями СД, ДД, ПД и частоты пульса.

Поддержано грантом РФФИ 19-015-00258

TIME COURSE OF SYSTOLIC AND DIASTOLIC PRESSURE AND PULSE RATE IN SHR RATS DURING THREE MONTHS AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY

**Kostryukov P.A.^{1,2}, Komoltsev I.G.^{1,3}, Gekhaeva Z.K.¹, Salyp O.Yu.¹,
Bashkatova D.A.¹, Volkova A.A.¹, Novikova M.R.¹, Gulyaeva N.V.^{1,3}**

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy
of Sciences*

² *Moscow State Lomonosov University, Faculty of Biology*

³ *Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry*

Annotation. SHR rats (spontaneously hypertensive rats) are characterized by elevated blood pressure and corticosterone level, as well as early cognitive impairment. This experiment is a part of the study on late consequences of TBI in SHR rats. The aim was to monitor arterial blood pressure and pulse rate during 3 months after traumatic brain injury (TBI) and sham operation. Arterial blood pressure in SHR rats changed with time, but TBI did not affect these changes.

Keywords: traumatic brain injury, systolic pressure, diastolic pressure, pulse, pulse pressure

УДК 612.821

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА ПРИ
КОМПРИМИРУЮЩЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ ОПУХОЛИ МЕДИОБАЗАЛЬНЫХ
ОТДЕЛОВ ВИСОЧНОЙ ДОЛИ НА ГИППОКАМП

Кулева А.Ю.¹

¹ *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: kylaria@mail.ru

Аннотация. Уточнение функциональной включенности гиппокампа в формирование рисунка ЭЭГ и протекания мнестических процессов, представляется актуальной проблемой в изучении механизмов работы мозга человека. Работа направлена на выявление ЭЭГ- маркеров включения гиппокампальных структур в патологический процесс при компримирующем опухолевым воздействием на медиальные отделы височной доли на долечебном

этапе. В работе проводилось исследование функциональной активности мозга методом структурного и КогЭЭГ анализа.

Ключевые слова: паттерны ЭЭГ, КогЭЭГ, менингиомы, медиобазальные отделы височной доли, гиппокамп.

Развитие представлений о вкладе гиппокампа в формирование рисунка ЭЭГ и протекание мнестических процессов, представляется актуальной проблемой в изучении механизмов работы мозга человека. Надо отметить, что основная часть данных об ЭЭГ-коррелятах дисфункции гиппокампа у человека получена в рамках клинико-электрофизиологических исследований височной эпилепсии. Моделью для изучения роли гиппокампальных структур в формировании функциональной активности мозга может служить проводимое нами исследование больных с внемозговой, медленно растущей доброкачественной опухолью медиобазальных отделов височной доли, оказывающей разную степень компримирующего воздействия на гиппокамп. С целью остановки роста опухоли эти пациенты поступали в ФГАУ НМИЦН им.ак.Н.Н.Бурденко для прохождения стереотаксической радиотерапии, во время которой гиппокамп вынужденно получал дозу, сопоставимую с дозой в опухоли [1]. Проводимая радиотерапия, согласно литературным данным [2,3], может приводить к частичному нарушению функций памяти. С учетом этого, динамическое исследование данной категории пациентов предоставляет возможность уточнения функциональной включенности гиппокампа в мнестическую деятельность человека.

Цель настоящего сообщения - выявление ЭЭГ- маркеров включения гиппокампальных структур в патологический процесс при компримирующем опухолевом воздействии на медиальные отделы височной доли до проведения курса радиотерапии.

Методика. Основную группу наблюдения составили 27 пациентов с менингиомами медиобазальных отделов височной доли (область кавернозного

синуса, крыльев основной кости). Из них у 12 пациентов (ср.возраст 50 ± 10 лет; 10 женщин) отмечалась правосторонняя локализация опухоли, у 15 пациентов (ср.возраст 53 ± 10 лет; 13 женщин) - левосторонняя локализация. На основании данных нейровизуализации, полученных на той же выборке [4], пациенты были разделены на две группы: у 17 пациентов опухоль оказывала компримирующий эффект на гиппокамп, у 10 пациентов гиппокампальные структуры компрессии со стороны опухоли не подвергались. По данным морфометрической оценки [4], проведенной путем оконтуривания опухоли и гиппокампов в системе дозиметрического планирования iPlan (BrainLab, Германия), значимых различий объёмов опухолей и гиппокампов в исследуемых группах не наблюдалось.

Проводились 18-канальные регистрации ЭЭГ в состоянии покоя с закрытыми глазами (эпоха анализа 2-3 минуты) с последующим структурным и когерентным анализом на базе программно-вычислительного комплекса «Нейрокартограф» (МБН, Россия). Сопоставлялись групповые показатели средних уровней Ког (всей частотной полосы ЭЭГ в целом и отдельных физиологических диапазонов ритмов) между нормой и пациентами, а также между выделенными группами больных. Достоверность отличий определялась на основе непараметрического критерия Манна-Уитни, с помощью пакета статистических программ [5]. При интерпретации этих данных учитывались наиболее достоверные результаты ($p < 0,001$). Группу контроля при ЭЭГ-исследовании составили 55 здоровых испытуемых.

Результаты. Изменения ЭЭГ исследованных больных отличались неоднородностью, имели диффузный характер, без очаговых медленных волн и фокальных проявлений эпи-активности. На основании структурного анализа ЭЭГ были выделены пять, наиболее характерных патологических паттернов ЭЭГ, которые проявлялись изолированно или сочетались в разных комбинациях: 1 - снижение уровня электрической активности; 2 – диффузные

ирритативные изменения; 3 - негрубые эпилептиформные знаки, проявляющиеся либо с переменным преобладанием сторон, либо с устойчивыми признаками межполушарной асимметрии; 4 - билатеральная генерализация по коре альфа-ритма или перемещения его фокуса в передние отделы; 5 - наличие эпизодов локального увеличения альфа-ритма в передних отделах пораженного полушария. Эти атипичные формы альфа-активности, подробно исследуемые в нашей лаборатории, были условно обозначены, как «диэнцефальный» и «гиппокампальный» альфа-ритмы [6]. Подсчет частоты встречаемости выявленных патологических паттернов ЭЭГ показал, что при компрессии гиппокампальных структур отмечается большая, чем без их компрессии, выраженность ирритативных изменений, преимущественная сконцентрированность эпи-знаков в пораженном полушарии, проявление эпизодов «гиппокампального» альфа-ритма. Анализ изменений межцентральных отношений (КогЭЭГ), проведённый в сопоставлении с нормативными данными, показал, что в случаях воздействия опухоли на гиппокамп, более характерным было снижение Ког, особенно резко проявляющееся для колебаний альфа-диапазона. Это соответствует выявленной при структурном анализе ЭЭГ больных этой группы выраженной гетерогенности альфа-ритма в виде проявления его атипичных форм. Кроме того, было установлено, что компрессия левого гиппокампа сопровождается более частой, чем правого, встречаемостью «диэнцефального» альфа-ритма и преобладанием эпи-знаков в пораженном полушарии. Этому соответствовала более сложная, по сравнению с компрессией правого гиппокампа, картина перестройки Ког ЭЭГ, проявляющаяся с признаками межполушарной асимметрии (большее включение в реактивный процесс связей по низким частотам на стороне опухоли) и в реципрокном характере изменений сочетанности медленных составляющих ЭЭГ и альфа-активности.

Ранее проведенное [4] на этой же клинической группе пациентов нейропсихологическое тестирование на долечебном этапе заболевания выявило

отсутствие значимых статистических различий между результатами зрительного запоминания клинической и контрольной группы. Полученные нейропсихологические результаты являются дополнительным свидетельством того, что внемозговые новообразования, не инфильтрирующие структуры мозга, в целом не оказывают выраженного влияния на протекание мнестических процессов до начала радиотерапии, даже в случае компримирующего воздействия опухоли на гиппокампальные структуры.

Заключение. Выявлены особенности реорганизации ЭЭГ (структурного состава и межцентральных отношений) у пациентов с компримирующим воздействием опухоли на медиобазальные отделы височной доли, которые, в сопоставлении с морфометрическими данными, можно рассматривать в качестве вероятных маркеров воздействия опухоли на гиппокамп. Это, прежде всего, касалось нарушения пространственной организации ЭЭГ, с формированием атипичных форм альфа-ритма, отражающих его выраженную гетерогенность. Выявлены ЭЭГ-признаки неидентичного характера включения в патологический процесс правого и левого гиппокампов. С учетом данных морфометрии, свидетельствующих об отсутствии статистически значимых различий в объемах гиппокампа интереса и опухоли в группах с право- и левосторонним расположением опухоли, можно полагать, что полученные различия обусловлены тонкими структурными изменениями или функциональной межполушарной асимметрией гиппокампальных структур в данной клинической выборке. Полученные данные являются опорными в дальнейшей оценке ЭЭГ-динамики развития патологического процесса при лучевой терапии и уточнения структурной детерминированности мнестических процессов у исследуемых нами пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01426.

Литература

1. Rogers L., Barani I., Chamberlain M., Kaley T.J., McDermott M., Raizer J., Schiff D., Weber D.C., Wen P.Y., Vogelbaum M.A. Meningiomas: knowledge base,

- treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review // *J Neurosurg.* – 2015. – 122(1): 4–23, <https://doi.org/10.3171/2014.7.jns131644>.
2. Kazda T., Jancalek R., Pospisil P. et al. Why and how to spare the hippocampus during brain radiotherapy: the developing role of hippocampal avoidance in cranial radiotherapy // *Radiation Oncology.* – 2014. – Vol. 9(139). doi:10.1186/1748-717X-9-139
 3. Kim K., Wee C., Seok J. et al. Hippocampus-sparing radiotherapy using volumetric modulated arc therapy (VMAT) to the primary brain tumor: the result of dosimetric study and neurocognitive function assessment // *Radiation Oncology.* – 2018. – Vol. 13(29). doi:10.1186/s13014-018-0975-4.
 4. Кроткова О.А., Кулева А.Ю., Галкин М.В., Каверина М.Ю., Струнина Ю.В., Данилов Г.В. Факторы модуляции памяти при лучевом воздействии на гиппокамп // *Современные технологии в медицине* – 2021. – Т. 13. – № 4. – С. 6-15. – DOI 10.17691/stm2021.13.4.01.
 5. Воронов В.Г., Щекутьев Г.А., Гриндель О.М. Пакет программ для статистического сравнения записей ЭЭГ. Материалы международной конференции «Клинические нейронауки: нейрофизиология неврология, нейрохирургия». Украина, Крым, Гурзуф, июнь, 2003 г. С.22-24.
 6. Болдырева Г.Н. Атипичные формы церебральной альфа-активности при поражении регуляторных структур мозга человека // *Физиология человека.* – 2018. – Т. 44. – № 3. – С. 14-26. – DOI 10.7868/S0131164618030025.

FEATURES OF THE BRAIN FUNCTIONAL ACTIVITY AT THE COMPRESSION EFFECT OF MADIOBASAL TEMPORAL BRAIN REGIONS TUMOR ON THE HIPPOCAMPUS

Kuleva A.Yu.¹

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

Abstract: Clarification of the functional hippocampus involvement in the formation of the EEG pattern and the course of mnestic processes seems to be an urgent problem in the study of the human brain mechanisms. The work is aimed at identifying EEG markers of the hippocampal structures inclusion in the pathological process with a compressive effect of mediobasal tumor on temporal brain regions at the pre-treatment stage. This study of the brain functional activity was carried out by

the method of structural and CohEEG analysis.

Key words: EEG patterns, EEG coherence, meningiomas, temporal mediobasal brain regions, hippocampus.

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ P53 НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ВНОВЬ ОБРАЗОВАННЫХ КЛЕТОК ЗУБЧАТОЙ ИЗВИЛИНЫ ПРИ АУДИОГЕННОМ КИНДЛИНГЕ

А. А. Куликов, Н. А. Дорофеева, М. В. Глазова,

Е. А. Лаврова, Е. В. Черниговская

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова,

Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: alexey.kulikov@iephb.ru

Аннотация: Одной из задач современной нейробиологии является поиск подходов для предотвращения структурных нарушений мозга, в частности гиппокампа, возникающих в результате эпилептиформной активности. Целью настоящей работы было исследование влияния пифитрин- α , химического ингибитора проапоптозного белка p53 на развитие структурных изменений гиппокампа на начальной стадии эпилептогенеза. Применение пифитрина- α привело к снижению числа дифференцированных нейронов в хилусе, что позволяет рассматривать его как потенциальный терапевтический агент.

Ключевые слова: нейрогенез, апоптоз, p53, аутофагия, эпилепсия

Эпилепсия приводит к увеличению пролиферативной активности в нейрогенной нише гиппокампа – в субгранулярном слое зубчатой извилины [1–

4]. В последние годы преобладает представление, что образование новых клеток при эпилептическом статусе в большей степени способствует эпилептогенезу, а не препятствуют развитию нейродегенеративных нарушений, связанных с усилением клеточной гибели [5,6]. Белок p53 является одним из ключевых белков, участвующих в регуляции нейрогенеза, апоптоза и аутофагии. Известно, что инактивация белка p53 уменьшает клеточную гибель в гиппокампе при судорогах, вызванных введением каината. При этом продолжительность спонтанных судорог увеличивается [7]. Эти данные указывают не только на важную роль p53 при нейродегенеративных повреждениях гиппокампа во время развития эпилепсии, но также и на возможное участие этого белка в формировании судорожных состояний. Снижение количества p53 ведет к увеличению пролиферативной активности нейронов [8, 9], что может вызывать истощение пула предшественников нейронов. Мы предположили, что ингибирование проапоптотического белка p53 может является одним из возможных терапевтических подходов для лечения эпилепсии и ее нейродегенеративных последствий.

Целью настоящей работы было исследование роли проапоптотического белка p53 в развитии структурных изменений гиппокампа на модели начальной стадии эпилептогенеза с помощью использования пифитрин- α , химического ингибитора p53. Также представляло интерес оценить возможность использования подобных препаратов для снижения степени нейродегенеративных последствий судорожной активности у больных эпилепсией.

Методика: В эксперименте использовались аудигенночувствительные крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ). Были проанализированы следующие группы крыс:

1. контрольные животные, получившие 4 инъекции DMSO (растворитель пифитрина- α) (были декапированы через 5 ч после последней инъекции)

2. животные, перенесшие 4 судорожных припадков и получившие 4 инъекции DMSO (были декапированы через 5 ч после последней инъекции)
3. животные, перенесшие 4 судорожных припадков и получившие 4 инъекции пифитрина- α (были декапированы через 5 ч после последней инъекции)
4. животные, перенесшие 4 судорожных припадков и получившие 4 инъекции DMSO (были декапированы через 7 дней после последней инъекции)
5. животные, перенесшие 4 судорожных припадков и получившие 4 инъекции пифитрина- α (были декапированы через 7 дней после последней инъекции)

Инъекции DMSO или пифитрина- α (2 мг/кг массы тела) проводились за 1 ч до каждого предъявления звуковой стимуляции. Все животные дважды получали инъекции BrdU i.p. (BrdU, Sigma) (100 мг/кг) в последние 2 дня перед декапитацией.

С помощью антител к BrdU иммуногистохимическим методом определяли уровень пролиферации и локализацию новообразованных клеток. Направленность дифференцировки новообразованных клеток была определена методом двойного иммунофлуоресцентного выявления клеток, прошедших клеточный цикл (выявление BrdU), и коэкспрессии в этих клетках белка-маркера нейронов NeuN и маркера глии GFAP.

Уровень апоптоза нейронов и их локализация в гиппокампе были определены методом TUNEL. Уровень p53, p(Ser15)-p53, clCasp3; LC3B; Beclin-1, p62; Bcl-2, p(Ser70)-Bcl2 в гиппокампе оценивали с помощью вестерн-блот анализа.

Результаты:

Иммуногистохимический метод показал, что при четырехкратных аудиогенных судорожных припадках у крыс линии КМ наблюдается усиление пролиферативной активности, аберрантная миграция вновь образованных клеток в хилус и ускорение их дифференцировки в нейроны. Четырехкратные припадки не приводят к изменениям экспрессии белков апоптоза (p53, p(Ser15)-p53, clCasp3, Bcl-2, p(Ser70)-Bcl2) и аутофагии (LC3BI; Beclin-1, p62). Метод TUNEL также подтвердил отсутствие повышенной апоптотической гибели

после четырех судорожных припадков. Использование химического ингибитора белка p53 пифитрин-α не привело к изменениям в уровне апоптоза и аутофагии. Четырехкратные судорожные припадки вызывали увеличение пролиферации и дифференцировки новообразованных клеток по нейрональному типу и миграцию в гранулярный слой зубчатой извилины и в хилус. При инактивации p53 число дифференцированных клеток в хилусе снижалось по сравнению с таковым у крыс, которым вводили растворитель блокатора, несмотря на увеличение количества вновь образованных клеток.

Заключение:

Снижение числа дифференцированных нейронов в хилусе позволяет рассматривать пифитрин-α как потенциальный терапевтический агент для предотвращения развития аберрантного нейрогенеза.

Работа была профинансирована за счет гранта № РФФИ 19-015-00070.

Литература

1. Blümcke I. et al. Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy //Hippocampus. – 2001. – Т. 11. – №. 3. – С. 311-321.
2. Crespel A. et al. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy //Neurobiology of disease. – 2005. – Т. 19. – №. 3. – С. 436-450.
3. Jessberger S., Parent J. M. Epilepsy and adult neurogenesis //Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2015. – Т. 7. – №. 12. – С. a020677.
4. Kokaia M. Seizure-induced neurogenesis in the adult brain //European Journal of Neuroscience. – 2011. – Т. 33. – №. 6. – С. 1133-1138.
5. Cho K. O. et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline //Nature communications. – 2015. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-13.
6. Danzer S. C. Contributions of adult-generated granule cells to hippocampal pathology in temporal lobe epilepsy: a neuronal bestiary //Brain Plasticity. – 2018. – Т. 3. – №. 2. – С. 169-181.
7. Engel T. et al. Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus //Cell death & disease. – 2010. – Т. 1. – №. 10. – С. e79-e79.
8. Glazova M. V. The role of p53 protein in the regulation of neuronal differentiation

- //Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2016. – T. 46. – №. 9. – C. 984-991.
9. Luo Y. U. et al. Delayed treatment with a p53 inhibitor enhances recovery in stroke brain //Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society. – 2009. – T. 65. – №. 5. – C. 520-530.

Impact of p53 on the differentiation of newborn cells of the dentate gyrus during audiogenic kindling

A.A. Kulikov, N. A. Dorofeeva, M. V. Glazova, E. A. Lavrova E. V.

Chernigovskaya

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

email: alexey.kulikov@iephb.ru

Abstract: One of the main challenges of modern neurobiology is finding new treatment approaches to prevent structural abnormalities in the brain, specifically, in the hippocampus affected by epileptic activity. The aim of this work was to study the effect of pifitrin- α , a chemical inhibitor of the proapoptotic protein p53, on the development of structural changes in the hippocampus at the initial stage of epileptogenesis. Treatment with pifitrin- α led to a decrease in the neural differentiation rate of newborn cells in the hilus therefor pifitrin- α can be a candidate as new therapist agent against epilepsy.

Key words: neurogenesis, apoptosis, p53, autophagy, epilepsy

УДК 612.821

ЭТАПЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ СОЗНАНИЯ ПРИ ФОРСИРОВАННОМ ПРОБУЖДЕНИИ ИЗ ТРЕТЬЕЙ СТАДИИ ОРТОДОКСАЛЬНОГО СНА И ИЗ ПАРАДОКСАЛЬНОГО СНА

Левкович К.М.¹, Сажин С. С.^{1,2}, Украинцева Ю.В.¹

¹*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

²*ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского,
Москва, Россия.*

E-mail: kliaukovich@ihna.ru

Аннотация: Данная научная работа направлена на выяснение механизмов поддержания сознания и последовательности их активации при пробуждении от сна. Так в первые секунды пробуждения наша способность обрабатывать информацию, поступающую извне, нарушена, возможна лишь автоматическая детекция простых изменений сенсорных характеристик стимулов. Даже когда в ЭЭГ восстанавливается альфа-ритм, реакции на значимый стимул могут отсутствовать, или быть замедленны. Таким образом, доминирования альфа-ритма в ЭЭГ еще недостаточно для восстановления сознательных процессов. Различия между пробуждениями из двух фаз сна касаются, прежде всего, их скорости: и восстановление альфа-ритма, и восстановление своевременной осознанной реакции на целевой стимул при пробуждении из парадоксального сна происходит быстрее, чем при пробуждении из 3 стадии.

Ключевые слова: сознание, ЭЭГ, альфа-ритм, вызванные потенциалы, моторный ответ, третья стадия сна; парадоксальный сон

Переход от сна к бодрствованию не является одномоментным процессом и представляет собой континуум состояний, представляющих интерес для исследования механизмов сознания. В частности, для выявления минимального уровня активации мозга, достаточного для сознательного восприятия внешних сигналов и реагирования на них.

До сих пор нет единого мнения, активация каких структур необходима для поддержания бодрствующего сознания [1]. Есть гипотеза, что для бодрствующего сознания необходим альфа-ритм, возможно также, что имеет значение и его распределение по коре [2].

Поэтому целью данной работы было изучение последовательных этапов восстановления сознательной реакции на внешние стимулы при пробуждении из третьей стадии ортодоксального сна и из парадоксального сна. Задачами было: 1) определить момент пробуждения, на котором восстанавливается своевременная моторная реакция на значимые стимулы; 2) определить момент, на котором восстанавливается альфа-ритм в суммарной ЭЭГ; 3) определить момент, на котором восстанавливаются когнитивные компоненты ВП в ответ на появление значимых сигналов; 4) сопоставить особенности выявленных нами последовательных этапов пробуждения из третьей стадии ортодоксального сна и пробуждения из парадоксального сна.

Методика: Для того чтобы проследить за изменением степени осознанности реакции на стимулы в процессе перехода от сна к бодрствованию, мы использовали метод регистрации и анализа вызванных потенциалов (ВП) в ответ на звуковые последовательности парадигмы local-global [3]. Данная парадигма предполагает отслеживание 2-х типов изменений в предъявляющихся последовательностях звуков: локальных нерегулярностей (ЛН) или простых изменений стимулов – появление одного отличающегося

звука; либо глобальных нерегулярностей (ГН) или сложных изменений – появление отличающегося паттерна звуков. В результате эта парадигма дает возможность разграничить реакции, соответствующие разным уровням сознания: низкому, или неосознанному, и высокому – осознанному и направленному.

□ - звук 1 (485-970-1455 Гц)
 ■ - звук 2 (515-1030-1545 Гц)

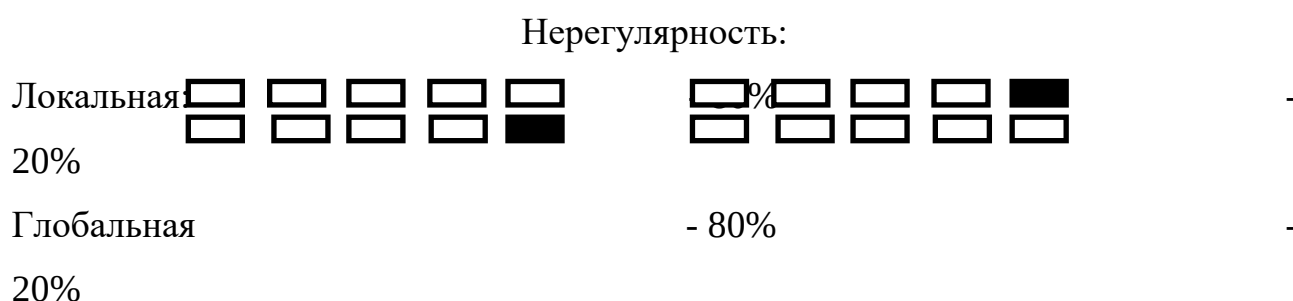


Рис. 1. Парадигма local-global в нашем исследовании. Два типа нарушения регулярности: локальный и глобальный. При локальном нарушении регулярности 80% времени звучит локал стандарт и 20% - локал девиант, в котором появляется отличающийся звук. При глобальном нарушении регулярности 80% времени звучит глобал стандарт и 20% - глобал девиант, т.е. появляется отличающаяся пачка звуков.

5 здоровых добровольцев участвовали в 43 экспериментах с регистрацией полисомнограммы ночного сна: в 21 эксперименте с форсированными пробуждениями из 3 стадии и в 22 экспериментах с форсированными пробуждениями из парадоксального сна (по 3-5 пробуждений за ночь, всего проанализировано 79 пробуждений из 3 стадии и 48 пробуждений из парадоксального сна). ВП и нажатия на кнопку на целевые сигналы (либо на отличающийся звук, либо на отличающуюся пачку) регистрировались в

бодрствовании до ночного сна, а также ночью во время форсированных пробуждений от парадоксального сна. Для этого по достижению испытуемым или третьей стадии сна, или парадоксального сна подавался громкий пробуждающий звук, после которого следовала одна из последовательностей. После 2 минут отслеживания звуковых сигналов и реагирования доброволец мог заснуть до следующего пробуждения.

Результаты:

Несмотря на то, что ортодоксальная и парадоксальная фазы сна совершенно различны как по уровню активации мозга, так и по характеру его биоэлектрической активности, мы выявили некоторые общие закономерности пробуждений из них. В частности, и при пробуждении из 3 стадии и при пробуждении из парадоксального сна сначала восстанавливается альфа-ритм в ЭЭГ и только потом – адекватный двигательный ответ на значимые стимулы. Поэтому мы разделили весь процесс пробуждения, как из 3 стадии ортодоксального сна, так и из парадоксального сна, на 3 этапа. 1 этап: в ЭЭГ преобладают дельта- либо тета-волны, моторный ответ на значимые сигналы не регистрируется. 2 этап: в ЭЭГ доминирует альфа-ритм, моторный ответ отсутствует или замедлен. 3 этап: моторный ответ на значимые стимулы полностью восстанавливается.

Анализ суммарной ЭЭГ и моторных реакций на целевые стимулы показал, что различия между пробуждениями из двух фаз сна касаются, прежде всего, их скорости: и восстановление альфа-ритма, и восстановление своевременного моторного ответа при пробуждении из парадоксального сна происходит быстрее, чем при пробуждении из 3 стадии. Так при пробуждении из третьей стадии сна первая вспышка альфа-ритма регистрируется спустя 19 ± 26 мс от начала предъявления звука сирены, в то время как при пробуждении из

парадоксального сна – спустя 4 ± 2 мс ($p < 0.005$). Так и первый своевременный моторный ответ на значимую пачку при пробуждении из третьей стадии сна регистрируется позже, чем при пробуждении из парадоксального сна (34 ± 26 мс и 23 ± 22 мс, соответственно, $p < 0.05$).

Анализ вызванных ответов исходно проводился для каждого испытуемого отдельно. Но поскольку анализ индивидуальных ВП показал сходные результаты, данные пяти добровольцев были объединены.

В бодрствовании в ответ на ЛН, т.е. появление отличающегося звука, регистрируется негативность рассогласования (72–140 мс, $p = 0,034$) и следующий за ним P3a/P3b комплекс (156–556 мс, $p = 0,002$), а в ответ на ГН, т.е. появление отличающейся пачки звуков, – N200 и P300 (140–300 мс, $p = 0,002$ и 268–696 мс, $p = 0,002$, соответственно).

Анализ ВП на последовательных этапах пробуждений из 3 стадии сна показал, что выраженные когнитивные компоненты в ВП на значимый сигнал возникают не сразу, впервые их можно зарегистрировать на 2 этапе, только в ответ на появление ЛН (P3a, 220–300 мс, $p = 0,012$), и то лишь в тех предъявлениях, когда было зарегистрировано нажатие на кнопку, хоть и замедленное. В ответ на ГН значимые когнитивные компоненты ВП на 2 этапе выявлены не были. На 3 этапе пробуждения, после восстановления своевременного моторного ответа, характерного для бодрствования, когнитивные компоненты ВП также были сопоставимы с бодрствующими (для ЛН: НР (116–144 мс, $p = 0,048$) и P3a/P3b комплекс (164–284 мс, $p = 0,004$ и 396–672 мс, $p = 0,002$) и для ГН: N200 и P300 (164–240 мс, $p = 0,046$ и 300–696 мс, $p = 0,004$).

Анализ вызванных потенциалов (ВП) мозга на последовательных этапах пробуждений из парадоксального сна показал, что когнитивные компоненты

ВП в ответ на значимые сигналы регистрируются даже на первых двух этапах пробуждения, когда моторный ответ отсутствует или замедлен (ЛН для 1 и 2 этапов: 192-256 мс, $p=0,038$ и 220-264 мс, $p=0,018$ и ГН для 1 и 2 этапов: 168-224 мс, $p=0,016$ и 140-256 мс, $p=0,004$). На 3 этапе пробуждения, после восстановления своевременного моторного ответа, в ответ на ЛН были зарегистрированы НР и Р3а (116–136 мс, $p=0,014$ и 160–268 мс, $p=0,008$), в ответ на ГН - N200 и Р300 (132–240 мс, $p=0,002$ и 256–472 мс, $p=0,004$).

Таким образом, при пробуждении из парадоксального сна наша способность к детекции изменений сигналов восстанавливается раньше, чем при пробуждении из 3 стадии сна. Но свидетельствуют ли выявленные нами когнитивные компоненты ВП об осознанной реакции на значимость сигнала? Чтобы ответить на этот вопрос в отношении реакций на ЛН, мы сравнили ВП в ответ на локал девиант из последовательностей ЛН с ВП в ответ на глобал стандарт из последовательностей ГН. Поскольку локал девиант и глобал стандарт состояли из одинаковых звуков, но находились в разных ролях, т. е. в одних последовательностях это была целевая пачка, а в других – нет, осознанное восприятие целевых пачек проявилось бы в отличающихся ВП. Однако анализ не выявил различий между ВП на локал девиант и глобал стандарт. Аналогично и сравнение ВП на локал стандарт и глобал девиант не выявило различий между ними. Поэтому мы можем заключить, что на первых этапах пробуждения сперва восстанавливается неосознанная детекция простых, сенсорных, изменений стимула, т. е. регистрируется автоматический ответ на отличающийся по частоте звук в пачке, вне зависимости от того, является ли эта пачка целевой или нет. Сознательная реакция на значимые сигналы восстанавливается только на 3 этапе.

Заключение: Переход от сна к бодрствованию не является одномоментным процессом и представляет собой континуум состояний, отражающих процесс перехода от отсутствующего сознания, через его низкоуровневые формы к

высокому уровню, т. е. осознанной обработки информации. Так в первые секунды пробуждения наша способность обрабатывать информацию, поступающую извне, нарушена, возможна лишь автоматическая детекция простых изменений сенсорных характеристик стимулов. Даже когда восстанавливается альфа-ритм, реакции на значимый стимул могут отсутствовать, или быть замедленны. Таким образом, доминирования альфа-ритма в ЭЭГ еще недостаточно для восстановления сознательных процессов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-313-90067.

Литература

27. Koch C., Massimini M., Boly M., Tononi G. Neural correlates of consciousness: progress and problems. // Nat Rev Neurosci. – 2016 – Vol. 17 – PP. 307-321. doi: 10.1038/nrn.2016.22.
28. Vijayan S., Ching S., Purdon P.L., Brown E.N., Kopell N.J. Thalamocortical Mechanisms for the Anteriorization of Alpha Rhythms during Propofol-Induced Unconsciousness. // J Neurosci. – 2013 – Vol. 33 – №27– PP. 11070-11075. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5670-12.2013.
29. Bekinschtein T.A., Dehaene S., Rohaut B., Tadel F., Cohen L., Naccache L. Neural signature of the conscious processing of auditory regularities. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009 – Vol. 106 – № 5 – PP. 1672-1677. doi: 10.1073/pnas.0809667106.

STEPS OF RECOVERY OF CONSCIOUSNESS DURING FORCED AWAKENING FROM SLOW-WAVE SLEEP AND FROM RAPID EYE- MOVEMENT SLEEP

Liaukovich K.M.¹, Sazhin S.S.^{1,2}, Ukraintseva Yu.V.¹

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M.*

Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), the N. V. Sklifosovsky Institute of clinical medicine, Moscow, Russia

Abstract: Current work aims to discover the mechanisms that underline consciousness and successive steps of their activation during awakening from sleep. Albeit during first seconds of awakening our conscious processing of external information is disrupted, preattentive detection of simple changes in sensory characteristics of stimuli preserves. Even when alpha rhythm is restored, motor response to the significant stimulus may be absent or slowed down. Thus, predominated alpha rhythm itself is still insufficient for the restoration of conscious processing. Awakenings from slow-wave sleep (SWS) and rapid eye-movement (REM) sleep, first of all, differ in the speed of recovery: both restoration of alpha rhythm and restoration of timely conscious motor response to the target stimulus during awakening from REM sleep occur faster than during awakening from SWS.

Key words: consciousness, EEG, alpha rhythm, event-related potentials, motor response, slow-wave sleep; rapid eye-movement sleep

УДК 612.821

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПРИ НЕПРАВДИВЫХ (ЛЖИВЫХ) ОТВЕТАХ В ЗАДАЧАХ, ТРЕБУЮЩИХ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ВНИМАНИЯ

Моисеенко Г.А.

¹*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

E-mail: galina_pbox@mail.ru

Аннотация: Исследование нейрофизиологических механизмов обеспечения лжи относится к числу актуальных направлений психофизиологии. Работа направлена на выяснения влияния заведомо ложных ответов испытуемых на характеристики вызванных потенциалов при решении задач, требующих высокой концентрации внимания. Установили, что задача с «заведомо ложными ответами» является более «ресурсозатратным» видом деятельности, чем задача с «правдивыми ответами» и влияет на амплитуду и латентные периоды практически всех компонентов вызванных потенциалов, связанных с селективным вниманием.

Ключевые слова: ложь; селективное внимание; вызванные потенциалы

До сих пор нет ясности в понимании того, как мозгом обеспечивается ложь. Можно ли, с точки зрения работы мозга, рассматривать ложь как отдельный вид деятельности (в противопоставление к правде), а значит предлагать нейробиологическое объяснение (или модель) этого феномена? Или правильной было бы считать ложь просто более ресурсозатратным видом деятельности (по сравнению с правдой) в терминах процессов селективного внимания, принятия решения, прогнозирования возможных последствий в случае раскрытия (например, репутационных рисков) и т.д. [1,2].

Несмотря на довольно длительную историю изучения данного вопроса, недостаточно изученным является изменение характеристик вызванных потенциалов при неправдивых ответах испытуемых в случае решения задач, связанных с высокой концентрацией внимания.

Считается, что внимание может по-разному влиять на все компоненты вызванных потенциалов и зависит от многих факторов (характеристики

стимулов, уровень мотивации и состояния испытуемого, поставленная задача и т.д.) [3,4].

В настоящей работе исследуется изменение характеристик вызванных потенциалов при неправдивых ответах в задачах, требующих высокой концентрации внимания.

Методика: В исследовании принимали участие 10 здоровых испытуемых с нормальной остротой зрения без неврологических патологий. Испытуемые решали 2 задачи классификации объектов изображений живой и неживой природы, отфильтрованных на высоких и низких пространственных частотах. Кадровая частота монитора, на котором предъявляли изображения испытуемым, была равна 60 Гц. Первая задача состояла в том, что испытуемые должны были классифицировать объекты по признакам «четкости/размытости» и «отвечать честно и правильно». Вторая задача - классифицировать объекты по признакам «четкости/размытости» и «давать неправдивый (лживый) ответ». В дальнейшем сравнивались характеристики основных компонентов вызванных потенциалов, на которые влияет селективное внимание (C1, N1, P1, P2, N2, N170, P3, SNV), во всех областях мозга при решении обеих задач.

Результаты: Сравнительный анализ вызванных потенциалов между двумя исследуемыми задачами выявил достоверные различия ($p < 0,05$) в случае истинных и неправдивых (лживых) ответов испытуемых. При задачах с лживыми ответами увеличивается амплитуда практически всех анализируемых компонентов вызванных потенциалов. Больше всего это выражено во фронтальных (компонент C1, P2, SNV), центральных (компонент N1, N2) и правой височной (компонент P2) областях мозга. В теменных областях было отмечено уменьшение амплитуды и латентности компонента P3.

Заключение: Результаты исследования показали, что при выполнении задач, требующих высокой концентрации внимания, в случае неправдивых (лживых) ответов задействуется больше ресурсов мозга, чем при правдивых ответах, что выражается в повышении амплитуды компонентов вызванных потенциалов, связанных с селективным вниманием.

Литература

1. Киреев М. В. Системная организация работы мозга при обеспечении целенаправленного поведения. г. Санкт-Петербург.- 2017. [Место защиты: С.-Петербург. гос. Ун-т].- 304 с.
2. Киреев М.В., Коротков А.Д., Медведев С.В. Исследование методом функциональной магнитно-резонансной томографии мозгового обеспечения сознательной лжи// Физиология человека. Т. 38. №1.- 2012.- с.41-51.
3. Наатанен Р. Внимание и функции мозга. М.: Изд-во МГУ.- 1998.- 560 с.
4. Luck S.J., Emily S. Kappenman. Erp components and selective attention.// FIRST-PROOF, 24.05.2011. GLYPH. -P. 295-327.

CHARACTERISTICS OF EVOKED POTENTIALS IN CASE OF UNTRUTHFUL (LYING) ANSWERS IN TASKS THAT REQUIRE HIGH CONCENTRATION OF ATTENTION

Moiseenko G.A.¹

¹ *I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint
Petersburg, Russia*

Abstract: The study of neurophysiological mechanisms of providing lies is one of the most relevant areas of psychophysiology. The work is aimed at clarifying the influence of deliberately lying answers of the subjects on the characteristics of

evoked potentials when solving tasks requiring high concentration of attention. It was found that a task with "deliberately false answers" is a more "resource-intensive" type of activity than a task with "truthful answers" and affects the amplitude and latency periods of almost all components of evoked potentials associated with selective attention.

Keywords: lie; selective attention; evoked potentials

УДК 57.081.23

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛОКОМОТОРНОМ
ПОВЕДЕНИИ У МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

**Владислав Мыров^{1,2,3}, Дмитрий Божко¹, Георгий Галумов¹, Александр
Половьян¹, София Колчанова¹, Алан Калуев**

¹ZebraML, Санкт-Петербург, Россия

²Центр Нейронаук, Хельсинский институт наук о жизни, Хельсинки,
Финляндия

³ Департамент Нейронаук и Биомедицинской инженерии, Университет Аалто,
Хельсинки, Финляндия

⁴ Институт Фармакологии, Юговосточный Университет, Чунцин, Китай

E-mail: vladislav.myrov@zebraml.com

Аннотация: Изменения в движении модельных организмов используются для определения эффекта лекарственных веществ на этапе доклинических испытаний. В этой работе мы представляем новый метод автоматического анализа данных о передвижении животных, определяющий схожесть эффекта с

ранее известными веществами на основе классификации. Метод позволяет установить действующее вещество по отрывкам записей движения, сравнить с базой данных и получить возможный поведенческий эффект.

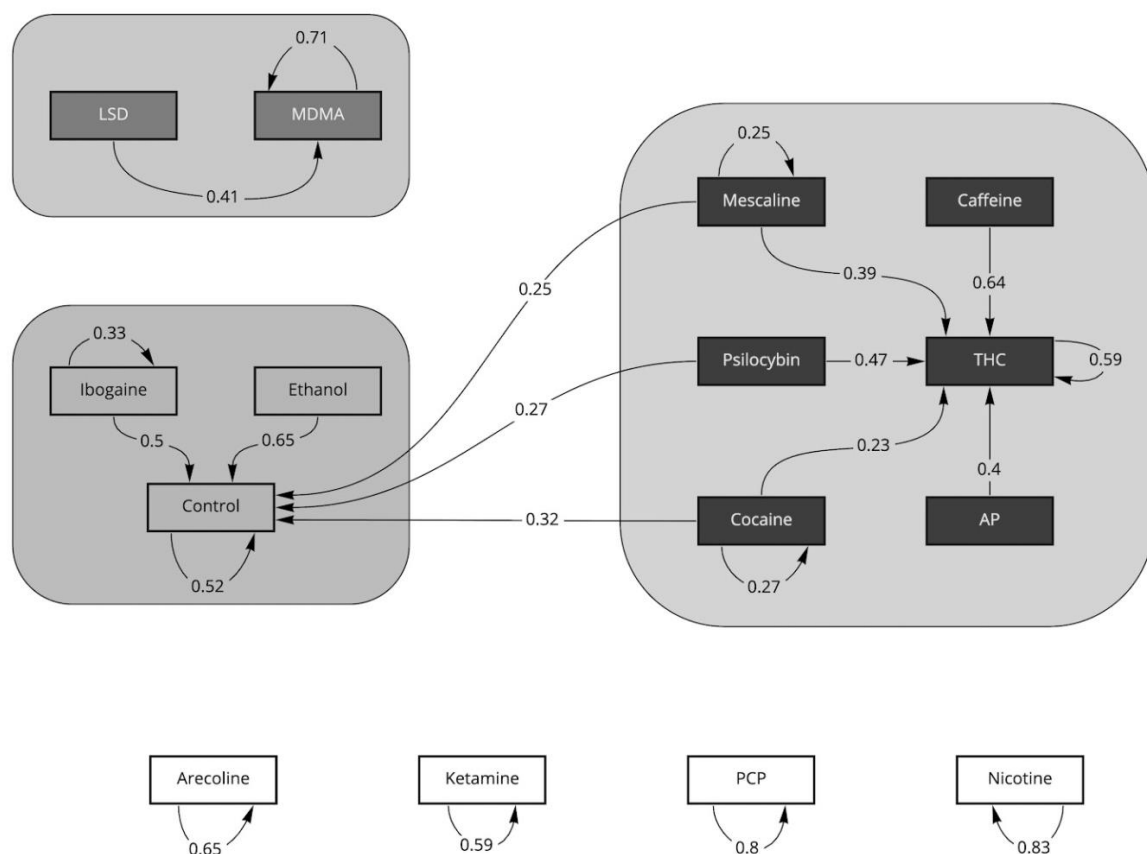
Ключевые слова: локомоция; данио-ренио; нейронные сети; машинное обучение; классификация;

Современное тестирование лекарств на этапе доклинических испытаний включает в себя обработку огромного количества данных по поведению модельных организмов под воздействием исследуемых химических факторов [1]. Для сравнения используются характеристики поведения такие как средняя скорость, ее вариабельность или положение организма в арене. Недостатком такого подхода является невозможность сравнения сложных паттернов поведения, где эти статистики сходны, хотя само поведение различно. Так же невозможно сказать насколько схожи два вещества и выделить самое близкое к исследуемому [2]. В данной работе мы представляем метод исследования сложных паттернов движения, позволяющий обрабатывать большой объем экспериментальных данных и автоматически классифицировать вещества [3].

Методика: В работе использовался датасет видеозаписей свободного передвижения рыб данио-рерио в аквариуме из которых 204 записи относятся к контрольной группе, а остальные относятся к различным психоактивным веществам: ареколин, ЛСД, псилобицин, ТГК, МДМА, ибобаин, никотин, мескалин, кокаин, АР и этанол. Видеозаписи были порезаны на сегменты длиной 30 секунд. На сегментах была обучена сверточная нейронная сеть для предсказания типа действующего вещества. По результатам классификации на тестовой выборке была посчитана точность, построена матрица смежности веществ и оценена схожесть поведенческих шаблонов.

Результаты: Результаты классификации контроля и действующего вещества показали значимое отличие поведения от контрольной группы для ареколина (точность 90%), РСР (точность 87%), никотина (точность 73%) и MDMA (точность 71%). Эксперимент с использованием всех классов показал, что по

результатам схожести веществ получилось три кластера: самый небольшой это объединенный MDMA с ЛСД, большой кластер состоящий из мескалина, псилобицина, кокаина, кофеина, ТНС и АР, а этанол и ибобаин оказались наиболее схожи с контролем т.к. не показали значимых поведенческих отличий (фигура 1.).



Интересно, что при сравнении концентраций, схожее количество вещества показало высокую степень взаимной классификации, например дозы MDMA в 80 и 120мг показали высокую степень взаимной классификации, а также LSD часто предсказывался как MDMA, особенно в высокой дозировке (120мг). Авторы объясняют это единым фармакологическим эффектом, воздействием на серотониновую систему и, следовательно, схожим изменением поведения модельных организмов.

Благодаря использованию не всей записи, а коротких отрезков и последовательного предсказания класса для них, был произведен и анализ

воздействия во времени. В частности, MDMA показало наибольшую схожесть с ареколином на отрезке 5-10 минут, а эффект никотина и ареколина одинаковую динамику во времени.

Заключение: Возможно использование машинного обучения, а в частности сверточных нейронных сетей в задачах автоматизированного анализа поведения модельных организмов. Метод ускоряет анализ, позволяя анализировать большие объемы данных, обработка которых ранее была бы либо слишком долгой, либо попросту невозможной в силу огромного объема ручных работ. Используя данный подход, была классифицирована большая выборка видеозаписей локомоции и выявлены семейства схожих по своему воздействию веществ. Так же данный метод применим не только для анализа движения рыб, но и других модельных организмов, например крыс.

Литература

1. Rupert J. Egan et. al., Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish, Behavioural Brain Research, 2009
2. Fitzgerald, J.A., Kirla, K.T., Zinner, C.P. *et al.* Emergence of consistent intra-individual locomotor patterns during zebrafish development. *Sci Rep* **9**, 13647 (2019).
3. Dmitrii V. Bozhko et. al. Artificial intelligence-driven phenotyping of zebrafish psychoactive drug responses, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2021

AUTOMATED ANALYSIS OF ZEBRAFISH LOCOMOTOR BEHAVIOUR

UNDER THE INFLUENCE OF PSYCHOACTIVE DRUGS

Vladislav O. Myrov^{1,2,3}, Dmitrii V. Bozhko¹, Georgii K. Galumov¹, Alexander I. Polovjan¹, Sofiia M. Kolchanova¹, and Allan V. Kalueff⁴

¹ZebraML, St. Petersburg, Russia

²Neuroscience Center, Helsinki Institute of Life Science, University of Helsinki,
Helsinki, Finland

³Department of Neuroscience and Biomedical Engineering, Aalto University,
Helsinki, Finland

⁴School of Pharmacy, Southwest University, Chongqing, China

Abstract: Behavioural changes in model organisms are often used to quantify an effect of drugs of interest during preclinical trials. In this study we present a novel method of automated analysis of locomotor behaviour to assess similarity with already known drugs based on classification probabilities. The method allows to classify a drug based on short recordings, compare it with a database and quantify a possible behavioural effect.

Key words: locomotion; zebrafish; neural networks; machine learning; classification

УДК 612.821

УСТОЙЧИВАЯ НЕГАТИВНАЯ ВОЛНА В ОТВЕТ НА 40 ГЦ СЛУХОВУЮ
СТИМУЛЯЦИЮ ПРИ СИНДРОМЕ АНГЕЛЬМАНА И СИНДРОМЕ РЕТТА

Неклюдова А.К.¹, Сысоева О.В..¹

¹*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: anastacia.neklyudova@gmail.com

Аннотация: В работе исследуется ответ мозга на 40 Гц-стимуляцию щелчками при синдроме Ретта и синдроме Ангельмана. Ответ нарушен при синдроме Ретта, но не при синдроме Ангельмана. Это указывает на специфичность данного нарушения при синдроме Ретта и позволяет объективно изучать нарушения слухового восприятия и речи при этом заболевании.

Ключевые слова: ЭЭГ, синдром Ретта, синдром Ангельмана, слуховой стационарный ответ, устойчивая волна

Нарушения развития, связанные с генетическими повреждениями, довольно редкие заболевания, но вместе охватывают большую часть населения. При этом

исследования таких состояний имеют два серьезных недостатка: либо фокусируются на описании фенотипов, либо, если и используют объективные методы (например, ЭЭГ), имеют маленькие выборки.

В нашей работе рассматривается электрофизиологический ответ мозга на стимуляцию щелчками с частотой 40 Гц мозга при синдроме Ретта (нарушение в гене MECP2) и при синдроме Ангельмана (нарушение в гене UBE3A). Оба заболевания сопровождаются задержкой когнитивного и моторного развития, а также речевыми нарушениями и симптомами расстройств аутистического спектра (РАС) [1,2].

Известно, что подобная стимуляция в слуховой модальности вызывает 2 типа ответа: навязанный ритм на частоте стимуляции и устойчивую волну негативной полярности, развивающуюся с началом звукового стимула. Первый ответ связывают со способностью детектировать паузы в звуковом сигнале, различать речь в шуме и считают биомаркером работы NMDA-рецепторов на парвальбуминовых интернейронах [3,4]. Устойчивая волна появляется в ответ на протяженный сложный стимул и, вероятно, является показателем работы центра анализа речевой просодии — высоты, интенсивности и длительности звуков [5].

Предыдущие исследования детей с РАС сообщали о снижении у них навязанного ритма, а в недавней работе было впервые показано, что и устойчивая волна нарушена у детей с аутизмом [6]. В связи с этим особенно интересно исследовать эти компоненты у детей с генетическими нарушениями развития, которые могут также сопровождаться аутизмом. Это может пролить свет на природу нарушения речи при таких состояниях.

Методика: В исследовании приняли участие 31 испытуемый с синдромом Ретта (средний возраст $8,26 \pm 4,10$ в диапазоне от 1,9 до 17,1 лет) и 8 — с синдромом Ангельмана (средний возраст $8,36 \pm 2,86$ в диапазоне от 3,94 до 11,53). Группа сравнения состояла из 31 нормотипичного ребенка (НТ) без психиатрических и неврологических нарушений (средний возраст $8,96 \pm 4,17$ в диапазоне от 2,7 до 16,94 лет).

Испытуемые смотрели видео без звука, и одновременно в наушники им предъявлялись последовательности из щелчков с частотой 40 Гц длительностью 500 мс и межстимульным интервалом 500-800 мс, интенсивность 65 дБ. Запись ЭЭГ осуществлялась с помощью 32-канального энцефалографа (система Neurotravel) с частотой дискретизации 500 Гц.

Результаты: Амплитуда навязанного ритма не отличалась от группы сравнения в обеих клинических группах (CP vs НТ: $t(60) = -0.1043$, $p = 0.9173$, CA vs НТ: $t(37) = -0.0563$, $p = 0.9554$), в то время как выраженность устойчивой волны различалась между синдромами. Для детей с синдромом Ангельмана она не отличалась от контрольной группы ($t(37) = 0.5469$, $p = 0.5884$), в то время как при синдроме Ретта была значимо меньше ($t(60) = 4.6542$, $p = 0.00002$). При этом данные испытуемых с синдромом Ретта и синдромом Ангельмана также значимо отличались между собой ($t(33) = -2.1680$, $p = 0.04$).

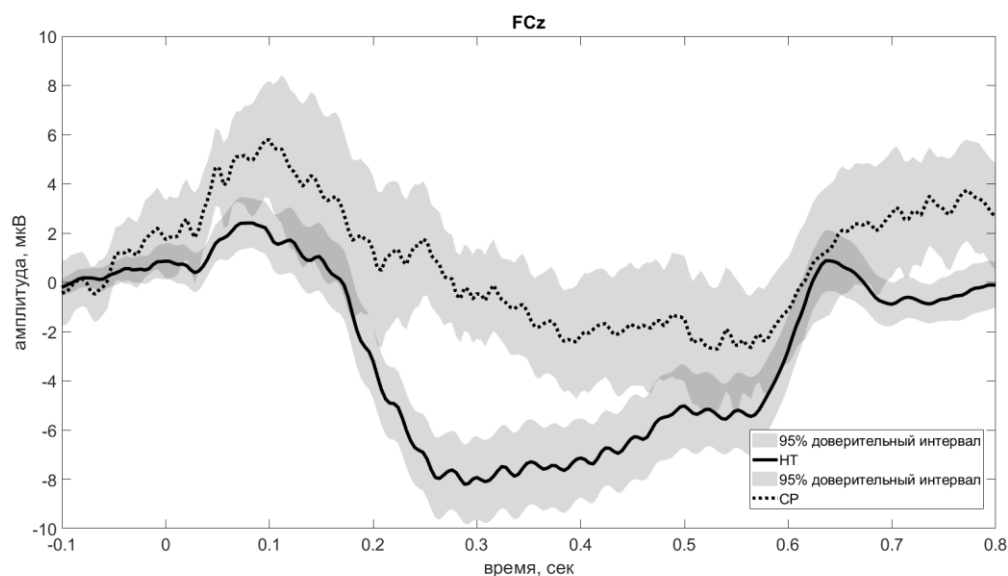


Рис.1 Устойчивая волна в ответ на предъявление последовательностей щелчков с частотой 40 Гц. Пунктиром изображен ответ испытуемых с синдромом Ретта (n=31), линией — контрольной группы (n=31). Светло-серая область обозначает 95% доверительный интервал.

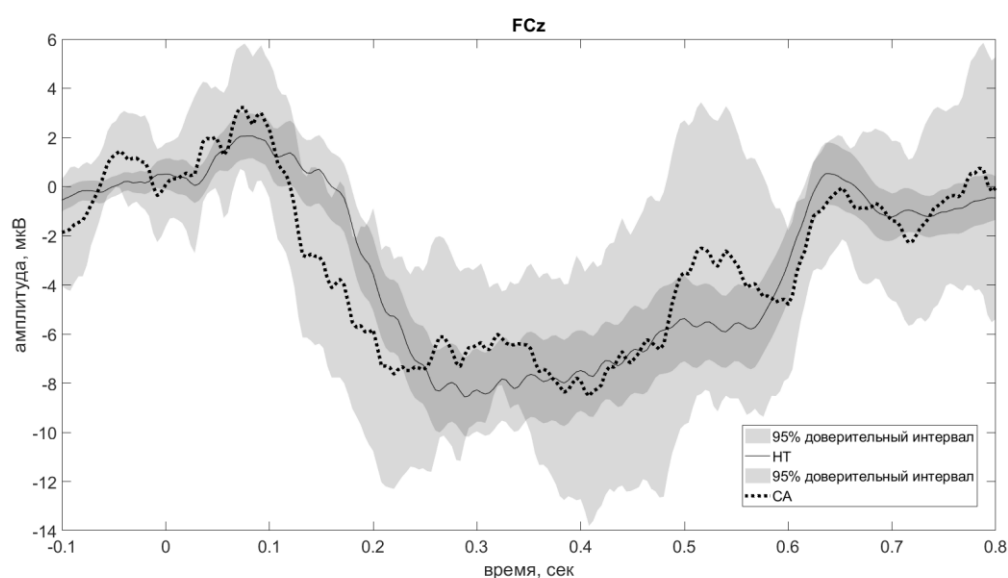


Рис 2. Устойчивая волна в ответ на предъявление последовательностей щелчков с частотой 40 Гц. Пунктиром изображен ответ испытуемых с синдромом Ангельмана (n=8), линией — контрольной группы (n=31). Светло-серая область обозначает 95% доверительный интервал.

Заключение: Исследование показывает электрофизиологические особенности детей с синдромом Ретта по сравнению как с контрольной группой, так и с другим нарушением развития. Устойчивая волна в ответ на стимуляцию щелчками с частотой 40 Гц при синдроме Ретта оказывается нарушена, что может лежать в основе речевых нарушений при этом заболевании. При этом другой показатель — навязанный ритм на частоте стимуляции — не отличается от группы контроля. Результаты исследования позволяют предложить именно устойчивую волну как показатель нарушения слухового восприятия при синдроме Ретта.

При этом, данный показатель не имеет возрастной динамики [6], в отличие от многих других слуховых компонентов, в том числе навязанного ритма, что может позволить использовать устойчивую волну как ранний биомаркер синдрома Ретта.

Литература

1. Mertz L. G. B. et al. Neurodevelopmental outcome in Angelman syndrome: genotype–phenotype correlations //Research in Developmental Disabilities. – 2014. – Т. 35. – №. 7. – С. 1742-1747.
2. Urbanowicz A. et al. Aspects of speech-language abilities are influenced by MECP2 mutation type in girls with Rett syndrome //American Journal of Medical Genetics Part A. – 2015. – Т. 167. – №. 2. – С. 354-362.
3. Ross B., Fujioka T. 40-Hz oscillations underlying perceptual binding in young and older adults //Psychophysiology. – 2016. – Т. 53. – №. 7. – С. 974-990.
4. Sivarao D. V. et al. 40 Hz auditory steady-state response is a pharmacodynamic biomarker for cortical NMDA receptors //Neuropsychopharmacology. – 2016. – Т. 41. – №. 9. – С. 2232-2240.
5. Gutschalk A., Uppenkamp S. Sustained responses for pitch and vowels map to similar sites in human auditory cortex //Neuroimage. – 2011. – Т. 56. – №. 3. – С. 1578-1587.
6. Stroganova T. A. et al. Left hemispheric deficit in the sustained neuromagnetic response to periodic click trains in children with ASD //Molecular Autism. – 2020. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-22.

SUSTAINED NEGATIVE WAVE IN RESPONSE TO 40 HZ AUDITORY STIMULATION IN RETT AND ANGELMAN SYNDROMES

Neklyudova A.K.¹, Sysoeva O.V.¹

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

Abstract: The study investigates the brain response to stimulation by clicks trains at a frequency of 40 Hz in Rett syndrome and Angelman syndrome. The component is disturbed in Rett syndrome, but in Angelman syndrome it does not differ from the norm. This indicates the specificity of impairment in Rett syndrome disorder and allows an objective study of auditory perception and speech in this disease.

Key words: EEG, Rett syndrome, Angelman syndrome, auditory steady-state response, sustained wave

УДК 591.181

ВЛИЯНИЕ КОФЕИНА НА РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ПОЛЕ СА1 ГИППОКАМПА МЫШИ

Новикова М.А.¹, Кондратенко Р.В.¹, Скребицкий В.Г.¹

¹ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия.

E-mail: kondrat_r@mail.ru

Аннотация: Изучение влияния кофеина на различные модели памяти относится к числу актуальных направлений нейрофизиологии. Работа направлена на сравнение влияния кофеина на Е-S-потенциацию (EPSP-spike-potentiation) и долговременную потенциацию.

Ключевые слова: переживающие срезы гиппокампа; кофеин; долговременная потенция; E-S-потенция; память

К числу актуальных направлений нейрофизиологии относится изучение различных форм пластичности нейронов, под которыми понимают изменения эффективности синаптической передачи – кратковременное или долговременное. Вместе с тем, механизмы формирования некоторых форм пластичности, таких как E-S-потенция [1] и метапластичность [2], остаются малоизученными, в то время как влияние психоактивных веществ на параметры синаптической передачи может различаться в зависимости от вида пластичности. Результаты нашей работы могут быть полезны для объяснения противоречий, демонстрирующих различное влияние кофеина на память [3, 4], а также могут быть рассмотрены в ключе участия различных форм нейрональной пластичности в поведенческих моделях формирования памяти и обучения.

Целью работы является изучение влияния кофеина на различные формы долговременной пластичности.

Методика: Исследование проводили на переживающих срезах гиппокампа мышей линии C57BL/6хCBA. Данные были получены в экспериментах на четырех экспериментальных группах: 1) контрольная группа с использованием стандартного протокола индукции долговременной потенции (n=6); 2) контрольная группа с использованием протокола индукции E-S-потенции (n=10); 3) экспериментальная группа с использованием стандартного протокола индукции долговременной потенции (n=7); 4) экспериментальная группа с использованием протокола индукции E-S-потенции (n=9). Срезы в экспериментальных группах подвергались аппликации 30 мкМ кофеина в течение всего времени эксперимента (около 70 мин).

Результаты: Сравнительный анализ изменений параметров вызванных синаптических ответов в контроле и под кофеина с использованием теста ANOVA с поправкой Велча, поправкой на множественные сравнения с двуступенчатой линейной коррекцией Бенджамина, Крюгера и Иекутиели показал, что при использовании стандартного протокола индукции долговременной потенциации кофеин в концентрации 30 мкМ приводит к угнетению долговременной потенциации, оцениваемой как по углу наклона ВПСП ($q=0.024$), так и по амплитуде спайка ($q=0.0331$). В то же время при использовании протокола индукции E-S-потенциации кофеин в той же концентрации не только не приводил к угнетению пластичности, но также вызывал долговременное увеличение угла наклона ВПСП в сравнении с контрольной группой ($q=0.0108$). При этом E-S-потенциация в контрольной группе отражает долговременные изменения эффективности синаптической передачи и сохраняется на протяжении 40 минут после индукции.

Заключение: Сравнение влияния кофеина на различные формы пластичности показало, что эффект кофеина может в корне различаться в зависимости от протокола индукции долговременных форм пластичности. Представленные результаты согласуются литературными данными, описывающими разнонаправленное влияние кофеина на память [3], а так же с описанным участием аденозиновых рецепторов в индукции долговременной потенциации [5, 6].

Литература

30. Pugliese AM, Ballerini L, Passani MB, Corradetti R. EPSP-spike potentiation during primed burst-induced long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. // *Neurosci.* – 1994 – Vol. 62 – №4 – PP. 1021-32. doi: 10.1016/0306-4522(94)90340-9.

31. Vose LR, Stanton PK. Synaptic Plasticity, Metaplasticity and Depression. // Curr Neuropharmacol. – 2017 – Vol. 15 – №1 – PP. 71-86. doi: 10.2174/1570159x14666160202121111
32. Angelucci ME, Cesário C, Hiroi RH, Rosalen PL, Da Cunha C. Effects of caffeine on learning and memory in rats tested in the Morris water maze. // Braz J Med Biol Res. – 2002 – Vol. 35 – № 10 – PP. 1201-8. doi: 10.1590/s0100-879x2002001000013
33. McLellan TM, Caldwell JA, Lieberman HR. A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. // Neurosci Biobehav Rev. – 2016 – Vol. 71 – PP. 294-312. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.09.001
34. Costenla AR, Cunha RA, de Mendonça A. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. // J Alzheimers Dis. – 2010 – Vol. 20 – №. s1 – PP. 25-34. doi: 10.3233/JAD-2010-091384.
35. Rebola N, Lujan R, Cunha RA, Mulle C. Adenosine A2A receptors are essential for long-term potentiation of NMDA-EPSCs at hippocampal mossy fiber synapses. // Neuron. – 2008 – Vol. 57 – №1 – PP. 121-34. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.023.

EFFECTS OF CAFFEIN ON VARIOUS FORMS OF SYNAPTIC PLASTICITY IN THE CA1 AREA OF THE HIPPOCAMPUS

Novikova M.A.¹, Kondratenko R.V.¹, Skrebitsky V.G.¹

¹ *Research Center of Neurology, Moscow, Russia*

Abstract: Research of effects of caffeine on various memory models is relevant in the current context of neurophysiological science. The goal of this study is to compare effects of caffeine on EPSP-spike-potentiation and long-term potentiation.

Key words: acute hippocampal slices; caffeine; long-term potentiation; EPSP-spike-potentiation; memory

УДК 577.25

ИЗУЧЕНИЕ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА В
УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ РАЗЛИЧНОЙ
ДЛИТЕЛЬНОСТИ

Олейник Е.А.¹, Куликов А.А.¹, Наумова А.А.¹, Тыганов С.А.², Глазова М.В.¹

¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН, Санкт-Петербург

¹ФГБУН Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

e-mail: ekaterina.oleynik96@mail.ru

Аннотация: Исследования когнитивных нарушений, вызванных симулированной микрогравитацией, до сих пор остаются малоизученными. Известно, что микрогравитация вызывает нейрохимические изменения в головном мозге. Было показано, что во время космического полета и в условиях симуляции невесомости нарушались пространственная ориентация, процессы распознавания объектов, долговременные задачи, в которых требуются процессы внимания [1]. Гиппокамп является одним из ключевых звеньев в контроле вышеперечисленных процессов, тем самым вызывая огромный интерес [2].

Процессы аутофагии и апоптоза являются ключевыми механизмами для поддержания гомеостаза и выживания клеток [3,4]. Таким образом, цель нашей работы заключалась в изучении аутофагии и апоптоза в нейронах гиппокампа в условиях гравитационной разгрузки различной длительности.

Ключевые слова: гиппокамп, аутофагия, апоптоз, антиортостатическое вывешивание

Методика: в качестве модели гравитационной разгрузки был использован метод антиортостатического вывешивания по Новикову-Ильину в модификации Morey-Holton [5]. Самцы крыс линии Вистар были разделены на 3 группы: изолированный контроль (С), 3-х суточное вывешивание (3HS) и 7-ми суточное вывешивание (7HS). В гиппокампе методами вестерн-блот анализа

были исследованы белки аутофагии(p62, Beclin, LC3B) и апоптоза (Bcl-2,p(S15)-p53,p53, FASR, casp8, casp3), а также был проведен подсчет клеток в СА3 поле гиппокампа и в гранулярном слое зубчатой извилины.

Результаты: Полученные нами данные показали, что в группе 3HS достоверно снижается уровень экспрессии белка p62 и LC3B, что говорит о возможной активации аутофагии. Кроме того, мы наблюдаем активацию casp8, которая может свидетельствовать о начале запуска апоптоза. При этом мы не показали достоверных изменений в количестве клеток ни в гранулярном слое зубчатой извилины, ни в хилусе, ни в поле СА3. Однако, при более длительной гравитационной разгрузке (7HS) мы наблюдали достоверное снижение экспрессии белка Bcl-2 на фоне повышения уровня фосфорилирования p53, что может свидетельствовать о наличии клеточного стресса и запуске апоптотической гибели нейронов. Также в группе 7HS мы наблюдали снижение количества клеток в гранулярном слое зубчатой извилины относительно контроля, что является подтверждением клеточной гибели. При этом также наблюдалось снижение экспрессии Beclin1, что говорит о снижении процессов аутофагии.

Заключение:

Краткосрочная двигательная разгрузка приводит к активации аутофагии, что свидетельствует об активации процессов выживаемости нейронов гиппокампа. При этом, длительная двигательная разгрузка приводит к активации апоптоза и гибели нейронов в зубчатой извилине гиппокампа крыс.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 20-015-00062.

Литература

1. Van Ombergen A., Demertzi A., Tomilovskaya E., Jeurissen B., Sijbers J., Kozlovskaya I.B., Parizel P.M., Van de Heyning P.H., Sunaert S., Laureys S., Wuyts

- F.L. The effect of spaceflight and microgravity on the human brain. // J Neurol. – 2017 - Vol. 264 - PP. 18-22.
2. Anand K.S., Dhikav V. Hippocampus in health and disease: an overview. // Ann Indian Acad Neurol. – 2012 – Vol.15 - № 4 – PP.239–246. doi.org/10.4103/0972-2327.104323.
 3. Badadani M. Autophagy Mechanism, Regulation, Functions, and Disorders. // International Scholarly Research Notices. – 2012 - Vol. 2012. doi.org/10.5402/2012/927064.
 4. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. // Toxicol Pathol. – 2007 – Vol.35 - № 4 – PP.495-516. doi:10.1080/01926230701320337.
 5. Morey-Holton E.R., Globus R.K., Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. // J Appl Physiol. – 2002 – Vol. 92 - PP.1367-77.

ANALYSIS OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN HIPPOCAMPAL NEURONS DURING THE HINDLIMB UNLOADING

Oleinik E.A.¹, Kulikov A.A.¹, Naumova A.A.¹, Tyganov S. A.², Glazova M.V.¹

¹ *Sechenov Institute of evolutionary physiology and biochemistry RAS, Saint-Petersburg, Russia*

² *Institute of Biomedical Problems, RAS, Moscow, Russia*

Abstract: It was previously shown that microgravity induces neurochemical alterations in the brain, such as spatial orientation alteration, object recognition, long-term tasks requiring attention etc. However, data about molecular alterations in the hippocampus in real or simulated microgravity conditions are limited. Here we analyze autophagy and apoptosis in hippocampus neurons during the hindlimb unloading

Key words: hippocampus, autophagy, apoptosis, hindlimb unloading.

УДК 577.25

ИЗМЕНЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ОБЛУЧЕНИЯ

Павлова С.А.¹, Савченко Е.А.², Голанов А.В.², Павлова Г.В.^{1,2}

¹ *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

² *ФГАУ “Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии
имени
академика Н.Н. Бурденко” Минздрава России, Москва, Россия.*

E-mail: pavlova.sweti@yandex.ru

Аннотация: Глиобластомы являются одними из наиболее агрессивных опухолей нервной системы и отличаются устойчивостью к терапии. Данная работа была направлена на оценку эффективности воздействия различных вариантов облучения, в дозах, приближенных к терапевтическим, на культуры глиобластомы человека.

Ключевые слова: опухоли нервной системы, глиобластома, клеточные культуры, миграция, пролиферация.

Среди опухолей нервной системы наиболее агрессивным поведением отличаются глиобластомы. Из-за особенностей развития, при данном типе опухоли наблюдается высокая устойчивость к терапии и, в связи с этим, у пациентов отмечается крайне неблагоприятное течение заболевания и высокий риск рецидива [1,2]. Лучевая терапия является одним из наиболее эффективных видов лечения данного заболевания [3].

Для работы были выбраны две культуры глиобластомы человека: Rozh и Sus\fp2. Данные культуры были облучены на цифровом линейном ускорителе TrueBeam в трех вариантах: проводилось однократное облучение дозой 20 Гр, однократное облучение дозой 24 Гр и трехкратное облучение с суммарной дозой 27 Гр.

Исследования проводились через 6 дней после облучения. В ходе эксперимента было выявлено значительное снижение миграционной активности обеих культур после облучения дозой 20 Гр по сравнению с необлученным контролем. При оценке пролиферативной активности культур во всех трех случаях

наблюдается снижение пролиферативной активности, при этом наибольшее снижение по сравнению с контролем отмечено в случае трехкратного облучения. Кроме того, методом проточной цитофлуориметрии было определено соотношение типов клеток в каждой культуре. Так, в обеих культурах при однократном облучении дозой 20 Гр наблюдается значительное увеличение числа клеток, находящихся в состоянии апоптоза, в то время как при двух других вариантах облучения наблюдается резкий рост числа некротизированных клеток при одновременном падении числа апоптотических клеток.

Таким образом, было выявлено, что однократное облучение дозой 20 Гр оказывает лучший эффект, эффективно снижая пролиферативную активность клеточных культур, запуская процессы апоптоза в клетках, не вызывая при этом их некроза. В то время как при повышении дозы облучения наблюдается значительный рост числа некротизированных клеток.

Литература:

1. Wirsching, H.-G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. Gliomas, 381–397. doi:10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2
2. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clin J Oncol Nurs. 2016;20(5 Suppl):S2-S8. doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8
3. Gzell, C., Back, M., Wheeler, H., Bailey, D., & Foote, M. (2017). Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. Clinical Oncology, 29(1), 15–25. doi:10.1016/j.clon.2016.09.015

CHANGES IN THE CHARACTERISTICS OF HUMAN GLIOBLASTOMA CELL CULTURES AFTER VARIOUS TYPES OF IRRADIATION

Pavlova S. A. ¹, Savchenko E. A. ², Galanov A.V. ², Pavlova G. V. ^{1,2}

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *National Medical Research Center of Neurosurgery named after Academician N.N.*

Burdenko,

Ministry of Health, Moscow, Russia

Abstract: Glioblastomas are one of the most aggressive tumors of the nervous system and are resistant to therapy. This work was aimed at assessing the effectiveness of the effect of various types of irradiation, in doses close to therapeutic, on human glioblastoma cultures.

Key words: tumors of the nervous system, glioblastoma, cell cultures, migration, proliferation.

УДК 577.25

НОВАЯ ИЗОФОРМА shGDNF-1: НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА И ЛОКАЛИЗАЦИЯ.

Паршина В.В.¹, Шамадыкова Д.В.¹, Ревущин А.В.¹, Фаб Л.В.¹,
Павлова Г.В.¹.

¹ *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

E-mail: parshina-v-v@yandex.ru

Аннотация: в данной работе изучалась специфичность тканевой локализации новой изоформы shGDNF-1 в зонах головного мозга взрослой крысы и 3-х дневного детеныша крысы. Представлены результаты иммуногистохимических исследований нейрональных и глиальных клеток для оценки природы shGDNF-1-продуцирующих клеток. В работе были показаны нейропротективные свойства этой изоформы на модели болезни Паркинсона мыши. Кроме того, оценена экспрессия shGDNF-1 при онкопатологии, данный пептид был обнаружен в образцах глиомы человека и крысы линии 101.8.

Ключевые слова: GDNF, болезнь Паркинсона, субвентрикулярная зона.

Глиальный нейротрофический фактор (glial cell line-derived neurotrophic factor - GDNF) – это белок, принадлежащий к большой группе белков, называемых нейротрофическими факторами, обеспечивающих развитие

нервной системы в ходе эмбриогенеза, поддержку процесса дифференцировки и способствующих выживаемости различных групп нейронов на протяжении жизни. В норме GDNF синтезируется популяциями нейронов (дофаминовыми нейронами черной субстанции и стриатума, двигательными, чувствительными нейронами и др.) и секретируется паракринно в ряде отделов мозга: коре, гиппокампе, стриатуме, черной субстанции, таламусе, мозжечке, спинном мозге. В случаях повреждения мозга повышение экспрессионной активности GDNF наблюдается и у глиальных клеток – астроцитов, микроглии, а также у макрофагов [1]. Полноразмерный GDNF имеет в своем составе переменные pre- pro- участки и константный mGDNF. В ходе работы с mGDNF была обнаружена его изоформа, названная shGDNF-1. Показано, что shGDNF-1, полученный в результате продуцирования в трансгенных клетках HEK293 и shGDNF-1 синтезированный, обладают схожими нейроиндукторными свойствами.

Методика: Предварительно приготовленные срезы субвентрикулярной зоны и зоны гиппокампа взрослых крыс и 3-х дневных детенышей крыс были окрашены антителами против shGDNF-1 параллельно с NeuN, GFAP, Doublecortin. Срез глиомы человека и крысы линии 101.8 были окрашены антителами против shGDNF-1. Фотографии окрашенных срезов были сделаны на флуоресцентном микроскопе Keyence BZ-9000 (Eurotech, США) и на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM-710-NLO (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

В стриатум опытной группы мышей линии C57BL/7 был введен shGDNF -1 (1 мкг/мл), в стриатум контрольной был введен физиологический раствор. Моделирование болезни Паркинсона было осуществлено путем подкожной инъекции препарата МРТР (40 мг/кг) через три дня после введения shGDNF-1 в стриатум опытной группы. Через 2 недели была произведена перфузия через сердце, изъятие мозга и изготовление срезов с последующей окраской

антителами против тирозингидроксилазы. Производился подсчет TH⁺ клеток с дальнейшим статистическим анализом полученного результата.

Результаты: Нами была определена локализация новой изоформы shGDNF-1 в мозгу взрослой здоровой крысы в области субвентрикулярной зоны, а также в зоне гиппокампа у 3-х дневного детёныша крысы. Помимо этого, по результатам иммуногистохимического окрашивания срезов субвентрикулярной зоны антителами против shGDNF-1 совместно с NeuN, GFAP, Doublecortin мы обнаружили присутствие shGDNF-1 в NeuN⁺ и DCX⁺ клетках. Также данная изоформа была обнаружена в образцах глиомы человека и глиомы крысы линии 101.8.

На модели Болезни Паркинсона мышей линии C57/BL7 нами был показан нейропротективный эффект изоформы shGDNF-1.

Заключение: По результатам иммуногистохимического окрашивания мы можем предположить, что у здоровых взрослых крыс shGDNF-1 локализован в субвентрикулярной зоне, у детенышей, помимо этого, он присутствует и в зоне гиппокампа в небольшом количестве. Также, по итогу совместного окрашивания антителами против shGDNF-1 с NeuN, GFAP, Doublecortin, вероятно, что shGDNF-1 присутствует в молодых и зрелых нейронах.

Также было показано, что выживаемость дофаминергических нейронов в зоне черной субстанции мышей с болезнью Паркинсона достоверно выше в опыте с предварительным введением shGDNF-1 в стриатум по сравнению с контролем без него, что доказывает нейропротективный эффект изоформы.

.

Литература

1. Duarte Azevedo M., Sander S., Tenenbaum L. GDNF, A Neuron-Derived Factor Upregulated in Glial Cells during Disease //Journal of clinical medicine. – 2020. – Vol. 9. – №. 2. – P. 456

shGDNF-1: NEUROPROTECTIVE EFFECTS AND LOCALIZATION

Parshina V.V.¹, Shamadykova D.V.¹, Revishchin A.V.¹, Fab L.V.¹, Pavlova G.V.¹.

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

Abstract: In this work, we studied the specificity of tissue localization of the new isoform shGDNF-1 in the brain zones of an adult rat and a 3-day-old rat puppy. The results of immunohistochemical studies of neuronal and glial cells to assess the nature of shGDNF-1-producing cells are presented. The neuroprotective properties of this isoform were shown in the mouse Parkinson's disease model. In addition, the expression of shGDNF-1 in oncopathology was assessed; this peptide was found in human and rat glioma samples of the 101.8 line.

Keywords: GDNF, Parkinson's disease, subventricular zone

УДК 159.955.2, 159.955.6

ФОРМИРОВАНИЕ ИЛИ АКТУАЛИЗАЦИЯ ПОНЯТИЙ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ СЛОЖНОСТИ У ДВУХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Пахомов К.В.¹, Голубева И.Ю.², Тихонравов Д.Л.^{1,3}

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

2 Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
3 Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург,
Россия

e-mail: pakhomovk72@gmail.com

Аннотация: Целью исследования было изучение способности двух возрастных групп детей к формированию или актуализации эмпирических понятий на основе одного и двух признаков. Полученные результаты показали, что скорость формирования понятий на основе одного или двух признаков достоверно не отличалась у 3-4- и 4-5-летних детей. Однако, у рассмотренных групп детей фактор сложности задания играл определяющую роль при формировании понятий.

Ключевые слова: формирование понятий, индуктивная и дедуктивная функции рассудка, дети дошкольного возраста.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на многолетние исследования, проблема изучения интеллекта остается одной из главных задач современной междисциплинарной когнитивной науки. На наш взгляд, интеллект – это сложная мыслительная организация когнитивных процессов, обеспечивающая процесс принятия решений с помощью трёх высших специфических функций – рассудка, способности суждения и разума. В настоящей работе мы изучили первые две когнитивные функции. Рассудок – это высшая индуктивная когнитивная функция, которая образует общие понятия в результате синтеза множества отдельных представлений (наглядных образов). Способность суждения – это дедуктивная функция рассудка, которая способна при помощи определённых

правил принять решение о том, входит ли конкретный эмпирический предмет в то или иное уже сформированное общее эмпирическое понятие.

В научной литературе имеется значительное количество экспериментальных работ, посвящённых изучению формирования понятий рассудка у детей разного возраста [1, 3, 5-7]. В наших предыдущих работах [2, 4] мы изучали скорость формирования понятий, основанных на одном признаке (простые понятия) у 4-5-летних детей. Однако, мы не нашли специальных работ, где бы сравнивалась скорость формирования или актуализации понятий разной степени сложности у детей младшего и среднего дошкольного возраста.

Целью исследования было изучение способности 3-4- и 4-5-летних детей к формированию или актуализации эмпирических понятий на основе одного и двух признаков.

МЕТОДИКА

Участники исследования:

Всего в исследовании участвовал 21 ребенок в возрасте от 3-х до 5 лет (медиана 48 месяцев - 4 года), 15 мальчиков и 6 девочек. Участники исследования были разделены на две возрастные группы: 3-4 года (10 человек; медиана 40 месяцев – 3 года 4 месяца) и 4-5 лет (11 человек; 52 месяца, 4 года 4 месяца).

Геометрические фигуры для выбора:

Плоские и объёмные геометрические фигуры разной конфигурации были одинакового светло-зелёного цвета, но разного размера (большие, средние и малые) и крепились к платформам аппарата вертикально. Количество фигур было достаточно большим для того, чтобы фигуры реже повторялись во время опыта (по 15-16 штук на каждый тип фигур и, соответственно, общее количество фигур составляло 93 фигуры).

Описание пробы:

Любая проба (сочетание 4-х фигур при одновременном их предъявлении) начиналась с опускания непрозрачного экрана: участник мог видеть фигуры на аппарате, но не мог до них дотянуться. Через 5 секунд опускался прозрачный экран, и испытуемый мог выбрать любую из этих 4-х фигур, нажав на неё. Если он выбирал правильную фигуру, то автоматически получал подкрепление. Если испытуемый ошибался, то автоматически блокировались все ячейки, и участник не получал подкрепления в этой пробе.

Формирование (актуализация) понятия большего/меньшего размера или понятия плоской/объёмной формы (участие 1-го признака – либо размера, либо формы):

Исследовали самостоятельный выбор испытуемого (без инструкций со стороны исследователя) одного изображения из 4-х возможных. В каждой пробе предъявляли только два размера фигур. При формировании (актуализации) понятия «большого» или «меньшего» размера использовали либо 4 плоских фигуры, либо 4 объёмных фигуры, которые демонстрировались участнику одновременно в пробе. При формировании (актуализации) понятия «плоской» или «объёмной» формы использовали 4 фигуры одинакового размера, которые одновременно демонстрировались испытуемому в пробе. В обоих типах проб одна фигура отличалась от остальных либо по размеру (Рис.1а), либо по форме (Рис.1б). Именно эту отличающуюся от остальных фигуру должен был выбирать испытуемый, используя вначале метод «проб и ошибок».

Образование понятия с участием 2-х признаков (размера и формы):

Мы провели контрольные исследования, в которых на экспериментальной панели находились 4 группы геометрических фигур, являющиеся всевозможными комбинациями двух размеров и двух форм. Испытуемому вначале необходимо было методом «проб и ошибок» определить определённый тип фигур (например, большая плоская фигура - Рис.1с).

Критерий обученности при формировании (актуализации) понятий:

Мы обучали участников ежедневно до однократного достижения или превышения ими 70%-го уровня выполнения задачи за 1 опытный день. Каждый опытный день подсчитывали число проб с правильными и неправильными ответами и суммировали пробы только в те дни, когда уровень правильных ответов не достигал 70%-го критерия.

Статистическая обработка материала:

При анализе данных использовали статистический пакет программ StatSoft Statistica 10.0. Было установлено, что все выборки данных прошли тест нормальности и поэтому для обработки материала применяли двухфакторный критерий ANOVA (2-way ANOVA).

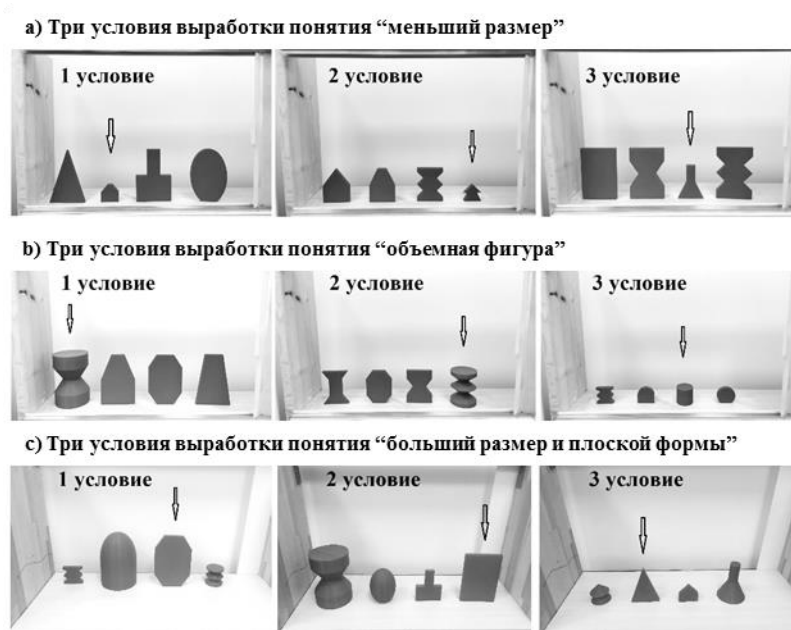
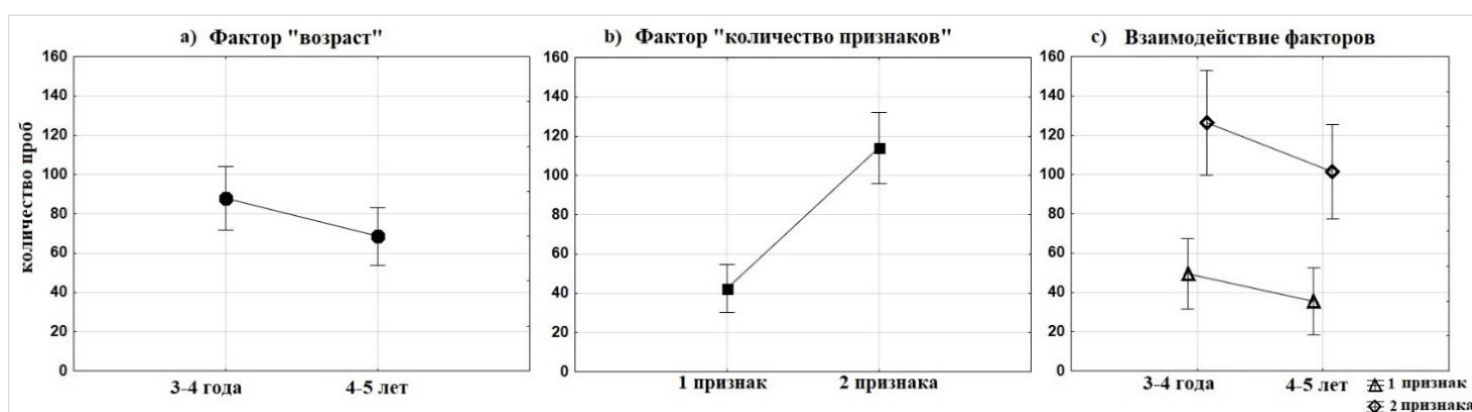


Рисунок 1 - Примеры задач на формирование понятий с одним и двумя признаками (стрелкой показан правильный выбор)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы выяснить, как связана скорость формирования понятий с одним



или двумя признаками с возрастом ребенка, мы использовали двухфакторный дисперсионный анализ с учетом двух факторов: фактор возраст (3-4 года и 4-5 лет) и фактор количество признаков (один признак, два признака) (Рис.2 а,b). Оказалось, что эффекта для фактора возраст не наблюдалось - $F(1, 58) = 3.16, p = 0.08$ (2-way ANOVA), в то время как был выявлен значимый эффект для фактора количество признаков - $F(1, 58) = 41.07, p < 0.001$ (2-way ANOVA). Взаимодействия между этими двумя факторами не было: $F(1, 58) = 0.26, p = 0.61$ (2-way ANOVA) (Рис.2с). Из Рис. 2с видно, что понятия с двумя признаками требовали достоверно больше предъявлений в сравнении с понятиями с одним признаком как у детей 3-4 лет, так и 4-5 лет ($p < 0.001, p < 0.001$ Tukey-Kramer post hoc test, соответственно).

Рисунок 2 - Сравнительный анализ количества предъявлений (среднее арифметическое $\pm$ 95%-ый доверительный интервал), необходимое для достижения 70%-ого уровня правильных ответов при формировании понятий с одним и двумя признаками у детей 3-4 и 4-5 лет. По оси ординат: количество проб-предъявлений. По оси абсцисс: а и с - возраст; b - количество признаков.

ВЫВОДЫ

1. Скорость формирования или актуализации понятий на основе 1-го или 2-х признаков достоверно не отличалась у 3-4- и 4-5-летних детей.
2. Скорость формирования или актуализации понятий на основе 1-го признака была достоверно быстрее, чем таковая на основе 2-х признаков у обеих исследованных групп детей дошкольного возраста.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 20-015-00269 и в рамках государственных заданий № 0134-2019-0005 (ИФ РАН) и № 075-00776-19-02 (ИЭФБ РАН).

ЛИТЕРАТУРА

6. Выготский Л.С. (1996). Мышление и речь. М.: Лабиринт. 416 с.
7. Голубева, И. Ю., Тихонравов Д.Л., Войтенков В.Б., Пашков А.Ю., Первунина Т.М. (2020). Сравнительное исследование формирования понятий с использованием реальных геометрических фигур и контурных изображений в качестве стимулов у детей в возрасте 4–5 лет. Трансляционная медицина. 7(5): 109-118. [10.18705/2311-4495-2020-7-5-109-118](https://doi.org/10.18705/2311-4495-2020-7-5-109-118)
8. Сергиенко Е.А. (2008). Когнитивное развитие довербального ребенка. В сб. Разумное поведение и язык. Вып. 1. М.: Языки славянских культур. 337-365.
9. Тихонравов Д.Л., Войтенков В.Б., Голубева И.Ю., Герасимов А.П., Пашков А.Ю. (2019). Применение методики формирования понятий размера и формы у детей дошкольного возраста для клинических исследований. Педиатр. Научно-практический журнал для врачей. 10(6): 45-52. <https://doi.org/10.17816/PED10645-52>
10. Christie S. (2021) Learning sameness: object and relational similarity across species. Current Opinion in Behavioral Sciences 37:41-46. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2020.06.010>.
11. Gentner D., Hoyos C. (2017) Analogy and Abstraction. Topics in Cognitive Science 9(3):672-93. <https://doi.org/10.1111/tops.12278>.
12. Walker C.M., Bridgers S, Gopnik A. (2016) The early emergence and puzzling decline of relational reasoning: Effects of knowledge and search on inferring abstract concepts. Cognition 156:30-40. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2016.07.008>.

FORMATION OR ACTUALIZATION OF THE CONCEPTS OF THE DIFFERENT
DEGREE OF DIFFICULTY IN THE TWO AGE GROUPS OF PRESCHOOL
CHILDREN

Pakhomov K.V.¹, Golubeva I.Y.², Tikhonravov D.L.^{1,3}

*1 Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy
of Sciences,*

St. Petersburg, Russia

*2 Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg,
Russia*

*3 Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian
Federation,*

St. Petersburg, Russia

Abstract: The goal of the study was to investigate the ability of the two age groups of children to form or actualize empirical concepts based on one and two features. The obtained data showed that the rate of the formation of the concepts based on one or two features did not significantly differ in 3-4- and 4-5-year-old children. However, in the considered groups of the children, the factor of the task complexity played a decisive role in the formation of the concepts.

Keywords: formation of concepts, inductive and deductive function of abstract thinking, preschool children.

УДК 57.087.1 + 616.853

Исследование гиппокампальных ripples в свободном поведении у крыс линии
WAG/Rij

**Д.А. Перевознюк*^{1,2}, I. Iotchev³, Ш.С. Узаков¹, Е.М. Рущкова¹, К.С.
Смирнов¹, Е.Ю. Ситникова¹**

¹ *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва; * email: perevoznukd@mail.ru*

² *ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г.Москва;*
³*EötvösLoránd University (Ethology Department), Будапешт, Венгрия*

e-mail: perevoznukd@mail.ru

Аннотация: Мы исследовали, как часто появляются ripples в определенных временных промежутках перед началом пик-волнового разряда. Нашей целью было выявить возможные закономерности появления гиппокампальных ripples крыс с абсанс-эпилепсией. Использовали два различных метода автоматической разметки ripples. Было установлено, что гиппокамп каким-то образом участвует в проявлениях абсанс-эпилепсии, так как распределение ripples изменяется непосредственно перед разрядом, что свидетельствует о вовлечении данной структуры в эпилептический процесс.

Ключевые слова: Абсанс-эпилепсия, гиппокамп, интракраниальная регистрация, эпидуральная регистрация, ripples

Механизмы возникновения и развития абсанс-эпилепсии до сих пор остаются предметом споров и многочисленных исследований. Существует общепринятое представление о том, что гиппокамп либо вообще никак не вовлекается в абсанс-эпилепсию, либо активность в нем прекращается во время генерализованных пик-волновых разрядов. Гиппокамп – часть старой коры головного мозга, которая играет ключевую роль в формировании памяти и обучения. В гиппокампе лабораторных крыс часто наблюдают высокочастотные вспышки ритмической активности, т.н. ripples. Абсанс-эпилепсия, являясь первично-генерализованной формой эпилепсии, вызвана

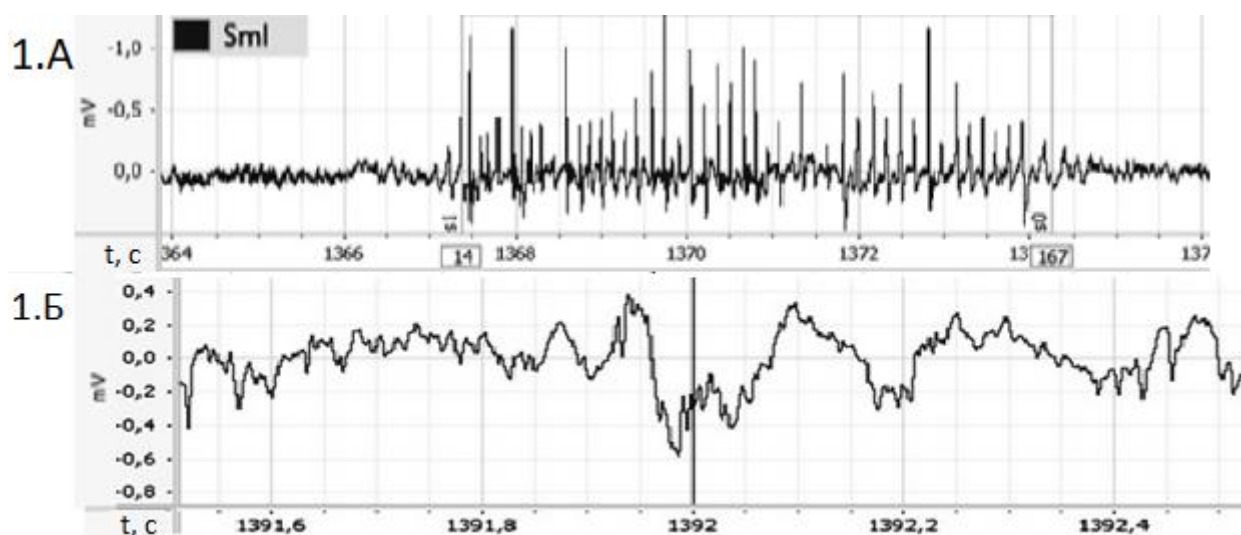
нарушениями в таламо-кортикальной-нейронной сети [1]. Одним из основных признаков абсанс-эпилепсии являются генерализованные пик-волновые разряды [2]. Патологические процессы, вызванные развитием эпилепсии, сопровождаются гипервозбудимостью отдельных нейронов и, в сочетании с дисбалансом торможения и возбуждения, гиперсинхронизацией нейронных сетей. Можно предположить, что подобные изменения должны приводить к локальным вспышкам активности в случае одновременной активации небольших участков сетей (чем, по сути, и являются гиппокампальные ripples).

Наша гипотеза состоит в том, что пик-волновые разряды влияют на распределение ripples.

Работа выполнена на крысах WAG/Rij, которые имеют генетическую предрасположенность к абсанс-эпилепсии и являются надёжной моделью этого заболевания.

Методика: Для изучения локальной активности гиппокампа были использованы интракраниальные электроды. Это две скрученные между собой нихромовые нити в эмалевой изоляции (диаметр 80 мкм), кончики которых были срезаны под углом 45 градусов. Имплантацию электродов проводили под общим хлорагидратным наркозом (внутрибрюшинная инъекция 4% раствора хлоралгидрата в дозе 325 мг/кг). Процедура вживления была проведена при электрофизиологическом контроле расположения регистрирующего электрода, ориентируясь на ответ зубчатой извилины гиппокампа (AP -3.2; L 1.8; H 3.35-3.40), вызванный электрической

стимуляцией перфорантного пути парными электродами (AP -6.8; L 3.4; H 2.25-2.95). Эпидуральные электроды были имплантированы в область лобной коры справа (AP 2, L 2) или соматосенсорной коры справа (AP -2, L 5). Все координаты указаны в мм относительно брегмы согласно атласу [5]. Регистрацию электрической активности головного мозга проводили в условиях свободного поведения с использованием предусилителя (двухпроводное подключение) [7], подключенного к дифференциальному усилителю биопотенциалов. Частота оцифровки составляла 1000 Гц/канал, аппаратные фильтры: notch-фильтр 50 Гц составляющей, фильтр высоких частот (high-pass) – от 1 Гц. Ниже показан пример пик-волнового разряда и ripple.

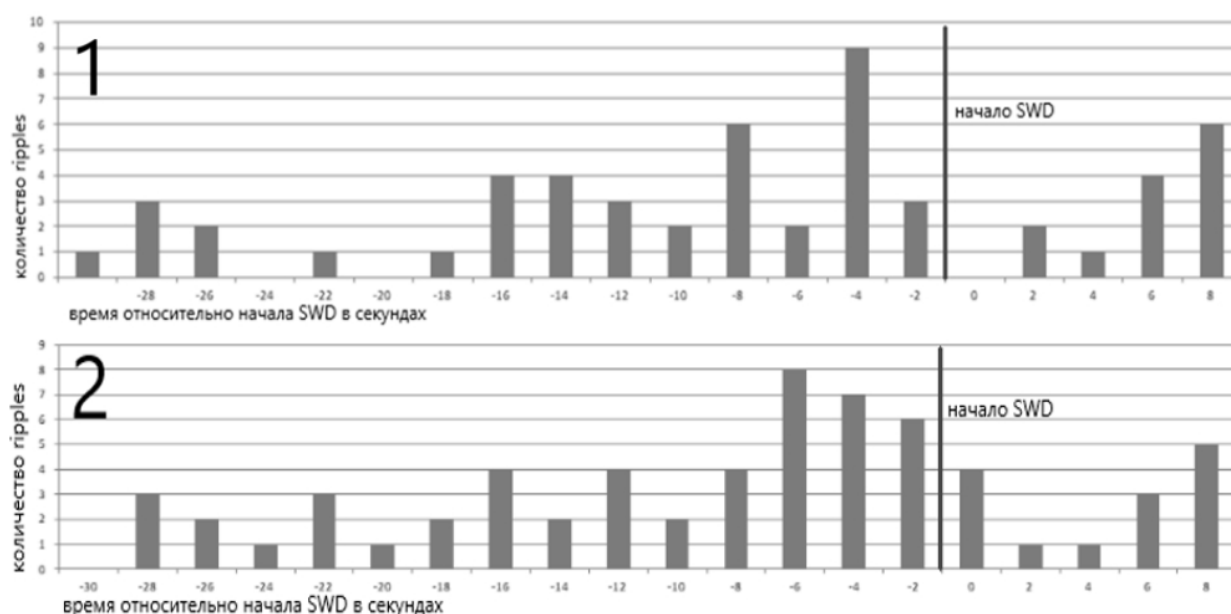


Изображение 1. Примеры записей, полученных от эпидурального и интракраниального электродов у крысы WAG/Rij в свободном поведении. Сверху (1.A) – пик-волновой разряд в соматосенсорной коре (SmI). Снизу (1.B) – ripple в зубчатой извилине гиппокампа.

Анализ сигналов проведен в два этапа – выделение пик-волновых разрядов и автоматизированное выделение ripples. Пик-волновые разряды были выделены вручную: комплексы «пик-волна», где пики следовали с частотой 8-10 Гц; имели резкое начало и продолжительность более 2 с (Изображение 1.A).

Ripples представляли собой всплески активности частотой 100-200 Гц и длительностью от 10 до 100 мс (Изображение 1.Б). Для выделения ripples были использованы два метода. Первый метод выполнял поиск высокочастотных колебаний с помощью нормализации сигнала, он был предложен и реализован соавтором работы Ivaylo Iothcev. Здесь значения амплитуды сигнала переводились в стандартные отклонения, после чего выбирались все события, превышающие 6 отклонений и длящиеся более 10 мс. Второй метод был основан на вычислениях short-time energy и был реализован в программном пакете RIPPLELAB для среды MATLAB. Вычисляли short-time energy – условную меру того, насколько сильно на определенном участке сигнала отличаются значения, отстоящие друг от друга на 6 мс. После был проведён автоматический выбор событий, превышающих критерии мощности и продолжительности. Результаты реализации двух методов были подвергнуты ручной проверке с целью устранения ошибок выделения.

Результаты: На гистограмме ниже представлены распределения ripples относительно начала пик-волнового разряда, полученные с помощью первого (1) и второго (2) методов.



Изображение 2. Результаты проведенного анализа, представленные в виде гистограмм (91 пик-волновой разряд на протяжении чуть более 2 часов).

Заключение: Видно, что после начала пик-волнового разряда ripples появлялись заметно реже, что подтверждает изначальную гипотезу о подавлении активности гиппокампа во время пик-волновых разрядов. Кроме того, наблюдалось увеличение частоты появления ripples непосредственно перед разрядом. Важно отметить, что два разных по своей сути метода дают сходные результаты, что подтверждает верность выводов.

Литература

1. *Зенков, Л.Р.* Клиническая эпилептология (с элементами нейрофизиологии). Москва : МИА, 2002. 416 с.
2. *Ситникова, Е.Ю.* Таламо-кортикальная дизритмия и принципы её диагностики // Известия высших учебных заведений. Известия высших учебных заведений. Прикладная нелинейная динамика, 2020. Т. 28, вып. 3. С. 282-298.
3. *van Luijtelaaar, G., Sitnikova, E.* Global and focal aspects of absence epilepsy: the contribution of genetic models // Neurosci Biobehav Rev. 2006. V. 30, № 7. P. 983-1003.
4. *Pearce, P.S. Friedman, D., Lafrancois, J.J., et al.* Spike-wave discharges in adult Sprague-Dawley rats and their implications for animal models of temporal lobe epilepsy // Epilepsy Behav. 2014. V. 32. P. 121-131.
5. *Paxinos, G., Watson, C.* The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // New York : Acad. Press, 1986. 237 p.
6. *Gelinas, J., Khodagholy, D., Thesen, T. et al.* Interictal epileptiform discharges induce hippocampal–cortical coupling in temporal lobe epilepsy // Nat Med. 2016. V. 22. P. 641–648.
7. *Коршунов, В.А.* Миниатюрный многоканальный преусилитель для регистрации электрофизиологической активности у свободно подвижных животных // Журн. высш. нервн. деят. 2008. Т. 58, вып. 1. С. 111-116
УДК 612.882-616-01/09

ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НА ЛИЦЕ У ЛЮДЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ТРЕВОЖНОСТИ

Питоленко Д.А., Сотников Н.С.

*ФГБОУ ВО «Первый медицинский университет имени И.П. Павлова»,
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

[e-mail: pitolenkod@gmail.com](mailto:pitolenkod@gmail.com)

Аннотация: Целью проведенного исследования было оценить функциональное состояние соматической чувствительности на лице у людей молодого возраста с различным уровнем тревожности. Была выявлена корреляция - у людей с более выраженным уровнем тревожности отмечается более высокая степень температурной чувствительности на лице в оральных отделах по Зельдеру. Это обстоятельство можно рассматривать как неблагоприятный функциональный фон для развития заболеваний тройничного нерва при воздействии на него разнообразных патологических факторов.

Ключевые слова: температурная чувствительность, тройничный нерв, тревожность.

Соматическую чувствительность на лице обеспечивает тройничный нерв. В его строение можно выделить периферический и центральный отделы [1]. Наиболее частой патологией тройничного нерва является невралгия тройничного нерва, проявляющаяся лицевыми болями. Распространенность невралгии тройничного нерва составляет до 30 - 50 больных на 100 000 населения. По данным ВОЗ во всем мире невралгией тройничного нерва страдает более 1 миллиона человек. Болеют чаще женщины в возрасте 50 - 70 лет. Развитию заболевания способствуют различные сосудистые, эндокринно-обменные, аллергические расстройства, а также психогенные факторы.

Цель работы оценить функциональное состояние соматической чувствительности на лице у людей молодого возраста с различным уровнем тревожности.

Методика: В проведенном исследовании применялись клиничко-неврологические, электрофизиологические и нейропсихологические методы диагностики. Полученные результаты были обработаны с использованием программы Statistica и Microsoft Excel 2015. Были обследованы 36 добровольцев в возрастном диапазоне от 24 до 35 лет, прошедшие комплексное обследование в рамках диспансеризации, у которых не установлены тяжелые соматические, неврологические или психические заболевания и не имеющие жалоб на нарушение функции памяти или внимания. В группе преобладали женщины (65,2%) в соотношении 1:1,88. Мужчины (n=12), женщины (n=24). Количественное сенсорное тестирование выполнялось на аппарате TSA II (Medoc, Israel) с компьютерной регистрацией и обработкой данных. На симметричных участках лица по зонам Зельдера определялись пороги температурной чувствительности по методу Marstock. Для изучения уровня тревоги использовалась шкала Ч.Д. Спилбергера в адаптации Ю.Л. Ханина (Spielberger C.D., 2010).

Вначале производилось тестирование по шкале ситуативной тревожности. Перед началом теста пациенту давалась инструкция: «Прочитайте последовательно каждое из написанных ниже утверждений и с учетом того, как вы чувствуете себя в настоящее время, отметьте цифру в соответствующей графе справа. Старайтесь долго не задумываться над вопросами». Далее оценивался уровень личностной тревожности. Пациенту предлагалась инструкция: «Теперь, ваша задача к каждому утверждению выбрать подходящий ответ, в зависимости от вашего обычного состояния». Оценка результатов тестирования осуществлялась по сумме набранных баллов. Менее

30 баллов – низкий, от 31 до 45 баллов – умеренный, 45 баллов и более – высокий уровень тревоги [2].

Результаты: по данным шкалы Ч.Д. Спилбергера в адаптации Ю.Л. Ханина установлено, что высокий уровень личностной тревоги встречался у 52,7% обследуемых. Отмечено, что у обследуемых женского пола выявлялся высокий уровень ситуативной тревоги (40,9%) в сравнении с мужчинами (9,0%). Умеренная выраженность ситуативной тревожности встречалась у 50,5% женщин и у 31,7% испытуемых мужчин. Исследование порогов холодовой чувствительности на лице выявило более низкий порог холодовой чувствительности в отделах расположенных латерально, а более высокий порог в оральных отделах. Оценка тепловой чувствительности имела такие же результаты. Сопоставление данных уровня тревожности и данных сенсорного тестирования выявил высокую корреляционную связь между повышением порога температурной чувствительности и высоким уровнем ситуативной и личностной тревогой у обследуемых женского пола.

Заключение: известно, что болевая чувствительность, выражающаяся в значениях порога боли, является весьма чувствительным интегральным индикатором состояния организма [3]. Обусловлено это тем, что состояние болевой чувствительности отражает динамический баланс активностей ноцицептивной и антиноцицептивной систем. Структуры и биохимические механизмы, составляющие антиноцицептивную систему, не только ограничивают болевые ощущения, но и участвуют в обеспечении всех важнейших функций организма. Данные последних лет доказали связь порога боли с эмоционально-психической сферой. Отмечают связь с психологической конституцией человека, в частности, с типом стратегии адаптации и уровнем тревожности, так как болевая чувствительность в различных областях кожного покрова теснейшим образом связана с состоянием симпатической нервной

системы. В это плане температурная чувствительность изучена в меньшей степени, но наши данные подтверждают, что температурная чувствительность может также отражать состояние психо-эмоционального фона человека, учитывая многообразные связи тройничного нерва со структурами вегетативной нервной системы и экстрапирамидными образованиями.

Литература

1. Синельников Р.Д., Синельников Я.Р., Синельников А.Я. Атлас анатомии человека. В 4-х томах. — 7-е изд., перераб. — М.: Новая Волна, Умеренков, 2010. — Т. 4. — С. 103-104. — 312 с.
2. Малкина-Пых И.Г. Справочник практического психолога. М.: Эксмо - 2008. - 990 с.
3. Василенко А.М., Демин С.А., Малыхин М.Ю. Стимуляционная алгометрия - традиционный метод рефлексодиагностики. - М.: Изд-во МГМСУ – 2003. – 125 с.

ASSESSMENT OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF TEMPERATURE SENSITIVITY ON THE FACE IN PEOPLE WITH DIFFERENT LEVELS OF ANXIETY

Pitolenko D.A., Sotnikov N.S.

*First Medical University named after I.P. Pavlova, Ministry of Health, St. Petersburg,
Russia*

e-mail: pitolenkod@gmail.com

Abstract: The aim of the study was to assess the functional state of somatic sensitivity on the face in young people with different levels of anxiety. A correlation was found - in people with a more pronounced level of anxiety, there is a higher degree of temperature sensitivity on the face in the oral departments according to Zelder. This circumstance can be considered as an unfavorable functional background

for the development of diseases of the trigeminal nerve under the influence of various pathological factors on it.

Key words: temperature sensitivity, trigeminal nerve, anxiety.

УДК 612.82

КОДИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВА И ОБЪЕКТОВ В ГИППОКАМПЕ: РОЛЬ НОВИЗНЫ И ЗНАЧИМОСТИ ОБЪЕКТОВ В ФОРМИРОВАНИИ СПЕЦИАЛИЗАЦИЙ НЕЙРОНОВ

Плюснин В.В.^{1,2}, Торопова К. А.^{1,3}, Ивашкина О.И.^{1,2,3}, Анохин К.В.^{3,4}

¹НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.

²Московский физико-технический институт, Москва, Россия

*³Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия*

*⁴Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К.
Анохина, Москва, Россия*

E-mail: viktor.plusnin@phystech.edu

Аннотация: Изучение нейрональных основ кодирования пространства и объектов относится к числу актуальных направлений нейрофизиологии. Данная работа была направлена на изучение вклада значимости и новизны объектов в формирование когнитивной специализации нейронов гиппокампа мышей. Кроме того, с помощью прижизненного кальциевого имиджинга проводилось исследование соотношения между клеточными репрезентациями индивидуально и социально приобретенной памяти.

Ключевые слова: нейрональное кодирование, кальциевый имиджинг, распознавание объектов, социальная передача вкусового предпочтения, CA1, гиппокамп.

Кодирование информации об окружающей среде традиционно находится в центре внимания когнитивных наук. Нейрофизиологические исследования показывают, что при знакомстве животного с окружающим пространством и объектами активность нейронов изменяется как на сетевом уровне, так и на уровне отдельных нейронов, что проявляется в специализации нейронов относительно этих аспектов среды [1,2]. Значительный объем научных исследований посвящен изучению нейрональных основ кодирования пространства, а также положения и типов объектов [3,4]. Однако остается неясным как влияет степень новизны и значимость объектов на когнитивную специализацию нейронов относительно пространства и объектов. Целью данной работы является сравнительное исследование кодирования объектов и пространства нейронами гиппокампа мыши, а также изучение влияния новизны объектов, значимости объектов и способа приобретения памяти об объектах на формирование когнитивных специализаций нейронов гиппокампа.

Методика: В работе был применен подход, сочетающий оптическую кальциевую визуализацию нейрональной активности и оценку поведения животных при выполнении ими задачи распознавания новых объектов. Задача распознавания новых объектов состояла из двух сессий: в первой сессии животному предъявляли два одинаковых новых объекта, во второй – один из двух знакомых объектов заменяли на новый, расположенный в том же месте, но не знакомый прежде животному объект. Для изучения влияния значимости объектов на формировании когнитивных специализаций нейронов мыши были разделены на 2 группы: в первой группе мышам предъявляли нейтральные объекты, куб и пирамиду, различавшиеся по цвету и тактильным свойствам, во

второй группе мышам предъявляли значимые объекты – кормушки с молотым, ароматизированным запахами корицы или какао. Кроме того, в случае значимых объектов животные последовательно учились распознавать кормушки с разными запахами индивидуально, а затем были обучены в задаче социальной передачи вкусового предпочтения. В этой модели сессия обучения состояла из взаимодействия наивной мыши-наблюдателя с мышью-демонстратором, которой непосредственно перед взаимодействием предъявляли две кормушки с ароматизированным кормом. В ходе сессии обучения мышь-наблюдатель могла свободно взаимодействовать с мышью-демонстратором, получая информацию о том, каким кормом питалось животное-демонстратор.

Для регистрации активности нейронов гиппокампа был применен метод кальциевого имиджинга с использованием миниатюрного микроскопа NVista HD [5]. В экспериментах использовали взрослых самок и самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-5 месяцев. Флуоресцентный кальциевый сенсор GCaMP6s доставляли в мозг мышей посредством микроинъекций частиц аденоассоциированного вируса, кодирующих GCaMP6s под промотором CAG, в поле CA1 гиппокампа мыши. Регистрацию кальциевых ответов нейронов гиппокампа проводили во всех сессиях распознавания новых объектов. Этапы обработки включали коррекцию движений, нормализацию сигнала, выделение клеточных компонент методом главных/независимых компонент (PCA/ICA) и их очистку от артефактов, выделение сигнала с коррекцией на засветки и детекцию значимых кальциевых событий. Одновременно с прижизненным имиджингом проводили видеорегистрацию поведения мышей. Для регистрации и анализа поведения животных был разработан алгоритм в среде визуального программирования Bonsai, позволяющий определить траекторию передвижения животного.

Результаты: Был отработан протокол регистрации кальциевой активности нейронов гиппокампа мышей в свободном поведении с помощью минископа NVista HD, а также разработаны методы обработки кальциевой активности, которые позволяют идентифицировать конкретные местоположения нейронов и временные ряды их активности. Также был разработан алгоритм видеотрекинга животных в визуальной среде программирования Bonsai, позволяющий достоверно определять положение животных в экспериментальной клетке. Дополнительно был разработан комплекс программных инструментов в среде MATLAB и Python для обеспечения синхронизации, анализа и визуализации полученных данных. Успешно проведена долгосрочная (более 2 недель) регистрация кальциевой активности нейронов поля CA1 гиппокампа методом минимикроскопии при выполнении мышами различных поведенческих задач. Кальциевый сигнал был извлечен у 8 мышей (4 мыши в группе нейтральных объектов и 4 мыши в группе значимых объектов), однако одна мышь из каждой группы была исключена из дальнейшего анализа ввиду слабого сигнала. Суммарно было выделено более 900 нейронов (с не менее $n = 3$ кальциевыми событиями), более 700 нейронов имели поля, удовлетворяющие критериям пространственной информативности, для этих полей были определены специализации по отношению к пространству и объектам. Для каждой мыши были построены распределения полей места и объектов в пространстве (когнитивные карты).

Во время сессии обучения мыши исследовали два незнакомых одинаковых объекта и не показали различий в предпочтении к одному из объектов по времени обследования в обеих группах. Во время сессии тестирования в группе распознавания значимых объектов мыши проявляли предпочтение в обследовании к новому объекту, в то время как в группе распознавания нейтральных объектов предпочтений в обследовании к новому объекту не было обнаружено. Таким образом, наши результаты показывают, что значимость объектов играет важную роль в формировании памяти распознавания.

Было показано, что во время сессии обучения когнитивные карты равномерно распределены по пространству клетки, за исключением областей, в которых находились объекты. В данных областях была обнаружена повышенная концентрация полей места как в случае предъявления нейтральных объектов, так и при предъявлении объектов значимых. Мы показали, что характер распределения плотности полей места сохраняется в сессии тестирования и не зависит от степени новизны значимых объектов, при этом плотность полей места оказалась выше вблизи значимых объектов, в сравнении с объектами нейтральными.

В модели социальной передачи вкусового предпочтения было показано, что необходимые для формирования социальной памяти акты взаимодействия с демонстратором отражаются в нейрональной активности гиппокампа животного-наблюдателя. Специализации нейронов относительно вкуса и запаха пищи как нового контрольного, так и знакомого целевого, проявляются в сессиях извлечения социально и индивидуально приобретенной памяти. Однако непосредственно предпочтение в выборе знакомого или незнакомого корма различается от типа опыта, что говорит о включении других структур мозга в принятие решений о выборе корма.

Заключение: Было показано, что плотность полей места выше вблизи как значимых, так и вблизи нейтральных объекты, при этом плотность полей места оказалась выше вблизи значимых объектов, в сравнении с объектами нейтральными. Было обнаружено, что характер распределения плотности полей места сохраняется в сессии тестирования и не зависит от степени новизны объектов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-15-00283 (изучение активности нейронов при распознавании значимых объектов), а при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского

университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект»
(изучение активности нейронов при распознавании нейтральных объектов).

Литература

- O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol*. 1976 Apr; 51(1):78-109.
- Швырков В. Введение в объективную психологию. Нейрональные основы психики. - М.: Институт психологии РАН, 1995 г. —162 с.
- Dumont J., Taube J. The neural correlates of navigation beyond the hippocampus. *Prog Brain Res*. 2015; 219:83-102.
- Hydal A., Skyten E., Andersson S., Moser M., Moser E. Object-vector coding in the medial entorhinal cortex. *Nature*. 2019 Apr;568(7752):400-404.
- Ghosh K., Ziv Y., Schnitzer M. *Nature Methods*, 2011, 8(10), 871-878.

ENCODING OF OBJECTS AND SPACE IN HIPPOCAMPUS: THE ROLE OF NOVELTY AND VALUE OF OBJECTS FOR NEURONAL SPECIALIZATION

V.V. Plusnin^{1,2}, K.A. Toropova^{1,3,4}, O.I. Ivashkina^{1,3,4} and K.V. Anokhin^{3,4}

¹National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

Abstract: Cellular mechanisms of neural code for information about the environment are one of the topical areas of neurophysiology. The work is aimed at studying the influence of the value and novelty of objects to the cognitive specialization of neurons in the hippocampus of mice. In this work, a comparative study of the relationship between cellular representations of individually and socially acquired memories was investigated using the methods of optical calcium imaging.

Key words: neuronal encoding, calcium imaging, object recognition, social memory, CA1, hippocampus.

УДК 57.021

ПРОИЗВОДНЫЕ ДИЗАМЕЩЕННЫХ ПИПЕРАЗИНОВ, АГОНИСТЫ TRPC6 КАНАЛОВ, ДЕМОНСТРИРУЮТ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА В IN VITRO МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Попугаева Е.А.¹, Мелентьева Д.М.¹, Зернов Н.И.¹, Камарян В.С.², Унанян Л.С.^{1,2}, Безprozванный И.Б.^{1,2,3}

¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, лаборатория молекулярной нейродегенерации, Санкт-Петербург, Россия.

² Российско-Армянский Университет, Институт биомедицины и фармации, лаборатория структурной биоинформатики, Ереван, Армения.

³ Юго-западный медицинский центр университета Техаса, Даллас, Техас, США

e-mail: lena.popugaeva@gmail.com

Аннотация: В клинической практике блокаторы ацетилхолинэстеразы и мемантин часто применяются совместно для лечения легкой и умеренной форм болезни Альцгеймера. Однако существенно замедлить развитие заболевания эти препараты не способны. Поэтому совершенствование фармакотерапии БА является одним из приоритетов мировой фармакологии.

Разработка эффективных средств патогенетической терапии БА требует дополнения представлений о механизмах, лежащих в основе нейродегенерации, ведущей к развитию деменции, с оценкой молекулярных и морфологических различий в изменениях нейронов при нормальном старении и при развитии деменции. Очевидная мультифакториальность спорадической формы БА определяет необходимость дальнейших исследований для анализа

патогенетических механизмов и молекулярных основ заболевания, а именно, обнаружения нарушений в молекулярных каскадах, определяющих физиологические функции нейронов. Таким образом, представляется возможным выявить фармакологические мишени, регуляция которых обеспечит терапевтический эффект.

Ключевые слова: TRPC6, нейродегенерация, пиперазины, nSOCE

Большинство случаев наследственной формы БА (нБА) с ранним началом вызываются миссенс-мутациями в генах PSEN1, PSEN2 и APP [1]. Для возникновения спорадической формы БА (сБА) основным фактором риска является преклонный возраст и наличие аполипротеина ε4 [2]. Механизмы нейродегенерации у сБА и нБА схожи, в частности у пациентов с сБА также наблюдается потеря синапсов в гиппокампе и коре, наличие амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Потому имитация генетической формы БА с помощью воздействия на клетки β амилоидами либо путем гиперэкспрессии мутантных белков PSEN1, PSEN2 и APP в клеточных и животных моделях дает возможность создания трансляционной модели БА имитирующей нарушение фенотипа, в частности изменение морфологии шипиков. На основе соответствия механизмов нейродегенерации генетической формы БА спорадической БА и на основании присутствия нарушения стабильности синапсов у пациентов и в генетических моделях БА возможна попытка экстраполяции генетической модели на спорадические формы БА. Таким образом, эффективная терапия генетической формы БА апробированная на *in vitro* и *in vivo* моделях БА может быть применена для лечения спорадической БА [3].

Кальциевая гипотеза БА утверждает, что нарушение Ca^{2+} гомеостаза через аномальное функционирование кальций-пропускающих белков, таких как ионные каналы плазматической мембраны (NMDAR, AMPAR, VGCC), ионные

каналы внутриклеточных депо ЭПР (RyanR, IP3R), депо-управляемые каналы (TRPC6-зависимый), белок образующий митохондриальную пору (mPTP), лежит в основе патогенеза БА [4].

Депо-управляемый вход кальция является уникальным механизмом восполнения недостатка кальция в ЭПР и одним из регуляторов тонкой настройки внутринейронального кальциевого сигналинга. В отличие от NMDAR проводимость ионов кальция для депо-управляемых каналов составляет всего 5-10 pS. Ввиду наличия мощных кальций пропускающих каналов на плазматической мембране нейронов (NMDAR, VGCC, AMPAR), которые затрудняют изучение физиологии и патофизиологии депо-управляемых кальциевых каналов в нейрональных клетках их роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в частности БА, с точки зрения их фармакологической регуляции недостаточно изучена.

Недавно нами было выявлено соединение производное пиперазина 51164, способное прицельно воздействовать на молекулярную мишень депо-управляемого входа кальция, канал TRPC6 [5]. 51164 восстанавливало депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа, защищало постсинаптические контакты от токсического действия мутантного пресенилина и восстанавливало индукцию долговременной потенциации в срезах мозга 5xFAD мышей [5]. Однако неудовлетворительная фармакокинетика и биодоступность 51164 определили необходимость поиска других соединений, прицельно воздействующих на молекулярную мишень, канал плазматической мембраны – TRPC6.

Целью настоящей работы является поиск и верификация нейропротекторных свойств фармакологических агентов, клеточной мишенью которых являются TRPC6-зависимые депо-управляемые кальциевые каналы, замедляющих синаптическую утрату в гиппокампе и восстанавливающих когнитивный дефицит у трансгенных мышей моделей БА.

Методика: Для достижения поставленной цели использовали *in vitro* модель низкой амилоидной токсичности, имитирующей раннюю стадию БА. Был выполнен виртуальный скрининг на основе структурного подобия ранее охарактеризованному нами соединению 51164 в базах данных и химических библиотеках. Отобрано топ 15 соединений из базы данных ZINC, демонстрирующие удовлетворительные физико-химические и фармакокинетические параметры. С помощью биоинформатического подхода отобраны топ 5 соединений способных связываться с активным центром TRPC6. Произведен поиск производных пиперазинов - нейрорептидов, применяемых в медицинской практике. Методом кальциевого имиджинга исследована специфичность пиперазинов к каналам TRPC6 и TRPC3. Исследованы нейропротекторные свойства соединений в первичной культуре гиппокампа в условиях низкой амилоидной токсичности.

Результаты: В результате виртуального скрининга и молекулярного докинга были получены пространственно-энергетические параметры топ 14 соединений, взаимодействующих с TRPC6 и проявляющие высокие значения комплексообразования. На основе полученных конформационных карт были идентифицированы соединения, взаимодействующие с периферийным сайтом (5 соединений) и активным центром мишени (5 соединений). Были выбраны также соединения, которые взаимодействуют как с первым, так и со вторым сайтом (4 соединения) связывания. Необходимо отметить, что в качестве контроля был использован гиперфорин взятый из базы данных DrugBank (DB01892) который является активатором TRPC6. Рассчитаны константы связывания и построены конформационные карты и идентифицированы аминокислотные остатки, входящие в комплексообразование. Взаимодействие в основном несет гидрофобный характер, у некоторых соединений наблюдается единичные водородные связи дистанции, которых не превышают 3.4 Å.

Исследованы аналоги соединения 51164, производные дизамещенного пиперазина. Обнаружено шесть соединений проявляющих активность в отношении каналов TRPC6. Одно соединение показало отсутствие кросспецифичности к каналам TRPC3. Показаны *in vitro* синаптопротекторные свойства новых производных дизамещенных пиперазинов в диапазоне концентраций от 10 до 10нМ. Выполнен *in silico* анализ физико-химических и фармакокинетических параметров соединений производных пиперазинов. Показано, что производные пиперазинов могут выступать в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Показано, что лекарственные средства арипипразол и перфеназин, не влияют на активность каналов TRPC3 и 6, в то время как трифлуоперазин демонстрирует выраженные антагонистические свойства по отношению к TRPC6. Слабые *in vitro* нейропротекторные свойства обнаружены у арипипразола и перфеназина.

Заключение: В результате работы нами впервые обнаружено соединение производное дизамещенного пиперазина, демонстрирующего селективность в отношении канала TRPC6. Кроме того, обнаружено, что существующие на фармацевтическом рынке производные пиперазина - нейролептики, арипипразол, перфеназин и трифлуоперазин не подходят для лечения форм БА с дисфункцией TRPC6 канала.

Работа выполнены при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания по теме «Реализации комплекса мер по повышению эффективности деятельности Российско-Армянского (Славянского) и Белорусско-Российского университетов» (ДС от 08.07.21 № 075-03-2021-050/5) (раздел работ посвященный биоинформатическому поиску и молекулярному докингу).

Работа частично поддержана грантом РФФ № 20-75-10026 (раздел работ посвященный исследованию кросспецифичности соединений к каналам TRPC и анализ нейропротекторных свойств соединений в *in vitro* модели БА).

Литература

1. Rogaev, E.I., et al., Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease // *Genomics*, 1997. 40(3): p. 415-24.
2. Jansen, W.J., et al., Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia A Meta-analysis // *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2015. 313(19): p. 1924-1938.
3. Lippa, C.F., et al., Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway // *Neurology*, 1996. 46(2): p. 406-12.
4. Bezprozvanny, I., Calcium signaling and neurodegenerative diseases // *Trends Mol Med*, 2009. 15(3): p. 89-100.
5. Popugaeva E. et al. Derivatives of piperazines as potential therapeutic agents for Alzheimer's disease // *Mol Pharmacol*. 2019. T. 95, N 4. C. 337-348.

DERIVATIVES OF DISPLACED PIPERAZINES, AGONISTS OF TRPC6 CHANNELS, DEMONSTRATE NEUROPROTECTIVE PROPERTIES IN AN IN VITRO MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

Popugaeva E.A.¹, Melentjeva D.M.¹, Zernov N.I.¹, Kamaryan V.S.², Hunanyan L.S.^{1,2}, Bezprozvanny I.B.^{1,2,3}

¹ *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Laboratory of Molecular Neurodegeneration, St. Petersburg, Russia.*

² *Russian-Armenian University, Institute of Biomedicine and Pharmacy, Laboratory of Structural Bioinformatics, Yerevan, Armenia.*

³ *University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA*

e-mail: lena.popugaeva@gmail.com

Abstract: In clinical practice, acetylcholinesterase blockers and memantine are often used together to treat mild to moderate forms of Alzheimer's disease. However, these drugs are not able to significantly slow down the development of the disease. Therefore, the improvement of AD pharmacotherapy is one of the priorities of world pharmacology.

The development of effective drugs for pathogenetic therapy of AD requires supplementation of the understanding of the mechanisms underlying neurodegeneration leading to the development of dementia, with an assessment of molecular and morphological differences in changes in neurons during normal aging and during the development of the dementia. The obvious multifactoriality of the sporadic form of AD determines the need for further research to analyze the pathogenetic mechanisms and molecular bases of the disease, namely, to detect abnormalities in the molecular cascades that determine the physiological functions of neurons. Thus, it seems possible to identify pharmacological targets, the regulation of which will provide a therapeutic effect.

Key words: TRPC6, neurodegeneration, piperazines, nSOCE

УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ КРЫС НА ОБУЧЕНИЕ В МОДЕЛИ КОНТЕКСТНОГО УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОГО СТРАХА

Посицельская Е.С., Винарская А.Х., Белецкий А.П., Баль Н.В.

ИВНД и НФ РАН, Москва, Россия

E-mail: kateposicel@gmail.com

Аннотация: Изучение влияния индивидуальных различий на поведение и обучение важно для лучшего понимания результатов исследований. Нашей задачей было изучить результат обучения в модели условно-рефлекторного

страха, поведенческие особенности и экспрессию генов в гиппокампе животных, демонстрирующих разный базовый уровень замирания в закрытой камере.

Ключевые слова: условно-рефлекторное замирание; гиппокамп; обучение; индивидуальные различия; экспрессия генов.

Модель условно-рефлекторного страха часто используется при изучении механизмов памяти, так как в ней можно четко зафиксировать момент времени, когда происходит сочетание условного и безусловного стимула. После обучения в модели контекстного условно-рефлекторного страха оценивается уровень замирания животного как реакции страха после сочетания обстановки с электрокожной стимуляцией [1]. Ранее в нашей лаборатории было замечено, что некоторые животные показывают высокий уровень замирания в камере без дополнительного воздействия. Причем уровень замирания может повышаться при повторном помещении в камеру. Была сформулирована гипотеза, что демонстрируемый животными после обучения уровень замирания может быть обусловлен как успешностью обучения, так и индивидуальными различиями.

Одним из участков мозга, который участвует в обучении в модели контекстного условно-рефлекторного страха, является гиппокамп [2], поэтому мы также проводили исследование дифференциальной экспрессии генов в гиппокампе сильно и слабо замирающих животных.

Методика: В нашем эксперименте были задействованы самцы аутбредных крыс линии Вистар возрастом от 4 до 5 месяцев ($n=92$) и от 6 до 9 месяцев ($n=38$). В первый день животные тестировались в открытом поле, во второй - в приподнятом крестообразном лабиринте, также в оба дня животных помещали в закрытую камеру без дополнительного воздействия. Часть животных на

четвёртый день обучали в закрытой камере в модели условно-рефлекторного страха, на пятый день тестировали. Также на 4-5 день производился забор мозга у части молодых животных с разным базовым уровнем замирания, не получавших электрокожную стимуляцию (n=41).

Результаты: Самцы были разделены на группы на основании уровня замирания во второй день при помещении в закрытую камеру без дополнительного воздействия: сильно замирающие (n=15, замирали больше 30% времени) и слабо замирающие (n=47, замирали меньше 30% времени). Мы проанализировали, какие результаты обучения показывают животные из этих групп. Слабо замирающие животные демонстрировали увеличение уровня замирания после обучения. У сильно замирающих животных уровень замирания в камере до и после обучения значимо не различался.

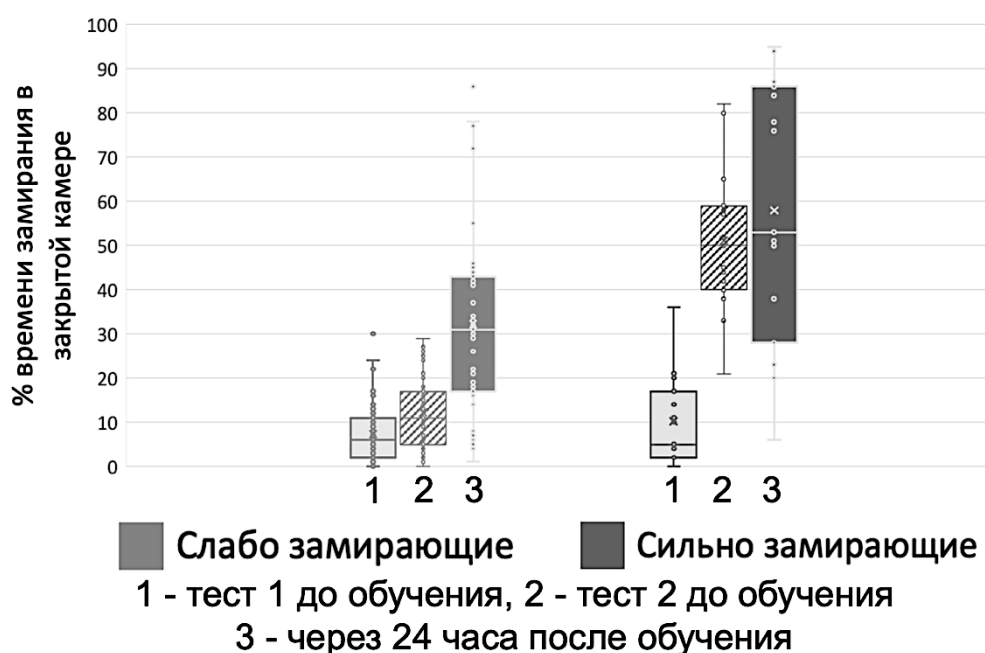


Рисунок 1. Процент времени замирания в закрытой камере слабо и сильно замирающих животных до и после обучения.

Сравнение поведения животных в открытом поле и приподнятом крестообразном лабиринте показало незначительные различия уровня исследовательской и двигательной активности у данных групп.

Образцы семи вентральных и семи дорсальных частей гиппокампа [3] были секвенированы, после чего результаты выборочно проверили методом ПЦР в реальном времени на большей группе образцов. У сильно замирающих животных была обнаружена повышенная экспрессия гена *Prss23* в дорсальной области гиппокампа, а также наблюдалась тенденция к повышению уровня экспрессии данного гена в вентральной области гиппокампа.

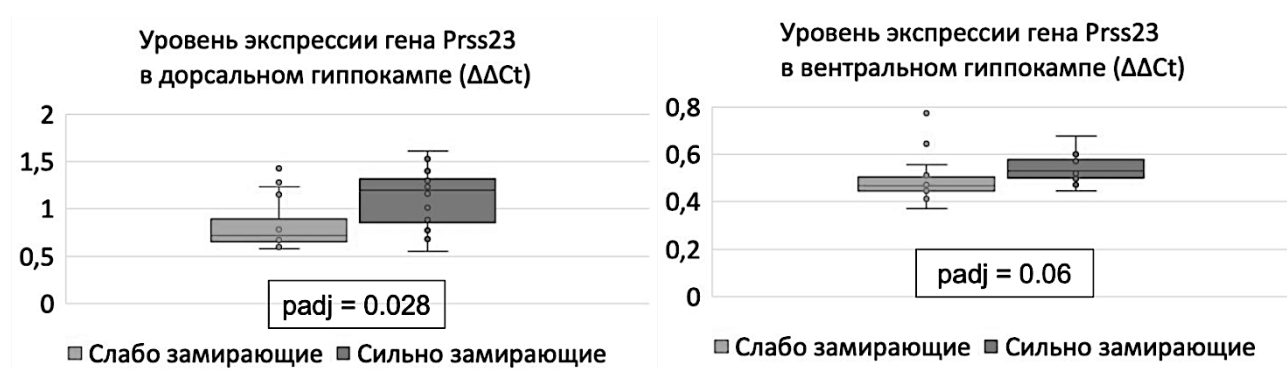


Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *Prss23* в дорсальном и вентральном гиппокампе самцов с разным уровнем замирания.

Заключение: В настоящей работе показано, что у животных, демонстрирующих высокий уровень замирания в камере без дополнительного воздействия, наблюдается менее выраженное изменение процента времени замирания в закрытой камере в результате обучения в модели контекстного условно-рефлекторного страха. Также между группами животных с разным базовым уровнем замирания обнаружены некоторые поведенческие различия в приподнятом крестообразном лабиринте и открытом поле, и дифференциальная экспрессия отдельных генов в вентральном и дорсальном гиппокампе.

Литература:

1. Павлова И.В. et al. Поведение крыс с высоким и низким уровнями замирания в оборонительных ситуациях и при выборе пищевого подкрепления // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2018. Vol. 104, № 7. P. 780—796—780—796.
2. Chang S.-D., Liang K.C. The hippocampus integrates context and shock into a configural memory in contextual fear conditioning // Hippocampus. 2017. Vol. 27, № 2. P. 145–155.
3. Gulyaeva, N.V. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage, Neurochem. Res., 2019, 44, 1306–1322.

THE RELATIONSHIP OF INDIVIDUAL DIFFERENCES IN RAT BEHAVIOR WITH PERFORMANCE IN THE FEAR CONDITIONING TEST

Positselskaya E.S., Vinarskaya A.H., Beletsky A.P., Bal N.V.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

Abstract: Exploring the relationship of individual differences in rat behavior with learning is important to better understand experiment results. Our goal was to study memory formation during contextual fear conditioning as well as other behavioral traits and differential gene expression in the hippocampus of animals exhibiting different baseline levels of freezing in the box.

Key words: fear conditioning; hippocampus; learning; individual differences; gene expression.

УДК 612.821

СВЯЗЬ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧАСТОТЫ ПИКА АЛЬФА-РИТМА С СУБЪЕКТИВНЫМ ВОСПРИЯТИЕМ ВРЕМЕНИ

Рогачёв А.О.¹, Сысоева О.В.¹

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия*

e-mail: a.o.rogachev@yandex.ru

Аннотация: Выявлена отрицательная корреляция между индивидуальными частотами пика альфа-ритма в теменных отведениях при выполнении задачи «субъективная минута» и длительностью субъективной минуты. Результаты позволяют сделать вывод о связи частоты индивидуального пика альфа-ритма со скоростью течения внутренних часов.

Ключевые слова: восприятие времени, индивидуальная частота альфа-ритма, внутренние часы

Введение: Альфа-ритм головного мозга (активность в диапазоне 8-12 Гц) традиционно связывают с восприятием времени: его роль заключается в прогнозировании длительности временных интервалов [1], с процессами внимания, вовлеченными в восприятие времени [2]. Кроме того, отмечается связь частоты и амплитуды мощности альфа-ритма со скоростью течения внутреннего субъективного времени. Показано, что у людей, проходивших тренинг по увеличению мощности альфа-ритма, наблюдается замедление внутренних часов [4], а при использовании метода транскраниальной магнитной стимуляции на частоте выше или ниже частоты индивидуального пика альфа-ритма, скорость течения времени уменьшается/увеличивается соответственно [3].

Обзор [5] демонстрирует многочисленные исследования связи альфа-ритма с процессами восприятия времени, однако авторы отмечают, что большая часть этих работ в качестве параметра связи рассматривает мощность альфа-ритма, а значительно меньшая – фазу и фазовые сдвиги. Таким образом, имеется крайне мало данных о связи частотных характеристик альфа-ритма со скоростью внутреннего течения времени.

Методика

В эксперименте приняли участие 27 человек (8 мужчин, 19 женщин; средний возраст $24,6 \pm 6,4$ лет). Все участники эксперимента подписывали информированное согласие.

Эксперимент состоял из двух частей. В первой части («субъективная минута») участникам требовалось по команде отмерить интервал, равный одной минуте, опираясь на собственное течение времени, не считая про себя. Серия повторялась дважды с открытыми и дважды с закрытыми глазами. Во второй части («фон») от участников требовалось в течение 30 секунд спокойно сидеть перед монитором. Серия также повторялась дважды с открытыми и закрытыми глазами.

В ходе эксперимента регистрировалась 64-канальная ЭЭГ (BrainProducts) с референтом на электроде FCz. Обработка данных осуществлялась в пакете MNE Python. В ходе предобработки ЭЭГ-данных проводилась фильтрация записей в диапазоне 1-40 Гц, очистка от глазодвигательных артефактов при помощи алгоритма ICA и перереферирование записей на усредненный референт. По меткам на начало отмеривания минуты и на начало фоновой записи были выделены эпохи длительностью 30 секунд. По индивидуальным эпохам вычислялись значения спектральной плотности мощности (метод PSD Multitaper) в диапазоне 1-40 Гц. Статистическая обработка данных проводилась в программе R Studio.

Результаты: Были получены данные о субъективной минуте (интервале между соответствующими нажатиями клавиш) для каждого из участников (открытые глаза: $56,28 \pm 20,5$ с; закрытые глаза: $52,86 \pm 19,9$ с). Значения длительности субъективной минуты при открытых и закрытых глазах значимо не различаются (тест Вилкоксона $W = 389$, $p = 0.68$), поэтому для дальнейшего анализа они были усреднены.

Различия в спектральной плотности мощности между условиями «субъективная минута» и «фон» были выявлены в диапазоне 8-12 Гц. Анализ спектральной плотности мощности проводился по группе теменных электродов (Pz, P3, P4, POz, PO3, PO4), так как в них выявлена наибольшая мощность альфа-ритма. В этом диапазоне выявлены два пика мощности: для экспериментального условия – на частоте 10,5 Гц, для фона – 11 Гц. Данные представлены на рис. 1.

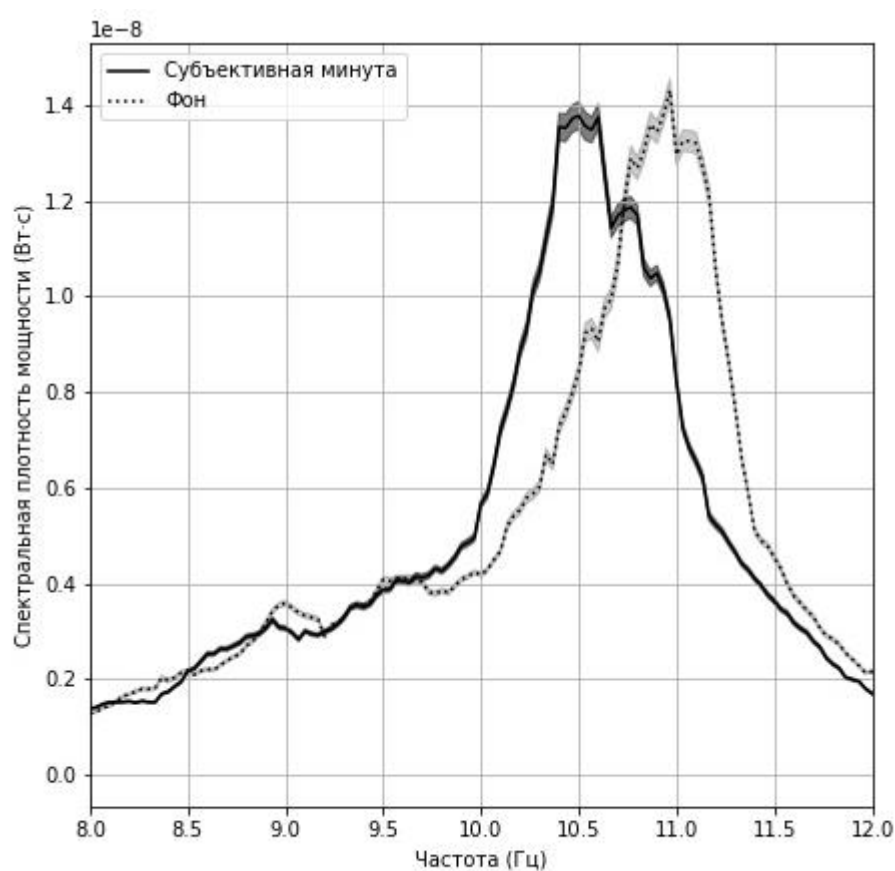


Рис. 1. Спектральная плотность мощности в диапазоне 8-12 Гц для условий «субъективная минута» и «фон»

Из-за отсутствия значимых различий между частотами пиков альфа-ритма в условии «субъективная минута» при открытых и закрытых глазах (t(49)

= 1,6, $p = 0,12$), а также в связи с тем, что индивидуальная частота пика альфа-ритма стабильна для открытых и закрытых глаз, они также были усреднены.

Был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона между усредненными значениями длительности субъективной минуты и частотами пиков альфа-ритма при выполнении экспериментальной задачи, получено значение $r = -0,45$, $p = 0,02$.

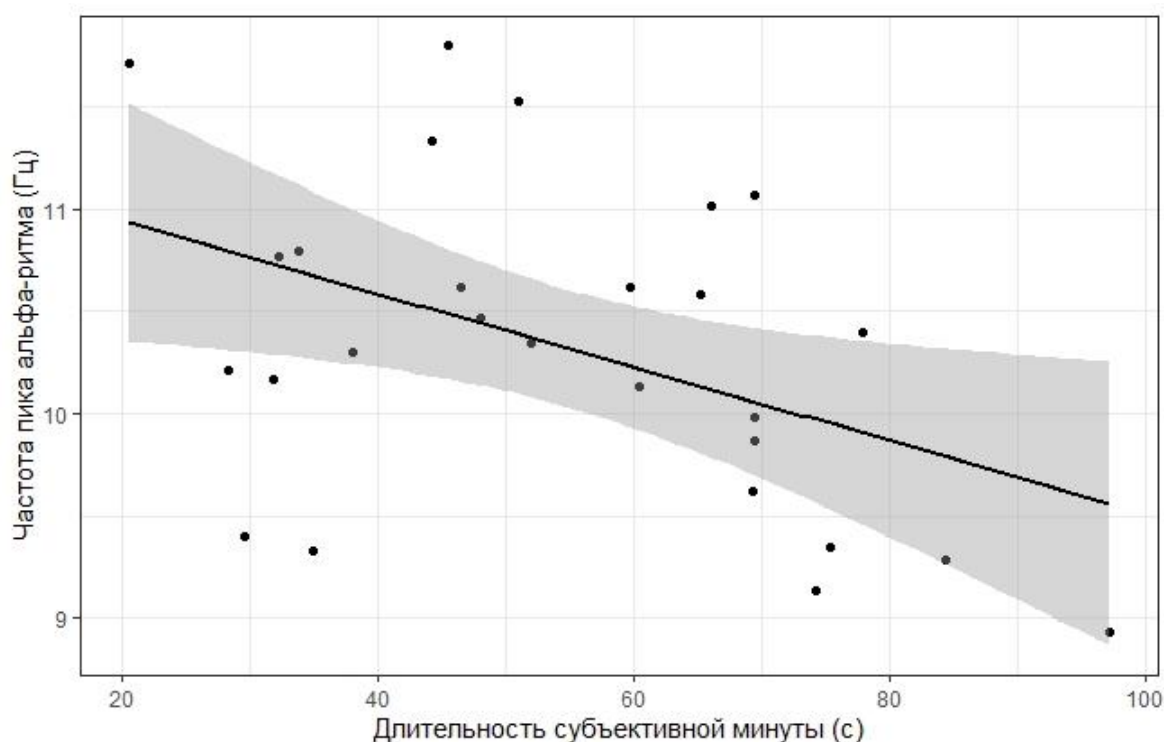


Рис. 2. Корреляция между значениями частот пика альфа-ритма и длительности субъективной минуты

Также обнаружена статистически значимая корреляция между усредненными значениями длительности субъективной минуты и частотами пика альфа-ритма в фоне ($r = -0,51$, $p < 0,01$). Между длительностью субъективной минуты и амплитудами пиков альфа-ритма в эксперименте и в фоне значимых коэффициентов корреляции не обнаружено ($r = -0,06$, $p = 0,78$; $r = -0,11$, $p = 0,57$ соответственно).

Обсуждение результатов: Обнаружена отрицательная корреляция между индивидуальными значениями частоты пика альфа-ритма при выполнении задачи «субъективная минута» и длительностью субъективной минуты: чем меньше длительность индивидуальной субъективной минуты (и, соответственно, чем быстрее протекает внутреннее время), тем выше частота индивидуального пика альфа-ритма. Полученные результаты хорошо согласуются с данными [3], согласно которым стимуляция теменной зоны на частотах выше или ниже индивидуальной частоты пика альфа-ритма таким же образом влияет на скорость течения внутреннего времени; наши результаты уточняют эту взаимосвязь относительно частоты индивидуального пика альфа-ритма.

В большом количестве исследований по данной теме (из обзора [5]) обсуждается связь внутренних часов с амплитудой мощности и фазовыми характеристиками альфа-ритма, тогда как данных о частотных характеристиках практически нет. Полученные результаты позволяют заключить, что скорость протекания субъективного времени зависит от индивидуальной частоты пика альфа-ритма, а также предположить наличие различных генераторов альфа-ритма при спокойном бодрствовании и при выполнении задачи на отмеривание времени, что основывается на различии в частотах пиков альфа-ритма в этих двух условиях.

Литература

1. Glicksohn, J., Ohana, A. B., Dotan, T. B., Goldstein, A., & Donchin, O. (2009). Time production and EEG alpha revisited. *NeuroQuantology*, 7(1).
2. Klimesch, W., Sauseng, P., & Hanslmayr, S. (2007). EEG alpha oscillations: The inhibition–timing hypothesis. *Brain Research Reviews*, 53(1), 63–88.
3. Mioni, G., Shelp, A., Stanfield-Wiswell, C. T., Gladhill, K. A., Bader, F., & Wiener, M. (2020). Modulation of Individual Alpha Frequency with tACS shifts Time Perception. *Cerebral Cortex Communications*, 1(1).
4. Wacker, M. S. (1996). Alpha brainwave training and perception of time passing: Preliminary findings. *Biofeedback and Self-Regulation*, 21(4), 303–309.

5. Wiener, M., & Kanai, R. (2016). Frequency tuning for temporal perception and prediction. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 8, 1–6.

RELATION OF INDIVIDUAL ALPHA RHYTHM FREQUENCY PEAK WITH
SUBJECTIVE PERCEPTION OF TIME

Rogachev A.O.¹, Sysoeva O.V.¹

*1 Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Abstract: A negative correlation between the individual frequencies of the alpha rhythm peak in the parietal channels during the subjective minute task and the duration of the subjective minute was revealed. The results allow us to conclude that the frequency of the individual alpha rhythm peak is related to the rate of flow of the internal clock.

Keywords: time perception, individual alpha rhythm frequency, internal clock

УДК 57.024

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ
РЕТРОСПЛЕНИАЛЬНОЙ КОРЫ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ НОВОГО
ПРОСТРАНСТВА И ОБЪЕКТОВ У МЫШЕЙ

**Рогожникова О.С.¹, Ивашкина О.И.^{1,2}, Торопова К.А.^{1,2}, Солотёнков М.А.³,
Федотов И.В.³, Желтиков А.М.^{3,5,6,7}, Анохин К.В.^{1,4}**

*¹Институт перспективных исследований мозга Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова,*

²Национальный исследовательский центр "Курчатовский Институт",

³*Физический факультет Московского государственного университета им. М. В.*

Ломоносова,

⁴*Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им.*

П.К.Анохина,

г. Москва, Россия;

⁵*Факультет физики и астрономии, Техасский университет A&M, Колледж*

Стейшин, Техас, США;

⁶*Российский квантовый центр Сколково, Московская область, Россия,*

⁷*Казанский квантовый центр, Казанский национальный исследовательский
технический университет им. А. Н. Туполева*

E-mail: osrogozhnikova@gmail.com

Аннотация: Ретросплениальная кора (РСК) играет ключевую роль в процессах пространственной навигации и кодировании пространственной информации. Однако участие РСК в кодировании информации об объектах изучено мало. В этой работе мы использовали оптоволоконную фотометрию для исследования кальциевой активности РСК в задачах распознавания типа и положения объектов у мышей. Мы показали, что в момент контакта животного с объектом наблюдается снижение кальциевой активности РСК независимо от поведенческой задачи. При этом, выполнение другой формы исследовательского поведения - стойки, не сопровождалось подобным снижением активности РСК. Таким образом, мы показали специфическое изменение активности РСК во время исследования объектов у мышей.

Ключевые слова: ретросплениальная кора, распознавание объектов, кальциевая активность, исследовательское поведение, оптоволоконная фотометрия

Ретроспективная кора принимает активное участие в процессах формирования эпизодической памяти при обследовании животным новой среды. В этот глобальный процесс вовлечены разные типы нейронов, в частности, клетки места и клетки направления головы, которые были обнаружены в РСК [1,2]. Также известно, что РСК специфически активируется на локальные стимулы при обследовании нового пространства [3]. В задаче распознавания типа объектов ранее было показано наличие специфической активности нейронов РСК [4], однако при удалении РСК наблюдается нарушение распознавания объектов в контексте, но не типа объектов [5].

В данной работе мы провели анализ кальциевой активности нейронов РСК во время исследовательского поведения мышей в двух типах задач: распознавание объекта нового типа и распознавание положения перемещённого объекта.

Методика: Регистрацию активности нейронов РСК проводили методом оптоволоконной фотометрии флуоресцентного сигнала кальциевого сенсора YТnС [6]. Экспрессированный на мембране нейронов РСК кальциевый сенсор флуоресцирует в случае изменения внутриклеточной концентрации кальция в участке коры, облучаемом лазерным излучением с длиной волны в 473 нм через размещённый на голове животного оптрод. Для регистрации оптического ответа нейронов РСК за одну стереотаксическую операцию мы проводили микроинъекции вирусных частиц, несущих ген флуоресцентного белка, в объёме 500 нл и вживление в мозг мыши оптрода, одна часть которого представляет собой короткое оптическое волокно (0.9 мм) и располагается внутри тканей мозга, вторая – это керамическая ферула, позволяющая закрепить оптрод на черепе и подключить его к идущему от лазера оптоволокну. В эксперименте участвовало 7 взрослых мышей линии С57BL/6 (4-6 месяцев) обоих полов. Спустя 2 недели после операции, мышей приучали к подключению оптоволокну в течение трёх дней. Затем животное помещали на

20 мин в пустую арену с нанесёнными на стенки зрительными ориентирами для ознакомления с обстановкой. На следующий день при обучении животным предъявляли два одинаковых объекта в знакомой арене. Через 24 часа в тестовой сессии мышам предъявляли два типа объектов в двух вариантах задачи: один из объектов заменяли на незнакомый (распознавание типа объектов) или один из знакомых объектов перемещали в новое положение (распознавание положения объектов). Для оценки памяти об объектах использовали длительность контакта с объектами (нюхает; прикасается; сидит рядом). В каждый день эксперимента осуществляли одновременную видеорегистрацию поведения животных и регистрацию кальциевой активности нейронов РСК. Кальциевыми событиями считали все значения зарегистрированного сигнала, превышающие более чем на 10% фоновое значение.

Результаты: В ходе анализа кальциевой активности РСК в сессиях обучения и теста нами было показано снижение числа пиков ($p < 0.05$) кальциевой активности нейронов РСК при контакте с объектами по сравнению с обследованием обстановки в обоих типах задач. При этом не было обнаружено изменения активности РСК в зависимости от того, какой именно объект животное обследовало: знакомый, объект нового типа или перемещённый объект. Так как мы обнаружили специфическое изменение кальциевой активности нейронов РСК в момент обследования объектов, мы решили провести анализ зарегистрированного кальциевого сигнала в моменты совершения животным другого вида исследовательского поведения – стоек. При этом мы не обнаружили специфических изменений активности нейронов РСК при совершении животным стоек. Таким образом, мы предполагаем, что снижение суммарной активности РСК происходило не в связи с исследовательским поведением как таковым, а в связи с обследованием любых объектов, находящихся в среде.

Заключение: В нашем исследовании был показан специфический паттерн изменения активности РСК в виде снижения числа пиков кальциевого сигнала в моменты исследования животным объектов. Такое специфическое изменение активности нейронов РСК при исследовании нейтральных объектов было продемонстрировано впервые. Поскольку волоконно-оптическая фотометрия позволяет регистрировать только популяционные кальциевые ответы, наши данные не дают однозначного вывода о паттернах активности отдельных клеток РСК. Даже при снижении суммарной активности РСК всё ещё могут существовать нейроны, которые специфически активируются во время исследования объектов. Чтобы проверить это предположение необходимы дальнейшие исследования популяционной активности нейронов РСК с возможностью регистрировать активность отдельных клеток.

Работа поддержана грантом РНФ №20-15-00283 и междисциплинарной научно-образовательной школой Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

Литература

1. A.M.. Miller, W. Mau, and D. M. Smith, "Retrosplenial cortical representations of space and future goal locations develop with learning," *Current Biology* 29, no. 12 (2019): 2083-2090.
2. P. Y. Jacob, G. Casali, L. Spieser, H. Page, D. Overington, and K. Jeffery, "An independent, landmark-dominated head-direction signal in dysgranular retrosplenial cortex," *Nature neuroscience* 20, no. 2 (2017): 173-175.
3. Bilalić M., Lindig T., Turella L. Parsing rooms: the role of the PPA and RSC in perceiving object relations and spatial layout. *Brain Structure and Function*. 2019. С. 1-20.
4. A. B. de Landeta, M. Pereyra, J. H. Medina, and C. Katche, "Anterior retrosplenial cortex is required for long-term object recognition memory," *Scientific reports* 10, no. 1 (2020): 1-13.

5. Vann S. D., Aggleton J. P. Extensive cytotoxic lesions of the rat retrosplenial cortex reveal consistent deficits on tasks that tax allocentric spatial memory. *Behavioral neuroscience*. 2002. T. 116. № 1. P. 85
6. N. V. Barykina, D. A. Doronin, O. M. Subach, V. P. Sotskov, V. V. Plusnin, O. A. Ivleva, A. M. Gruzdeva, T.A. Kunitsyna, O.I. Ivashkina, A. A. Lazutkin and A. Y. Malyshev, I. V. Smirnov, A. M. Varizhuk, G. E. Pozmogova, K. D. Piatkevich, K. V. Anokhin, G. Enikolopov, and F. V. Subach, "NTnC-like genetically encoded calcium indicator with a positive and enhanced response and fast kinetics," *Scientific reports* 8, no. 1 (2018): 1-19.

CALCIUM ACTIVITY OF THE RETROSPLENIAL CORTEX NEURONS DURING OBJECT AND PLACE RECOGNITION IN MICE

**Rogozhnikova O.S.¹, Ivashkina O.I.^{1,2,3}, Toropova K.A.^{1,2,3}, Solotenkov M.A.⁴,
Fedotov I.V.⁴, Zheltikov A.M.^{4,5,6,7}, Anokhin K.V.^{1,2,3}**

¹ *Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University,*

² *NRC “Kurchatov Institute”,*

³ *P.K.Anokhin Research Institute of Normal Physiology,*

⁴ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

⁵ *Department of Physics and Astronomy, Texas A&M University College Station,
Texas, United States;*

⁶ *Russian Quantum Center, Skolkovo, Moscow Region, Russia,*

⁷ *Kazan Quantum Center, A. N. Tupolev Kazan National Research Technical
University*

Abstract: The retrosplenial cortex (RSC) plays a key role in the processes of spatial navigation and coding of spatial information. However, the participation of the RSC in encoding information about objects has been studied little. In this work, we used fiber-optic photometry to record RSC calcium activity in novel object and novel place recognition tasks. We have shown that at the moment of animal contact with the object, there is a decrease in the calcium activity of the RSC, regardless of the behavioral task. At the same time, the performance of another form of exploration

behavior -- rearing, was not accompanied by a similar decrease in the activity of the RSC. Thus, we have shown a specific change in the activity of RSC during the object exploration in mice.

Key words: retrosplenial cortex, object recognition, calcium imaging, exploratory behavior

УДК 612.816

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ БУТИРАТА НАТРИЯ НА АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА У МЫШЕЙ IN VIVO

Рощина М.А., Рощин М.В., Бородинова А.А., Смирнов И.В., Балабан П.М.

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: marina.zots@gmail.com

Ключевые слова: эпигенетика, гиппокамп, кальциевый имиджинг, минископ

Аннотация: В поддержании долговременной памяти большую роль играют эпигенетические механизмы. Известно, что увеличение степени ацетилирования гистонов ведет к улучшению памяти, но каким образом изменение степени ацетилирования влияет на активность нейронов изучено мало. Мы впервые зарегистрировали ин vivo динамику активности нейронов гиппокампа после введения ингибитора гистондеацетилаз бутирата натрия.

Консолидация долговременной памяти — сложный, многоступенчатый процесс, один из ключевых компонентов которого изменение уровня экспрессии генов. Благодаря изменению активности отдельных генов становятся возможны структурные изменения нейронов, необходимые для поддержания долговременной памяти, например, такие как появление и стабилизация новых шипиков или изменение паттернов экспрессии различных

рецепторов и каналов [1]. Эпигенетические модификации, такие как ацетилирование и деацетилирование гистонов в последнее время рассматривают как потенциальные механизмы регуляции экспрессии генов, участвующие в формировании и хранении долговременной памяти. Известно, что повышение уровня ацетилирования гистонов путем блокады гистондеацетилаз (HDACs) усиливает долговременную потенцию на срезах гиппокампа *in vitro*, а также улучшает долговременную память в задаче условно-рефлекторного замирания [2, 3, 4]. Исследования влияния степени ацетилирования гистонов на нейронную активность были выполнены в основном на переживающих срезах мозга, *in vitro*. Эффекты изменения уровня ацетилированных гистонов на активность нейронов в живом бодрствующем мозге в настоящее время остаются малоизученными. Целью нашей работы было исследовать эффект бутирата натрия, ингибитора гистондеацетилаз, на активность нейронов гиппокампа у бодрствующих, свободно передвигающихся мышей.

Исследование выполнено на мышах линии C57Bl/6. Регистрацию активности нейронов проводили с помощью миниатюрного флуоресцентного микроскопа — минископа (miniscope.org, UCLA). На первом этапе мышам вводили вирусный вектор (AAV2-CAG-GCamp6s), несущий кальциевый сенсор GCaMP6s под контролем универсального CAG промотора, в поле CA1 гиппокампа. Затем в ту же область имплантировали GRIN линзу, которая служит объективом минископа. На третьем этапе на черепе закрепляли платформу для фиксации минископа.

После окончания операций мы приучали мышей к экспериментальной комнате и процедуре подключения минископа в течение трех дней. Далее, во время первого дня эксперимента мы помещали мышей в небольшое открытое поле с двумя незнакомыми объектами и позволяли обследовать обстановку в течение 5 минут. Во время обследования мы проводили синхронную регистрацию поведения и изменения флуоресцентного сигнала кальциевого

сенсора. Сразу после первого обследования мы внутрибрюшинно вводили мышам бутират натрия (1.2 г/кг) или физиологический раствор и возвращали в домашнюю клетку. Через 45 и 90 минут проводили две дополнительные сессии регистрации активности нейронов гиппокампа в то время, пока мыши отдыхали в домашней клетке. 24 часа спустя мышей снова помещали ту же обстановку с одним старым и одним новым объектом и проводили четвертую сессию регистрации активности нейронов.

Анализ данных об изменении флуоресцентного сигнала кальциевого сенсора проводили с помощью программы MIN1PIPE [5]. Программа автоматически выделяет области интереса — тела нейронов, экспрессирующих флуоресцентный кальциевый сенсор и выделяет из шума изменение флуоресцентного сигнала со временем. Каждую временную точку сначала обрабатывали отдельно, а затем проводили сопоставление активности нейронов, зарегистрированных в разные временные точки. Выявление нейронов, активных в разные временные точки проводили с помощью программы CellReg [6]. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8.

На первом этапе анализа мы получили общее число активировавшихся нейронов для каждой временной точки. У мышей из контрольной группы число активных нейронов в поле зрения увеличивалось через 45 и 90 минут, по сравнению с первой временной точкой — обследованием обстановки с новыми объектами. После введения бутирата натрия, напротив, число активных нейронов значительно уменьшалось после инъекции (через 45 и 90 минут). Из-за небольшого размера выборки ($N=3$) и больших индивидуальных различий, различия между отдельными точками внутри групп были недостоверны. Однако наблюдалось статистически значимое различие между эффектами бутирата натрия и физиологического раствора (двухфакторная ANOVA, $F=7.92$, $P = 0.011$, фактор вещество).

На следующем этапе мы проанализировали степень активности выделенных нейронов. Средняя частота кальциевых событий постепенно

увеличивалась у контрольных мышей после инъекции физиологического раствора. В то же самое время, после инъекции бутирата натрия активность уменьшалась через 45 и 90 минут и восстанавливалась до исходных значений через 24 часа. Отличия между двумя веществами были статистически значимыми для средней частоты кальциевых событий при проведении анализа двухфакторная ANOVA ($F=11.277$, $p = 0.003$ по фактору вещество).

Далее мы анализировали паттерны активации нейронов — сопоставляли нейроны из разных временных точек и находили те нейроны, которые были активны более чем в одной временной точке. Мы обнаружили, что число нейронов, которые были активны только во время двух сессий обследования обстановки, было больше у мышей, которым вводили бутират натрия после первого обследования, чем у мышей контрольной группы. При этом общее число нейронов активных во временные точки после инъекции было больше у контрольной группы. Мы предполагаем, что у контрольных мышей после обследования обстановки ранее активные нейроны прекращают быть активными, но активируются новые нейроны. Введение бутирата натрия, вероятно, препятствует активации ранее неактивных нейронов, но поддерживает активность ранее активных нейронов.

Также мы проанализировали среднюю частоту кальциевых событий в тех нейронах, которые были активны в день проведения инъекции бутирата натрия или физраствора — во время обследования обстановки (перед инъекцией), через 45 минут и через 90 минут после инъекции. Динамика активности таких нейронов была сходной в обеих экспериментальных группах: средняя частота кальциевых событий несколько увеличивалась в течение 90 минут после инъекции, независимо от вещества.

Полученные данные позволяют высказать гипотезу о том, что бутират натрия влияет на активность нейронов гиппокампа в зависимости от их предыдущего состояния. Нейроны, которые были активны перед введением вещества, остаются активными, в то время как вероятность активации новых

нейронов и средняя частота вновь активных нейронов снижается. Можно предположить, что бутират натрия специфически ингибирует активность нейронов, которые не были специфически вовлечены в получение нового опыта и обучение.

Литература

1. Балабан П.М., Бородинова А.А., Нейрогенетические технологии исследования механизмов хранения памяти. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2019 — том 105 — с. 1392-1405.
2. Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. // J Biol Chem. - 2004 - Vol. 279 – PP. 40545-59.
3. Guan J-S, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg J-H, Joseph N, Gao J, Nieland TJF, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai L-H. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. // Nature. - 2009. - Vol. 459 – PP. 55-60.
4. Pandey SC, Sakharkar, Tang L, Zhang H. Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood. // Neurobiol Dis. - 2016. - Vol. 82 – PP. 607-619.
5. Lu J, Li C, Singh-Alvarado J, Zhou ZC, Frohlich F, Mooney R, Wang F. MIN1PIPE: A Miniscope 1-Photon-Based Calcium Imaging Signal Extraction Pipeline. // Cell Rep. - 2018. - Vol. - 23 – PP. 3673-3684.
6. Sheintuch L, Rubin A, Brande-Eilat N, Geva N, Sadeh N, Pinchasof O, Ziv Y. Tracking the Same Neurons across Multiple Days in Ca²⁺ Imaging Data. // Cell Rep. - 2017 – Vol. 21 – PP. 1102-1115.

INFLUENCE OF HDACS INHIBITOR SODIUM BUTYRATE ON NEURONAL ACTIVITY IN HIPPOCAMPUS OF FREELY MOVING MICE

M.V. Roshchin, M.A. Roshchina, A.A. Borodinova, I.V. Smirnov and P.M.

Balaban

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow,
Russia*

Abstract: Epigenetic mechanisms play an important role in stabilization of long-term memory. Increased histone acetylation cause improvement of consolidation and reconsolidation. Still almost unknown how rates of histone acetylation change

neuronal activity in vivo. We used fluorescent miniature microscopes for in vivo calcium imaging in hippocampal neurons after injection of sodium butyrate – well known HDACs inhibitor.

Key words: hippocampus, epigenetic, calcium imaging, miniscope

УДК 612.821

АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ И ПОДКОРКОВЫХ КОРРЕЛЯТОВ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИХ СПАЙК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ У КРЫС

**Салып О.Ю.¹, Комольцев И.Г.^{1,2}, Башкатова Д.А.¹, Волкова А.А.¹,
Новикова М.Р.¹, Гуляева Н.В.^{1,2}**

¹ *ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия*

² *Бюджетное Учреждение Здравоохранения Научно-практический
психоневрологический центр им. З. П. Соловьёва Департамента
Здравоохранения г. Москвы*

Email: olgha.list@inbox.ru

Аннотация: ранее нами при изучения электрофизиологических последствий черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс было показано увеличение частоты представленности спайк-волновых разрядов (СВР) в неокортексе в остром периоде. Задачей данного исследования было изучение роли подкорковых структур (таламуса и гиппокампа) в формировании СВР в неокортексе в остром периоде ЧМТ. Мы продемонстрировали взаимосвязь между наличием СВР в таламусе и «спайк-волновой» формой и билатеральным распространением СВР в неокортексе.

Ключевые слова: Эпилепсия, спайк, таламус, ЭЭГ, черепно-мозговая травма

Введение. Эпилепсия - одно из самых распространенных неврологических заболеваний, от которого в мире страдает около 70 млн человек. Эпилепсия характеризуется периодическими спонтанными судорогами, обусловленными гипервозбудимостью и гиперсинхронизацией нейронов мозга. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из самых распространенных причин инвалидности по всему миру [1] и одной из распространённых причин эпилепсии. Травмы головного мозга запускает процессы нейропротекции и нейродегенерации, при адекватном их балансе происходит репарация ткани. Неконтролируемое повреждение приводит к избыточной нейрональной гибели и последующему глиозу [2]. Для понимания распространения судорожной активности и механизмов посттравматического эпилептогенеза в мозге важно понимать функционирование нейрональных сетей. В исследованиях на животных подробно описаны две нейронные системы, связанные с развитием эпилептических приступов: кортико-таламо-кортикальная и кортико-гиппокампальная. Основные морфологические изменения гиппокампа, связанные с ЧМТ, включают гибель нейронов и реорганизацию афферентов волокон в молекулярном слое зубчатой извилины [3]. В наших предыдущих работах была обнаружена интериктальная спайковая активности в гиппокампе, которая коррелировала со степенью дистантного повреждения в гиппокампе [3]. Кроме изменений в гиппокампальной нейронной системе, нами ранее было показано увеличение частоты представленности спайк-волновых разрядов (СВР) в неокортексе в остром периоде ЧМТ у крыс [4]. Предположительно, формирование СВР вовлекает кортико-таламо-кортикальную нейрональную сеть, однако это не было до сих пор подтверждено электрофизиологическими исследованиями. Было также показано, что посттравматические СВР могут быть связаны с механизмами посттравматического эпилептогенеза [5], однако

нейронные механизмы генерации СВР в неокортексе после ЧМТ изучены недостаточно.

Задача. Изучение роли подкорковых структур (таламуса и гиппокампа) в формировании спайк-волновых разрядов (СВР) в неокортексе в остром периоде ЧМТ.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 12 самцах крыс линии Sprague-Dawley, масса тела 450–550 г, возраст 8–10 месяцев в начале эксперимента. Группы крыс: ложно-оперированные (n=5), ЧМТ (n=7). Во время эксперимента животных содержали в индивидуальных пластиковых клетках в стандартных лабораторных условиях (12-часовой цикл свет-темнота) со свободным доступом к пище и воде.

При проведении операции использовали 1–3% анестезию изофлураном. Восемь электродов имплантировали билатерально в сенсорный кору (AP = 1, ML = 5), дорсальную (AP = 0, ML = 2, угол = 48°) и вентральную зубчатую извилину (AP = 6.3, ML = 4.5), унилатерально в правое вентро-постерио-латеральное ядро таламуса (AP = 1, ML = 3).

Нанесение травмы проводили через 7 дней после вживления электродов при помощи латерального гидродинамического удара (около 2.5 атм). Травму наносили через отверстие в черепе диаметром 3мм (центр: AP -3, ML 3). Запись видео и ЭЭГ проводилась 24 часа в сутки в течение 7 дней до и 7 дней после ЧМТ при помощи регистрирующей беспроводной системы Multichannel Systems. Записи были проанализированы на наличие разрядов в коре, таламусе и гиппокампе.

Результаты. Среднее число СВР в сутки увеличилось после ЧМТ (2 СВР/сут до травмы, и 150 СВР/сут – после). После ЧМТ СВР регистрировали одновременно в неокортексе и таламусе, чего до ЧМТ не наблюдали.

Сопоставление появления СВР в подкорковых структурах (гиппокампе и таламусе) с формой волны и их латерализацией выявили, что наличие разрядов в таламусе определяет форму (спайк или волна) и латерализацию разрядов в неокортексе. При наличии разрядов в таламусе СВР в неокортексе достоверно чаще регистрировали в обоих полушариях (50 из 118 СВР), чем унилатеральные (1 из 19 СВР, $p = 0.002$, точный тест Фишера). Форма разрядов в коре также зависела от наличия СПР в таламусе: при регистрации в таламусе форма разрядов в коре достоверно чаще соответствовала «спайк-волне» (28 из 58 СВР), чем «спайку» без последующей волны (23 из 79 СВР, $p = 0.022$, точный тест Фишера). Некоторые СВР в неокортексе регистрировали одновременно и в гиппокампе, однако подобной связи с формой и латерализацией нами не было обнаружено.

Исходя из предположения, что форма СВР, их латерализация в коре, а также наличие в гиппокампе может предсказать наличие СВР в таламусе, мы провели бинарную логистическую регрессию и показали, что все три показателя достоверно предсказывают наличие СВР в таламусе ($p < 0.05$). Расчёт чувствительности и специфичности предсказания по этим трём параметрам и последующий ROC-анализ показали специфичность 0.549, чувствительность 0.872, AUC 0.797.

Заключение. Посттравматические СВР в неокортексе через неделю после ЧМТ регистрируются также и в таламусе. Наблюдается взаимосвязь между наличием СВР в таламусе и спайк-волновой формой СВР, а также билатеральным распространением СВР в неокортексе. Можно предположить, что формирование посттравматических СВР вовлекает кортико-таламо-кортикальную нейрональную сеть. Этот результат важен для выбора оптимального направления последующего изучения механизмов посттравматического эпилептогенеза в эксперименте.

Литература

1. Reilly P. The impact of neurotrauma on society: an international perspective. *Prog Brain Res.* 2007;161:3-9. doi: 10.1016/S0079-6123(06)61001-7.
2. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016 Oct;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153. doi: 10.1111/jnc.13607.
3. Komoltsev IG, Frankevich SO, Shirobokova NI, Volkova AA, Levshina IP, Novikova MR, Manolova AO, Gulyaeva NV. Differential early effects of traumatic brain injury on spike-wave discharges in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Res.* 2021 May;166:42-54. doi: 10.1016/j.neures.2020.05.005.
4. Komoltsev IG, Sinkin MV, Volkova AA, Smirnova EA, Novikova MR, Kordonskaya OO, Talypov AE, Guekht AB, Krylov VV, Gulyaeva NV. A Translational Study on Acute Traumatic Brain Injury: High Incidence of Epileptiform Activity on Human and Rat Electrocorticograms and Histological Correlates in Rats. *Brain Sci.* 2020 Aug 19;10(9):570. doi: 10.3390/brainsci10090570.
5. Kumar U, Li L, Bragin A, Engel J Jr. Spike and wave discharges and fast ripples during posttraumatic epileptogenesis. *Epilepsia.* 2021 Aug;62(8):1842-1851. doi: 10.1111/epi.16958.

ANALYSIS OF POSTTRAUMATIC SPIKE-WAVE DISCHARGES MORPHOLOGY AND SUBCORTICAL CORRELATES IN RATS

Salyp O.Yu.¹, Komoltsev I.G.^{1,2}, Bashkatova D.A.¹, Volkova A.A.¹, Novikova M.R.¹, Gulyaeva N.V.^{1,2}

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

² *Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry*

Annotation: Our earlier studies of electrophysiological consequences of traumatic brain injury (TBI) in rats demonstrated an increase in the occurrence frequency of spike-wave discharges (SWD) in the neocortex during the acute TBI period. The aim of this study was to assess the role of subcortical structures (the thalamus and

hippocampus) in neocortical SWD generation during the acute TBI period. We have demonstrated the relationship between SWD presence in the thalamus and the “spike-wave” form and bilateral SWD spread in the neocortex.

Keywords: Epilepsy, spike, thalamus, EEG, traumatic brain injury

УДК 661.831-073.97-71

МЕТОД АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КОГНИТИВНЫХ ВЫЗВАННЫХ
ПОТЕНЦИАЛОВ НА ПРИМЕРЕ АНАЛИЗА ЭЭГ АКТИВНОСТИ У
ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ГОЛОВНОЙ БОЛЬЮ

К.С. Саматова¹, А.О. Сельский^{2,1}, А.Е. Руннова^{1,2}

¹ Саратовский государственный медицинский университет им. В. И.
Разумовского, Саратов

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов;

Email: anefila@gmail.com

Аннотация: В работе показаны новые методы анализа индивидуальных особенностей головного мозга у пациентов с хроническими головными болями. Предложена система автоматической оценки экстремумов когнитивного ВП. Это позволило выделить типовые группы по особенностям демодуляции ВП. Наблюдается корреляция объективной оценки ЭЭГ и клинической картины.

Ключевые слова: ЭЭГ, хронические боли, когнитивные тесты, вызванные потенциалы, магнитуда характерных компонент.

Одним из перспективных направлений современной науки является исследование головного мозга человека. Однако, для успешного изучения необходимы эффективные методы измерения мозговой активности и численные методы её объективного анализа. В настоящее время большое развитие получила электроэнцефалография (ЭЭГ), как доступный по цене и условиям использования метод, позволяющий оценить и измерить активность отделов коры головного мозга человека. Для обработки полученных на ЭЭГ данных перспективным является построение вызванных потенциалов (ВП). Применение данного метода полезно для создания и настройки интерфейсов «brain-computer interface» (BCI), используемых для обучения или реабилитации пациентов с различными заболеваниями [1].

Методика: В экспериментальной работе приняли участие 23 пациентов Клиники лечения боли. Средний возраст испытуемых составлял $49 \pm 12,4$ года. Эксперименты проводились в течение первой половины дня в специально оборудованной психологической лаборатории, где доброволец располагался удобно в состоянии полулежа, воздействие внешних раздражителей (внешнего шума и яркого света) было сведено к минимуму.

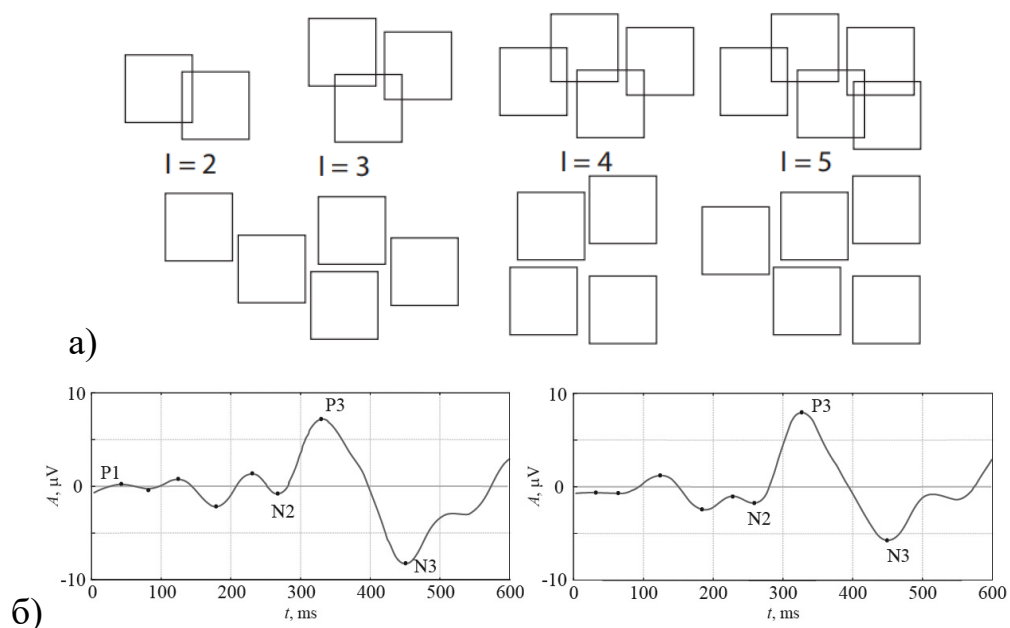


Рисунок 1. (а) Образцы экспериментального материала. (б) Примеры вызванных потенциалов для двух каналов одного из испытуемых. Точками нанесены экстремумы вызванного потенциала. Обозначены компоненты, выделенные вручную.

На **рис. 1а** показаны образцы зрительных стимулов, которые представляют собой простые группы геометрических объектов (квадратов) в количестве 2-5. Каждому испытуемому было дано указание нажимать левую кнопку пульта дистанционного управления при показе нечетного количество объектов в группе и правую кнопку при представлении четного числа. Все предъявления стимулов и реакции испытуемого автоматически записывались в виде текстовых протоколов. Весь эксперимент занял около 40 минут. В ходе эксперимента испытуемый оценивал в среднем 100-150 событий.

Для анализа ЭЭГ применялся монополярный метод регистрации и расширенное расположение электродов в соответствии с «10–10» системой, позволяющей оценивать активность коры головного мозга по проекциям всех основных зон. Регистрация данных ЭЭГ проводилась на электроэнцефалографическом оборудовании “Энцефалан - ЭЭГР-19/26”

(Medikom MTD, Российская Федерация). Для получения сигналов ЭЭГ использовались электроды Ag/AgCl на основе специальных предварительно подключенных головных колпачков.

После регистрации в ходе нейропсихологического эксперимента записи ЭЭГ-данных, анализ активности головного мозга осуществлялся с помощью построения когнитивных ВП [2, 3]. Известно, что для настройки системы нейроинтерфейса удобно использование оценки хорошо выраженного компонента P(300) на ВП [4]. Данный компонент присутствует при решении когнитивных задач и устойчив для стимулов различных типов. Однако, несмотря на выраженность и устойчивость наблюдаемые когнитивные ВП могут сильно изменяться из-за индивидуальных особенностей испытуемого, особенно при выраженном угнетении когнитивных способностей у пациентов психо-неврологического профиля, что требует учёта при настройке системы VCI.

Сегодня методика нахождения вызванных потенциалов является общепринятой [3]. При предъявлении испытуемому серии стимулов, за каждым единичным стимулом следует ответная реакция на него, наблюдаемая в канале ЭЭГ. Поскольку сигнал имеет свойство изменчивости, когнитивный ВП после единичного стимула недостаточно информативен. Необходимо анализировать серию вызванных потенциалов на серию идентичных стимулов путём усреднения значения ЭЭГ фрагментов. Важно знать точное время окончания предъявления стимулов во избежание ошибочного усреднения во избежание смещения временных рамок усредняемых ВП. При верном расчёте на ВП наблюдается серия экстремумов, компонентов ВП – набора максимумов и минимумов, при этом случайные составляющие ЭЭГ сигнала, не имеющие отношения к ответу на данный стимул, после процедуры усреднения стремятся к нулю. Для разных по характеру стимулов вызванные потенциалы имеют разную форму. На **рис. 16** представлены примеры когнитивных ВП для одного из испытуемых, построенные по паре ЭЭГ-каналов.

Результаты: Для данных ВП четко выделяются компоненты N2, P3, N3, тогда как другие компоненты менее выражены, что характерно для данных характеристик. Основными характеристиками компонент ВП являются их амплитуда и промежуток времени, при котором они устойчиво наблюдаются. В данной работе мы ставим акцент на амплитудах компонент ВП и пробуем по ним выделить индивидуальные особенности испытуемых.

Компоненты N2, P3, N3 имеют наибольшую амплитуду и относительно стабильное время появления и исчезновения, поэтому удобны для распознавания. Для одновременной оценки амплитуд всех трех компонент был введен параметр **М** магнитуды характерных компонент когнитивного ВП. Данный параметр **М** определяется как сумма модулей разностей компонент N2 - P3 и N3 - P3. Если один или несколько компонент не были выявлены для данного вызванного потенциала, то их амплитуда считалась равной нулю и формула расчета параметра **М** при этом не изменялась.

Мы построили распределения параметра **М** по каналам ЭЭГ, рассчитав его для каждого канала каждого испытуемого. Визуализация распределения может быть удобно представлена на схеме головы, как показано на **рис. 2**, где приведены распределения параметра **М** магнитуды характерных компонент когнитивного ВП по каналам для трех испытуемых с различными индивидуальными особенностями. Для всех испытуемых максимальное значение параметра **М** приходится на центральные каналы, смещения в сторону левых или правых каналов незначительно, представляя характерную черту когнитивных ВП.

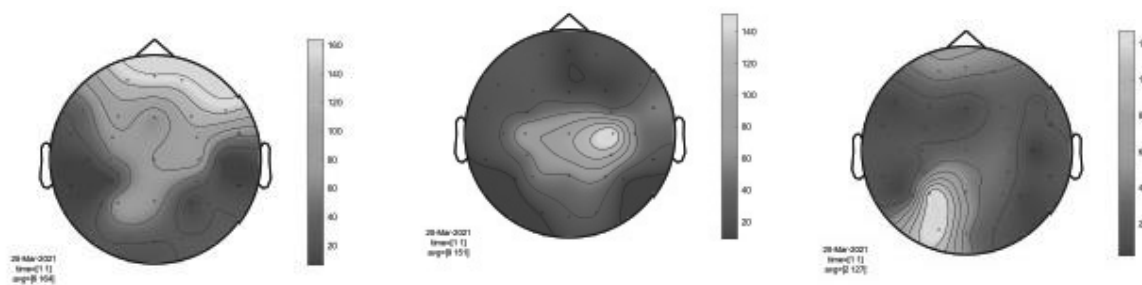


Рис. 2. Распределение величины M (разницы между амплитудами компонент $N2$ и $P3$) по каналам для трех испытуемых.

При этом положение максимального значения параметра M у испытуемых смещается вдоль центральной оси в направлении ко лбу и к затылку, в зависимости от индивидуальных особенностей. Максимум M может наблюдаться в (1) лобной, или (2) затылочной, или (3) теменной долях.

В настоящем эксперименте наибольшая разница между амплитудами характерных компонент когнитивного ВП в лобной доле наблюдалась у 7 пациентов. Такое же количество пациентов продемонстрировало максимум магнитуды в затылочной доле. У 9 участников работы максимальные значения величины M наблюдались в теменной доле. Анализ этих групп пациентов выявил различия в длительности наблюдаемой хронической боли.

Заключение: Выделение индивидуальных особенностей ВП предлагаемой методикой производится автоматически. Разделив каналы на соответствующие области, магнитуда M характерных компонент когнитивного ВП рассчитывается для каждой области скальпа. Дальнейшее сравнение полученных величин M дает представление о зонировании параметров ВП. Представленный способ анализа может быть использован как при настройке ВСИ, так и найти применение в системах поддержки врачебных решений для анализа неврологических пациентов.

Литература

1. Томашвили А. В. Применение технологии регистрации вызванных потенциалов в разработке нейроинтерфейса // Известия ТулГУ. Технические науки. 2013. №11.
2. Cooper N. R., et al. Investigating evoked and induced electroencephalogram activity in task-related alpha power increases during an internally directed attention task. // Neuro Report, 2006, V. 17, P. 205–208.
3. Schack B., Klimesch W. Frequency characteristic of evoked and oscillatory electroencephalographic activity in a human memory scanning task // Neurosci. Lett, 2002, V. 331, P. 107–110.
4. Левичкина Е. В., Каплан А. Я. Неосознаваемые процессы контекстного контроля зрительного восприятия простых стимулов: исследование методом вызванных потенциалов // Физиология человека 2009, Т. 35, № 2, с. 27-32.

The method of automatic analysis of cognitive evoked potentials on the example of the analysis of EEG activity in patients with chronic headache

K. S. Samatova¹, A. O. Selskii^{2,1}, A. E. Runnova^{1,2}

¹ Saratov State Medical University named after I.I. V. I. Razumovsky, Saratov,
Russia

² Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky,
Saratov, Russia

Email: anefila@gmail.com

Abstract: The paper shows new methods of analyzing the individual features of the brain in patients with chronic headaches. The system for automatic assessment of EP extrema is proposed. This made it possible to single out the typical groups according to the EP demodulation features. There is a correlation between the objective evaluation of the EEG and the clinical picture.

Key words: EEG, chronic pain, cognitive tests, evoked potentials, magnitude of characteristic components.

УДК:615.036.8+57.024

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПИРАЦЕТАМА И РЕМАКСОЛА В ТЕЧЕНИЕ 28 ДНЕЙ НА ПОВЕДЕНИЕ БЕЛЫХ БЕСПОРОДНЫХ КРЫС.

Синякин И.А.¹, Баталова Т.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Амурская государственная медицинская академия»,

Благовещенск, Россия

e-mail: sinyakin.ivan2016@yandex.ru

Аннотация

Цель: Изучить влияние последовательного введения препаратов пирацетама и ремаксолола (по схеме: 14 дней пирацетам, далее 14 дней ремаксол) на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Материалы и методы исследования: объектами исследования были отечественные препараты пирацетам и ремаксол. Эксперимент выполнен на 20 белых беспородных крысах самцах массой 300-350 г. и возрастом 12 месяцев. Исследования проводили с использованием стандартной установки «Приподнятый крестообразный лабиринт». Для оценки достоверности различий 2-х выборок применяли t-критерий Стьюдента.

Результаты: при введении препаратов пирацетама и ремаксолола в течение 28 дней были отмечены выраженные изменения в поведении подопытных крыс. Так, в сериях опытов с введением пирацетам + ремаксол показатель числа выходов увеличился в 4,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Значение показателя частоты «выглядываний» увеличивалось в среднем в 2,15 раз ($p < 0,05$). Число «вертикальных стоек» у подопытных животных было соответственно в среднем в 5,4 раза ($p < 0,05$) больше, чем до исследования.

Заключение: корреляция показателей в эксперименте, возможно, свидетельствует о наличии анксиолитического эффекта комбинации препаратов при длительном внутрибрюшинном введении грызунам.

Ключевые слова: пирацетам, ремаксол, поведение, анксиолитический эффект.

В 21 веке актуальным является поиск новых комбинаций лекарственных средств с тропной активностью к тканям головного мозга, в том числе пирацетама и возможно в схеме с гепатопротектором для устранения негативного влияния последнего.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния последовательного введения пирацетама и ремаксола на поведение крыс в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт».

Материалы и методы исследования

Объектами исследования были отечественные препараты пирацетам (НОВОСИБХИМФАРМ, Россия) и ремаксол (ООО НТФФ ПОЛИСАН, Россия). Эксперимент выполнен на 20 белых беспородных крысах самцах массой 300-350 г. и возрастом 12 месяцев. Перед началом исследования крысы помещались на 2-хнедельный карантин. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении со свободным доступом к пище и воде. До начала исследования регистрировали исходные характеристики поведения крыс, после чего животные были разделены на 2 группы. Экспериментальная группа получала пирацетам ежедневно внутрибрюшинно в течение 14 дней в дозе 300 мг/кг, далее ремаксол в объеме 5мл/кг также 14 дней. Животные контрольной группы получали изотонический раствор натрия хлорида в эквивалентном объеме.

Исследования проводили с использованием стандартной установки «Приподнятый крестообразный лабиринт». Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ, Elevated Plus-Maze) – один из самых часто используемых тестов определения тревожности у грызунов. ПКЛ является хорошо информативной методикой, которая позволяет оценить нейротропные эффекты повреждающих факторов, как окружающей среды, так и фармпрепаратов [4].

Результаты исследования и их обсуждение

Было установлено, что через 4 недели применения данных препаратов увеличилось число выходов подопытных крыс в открытые рукава лабиринта. Так, в сериях опытов с введением пирацетам + ремаксол значение этого показателя увеличилось соответственно в 4,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, получавшим раствор NaCl. Нами было отмечено, что крысы, получавшие комбинацию препаратов, находились в открытых рукавах лабиринта в среднем 64,6% времени, тогда как контрольная группа либо вообще не выходила в светлые рукава лабиринта, либо проводила в них не более 1,72% времени нахождения в лабиринте. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение этих 2 препаратов фактически устраняло рефлекс предпочтения темного пространства у грызунов. Увеличение времени нахождения в открытых рукавах лабиринта у экспериментальной группы, коррелировало с повышением частоты «выглядываний» в них. В серии опытов с введением пирацетама и ремаксала, значение этого показателя увеличивалось соответственно в среднем в 2,15 раз ($p < 0,05$). Вертикальная двигательная активность грызунов в КПЛ характеризуется 2 видами «вертикальных стоек»: (англ. climbing) или (англ. rearing). По показателю «вертикальная стойка» оценивают мотивационную когнитивную карту ориентировочно-исследовательского поведения животных [5]. В результате отмечено, что число «вертикальных стоек» у подопытных животных, получавших ремаксол и пирацетам, было соответственно в среднем в 5,4 раза ($p < 0,05$) больше, чем до исследования. Исследуемые вещества при данной схеме применения снижали количество фекальных болюсов и актов груминга у подопытных животных. Так, частота дефекаций после 30 дней введения ремаксала и пирацетама была в 2,8 раза ($p < 0,05$) меньше, чем в начале эксперимента. Число актов груминга было соответственно в 2,7 раза ($p < 0,05$) меньше, по сравнению с исходным уровнем. В психофармакологии известно, что уменьшение актов груминга и дефекаций служит косвенным критерием уменьшения тревожности грызунов.

Выводы

При ежедневном внутрибрюшинном введении пирацетама в дозировке 300 мг/кг, а затем ремаксоло (5мл/кг) в течение месяца вызывало повышение всех исследуемых показателей. Увеличение времени, возможно, свидетельствует о наличии анксиолитического эффекта комбинации препаратов пирацетама и ремаксоло при длительном внутрибрюшинном введении грызунам.

Литература

1. Piracetam [online]. Available from URL: <http://www.piracetam.com>
 2. Fessel J. Prevention of Alzheimer's disease by treating mild cognitive impairment with combinations chosen from eight available drugs. *Alzheimers Dement* (N Y). 2019 Nov 16;5:780-788. doi: 10.1016/j.trci.2019.09.019. PMID: 31763432; PMCID: PMC6861553.
 3. Востриков В.В. "Место пирацетама в современной практической медицине" Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, Том. 15, № 1, 2017, с. 14-25.
 4. Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов: метод. указания. М., Изд-во стандартов, 2010. 122 с.
 5. Быстрова М.Н. Демидова, И. Л. Гальчинская, И. С. Жолобов. Исследование влияния различных лекарственных форм успокоительного сбора на поведение мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №2. – URL: <http://www.science-education.ru/102-5780>.
 6. Капышева У.Н., Бахтиярова Ш.К., Баимбетова А.К., Жаксымов Б.И., Корганбаева А.С. Влияние мононуклеаров на когнитивные функции в разные сроки после трансплантации // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 9–2. – С. 279–283.
- THE EFFECT OF CONSECUTIVE ADMINISTRATION OF PIRACETAM AND RE-MAXOL FOR 28 DAYS ON THE BEHAVIOR OF WHITE MONGREL RATS.

Sinyakin I. A.¹, Batalova T. A.¹

FGBOU VO "Amur State Medical Academy", Blagoveshchensk, Russia

Abstract:

Objective: To study the effect of sequential administration of piracetam and remaxol (according to the scheme: 14 days of piracetam, then 14 days of remaxol) on the behavior of rats in the "raised cruciform maze" test.

Materials and methods of the study: the objects of the study were domestic drugs piracetam and remaxol. The experiment was performed on 20 white male mongrel

rats weighing 300-350 g and aged 12 months. The studies were carried out using the standard installation "Raised cross-shaped maze". To assess the reliability of the differences in 2 samples, the Student's t-test was used.

Results: when the drugs piracetam and remaxol were administered for 30 days, pronounced changes in the behavior of experimental rats were noted. Thus, in a series of experiments with the introduction of piracetam + remaxol, the indicator of the number of outputs increased by 4.7 times ($p < 0.05$) compared with the control. The value of the indicator of the frequency of "peeping" increased by an average of 2.15 times ($p < 0.05$). The number of "vertical racks" in experimental animals was on average 5.4 times ($p < 0.05$) more than before the study.

Conclusion: the correlation of indicators in the experiment may indicate the presence of an anxiolytic effect of a combination of drugs with prolonged intraperitoneal administration to rodents.

Key words: piracetam, remaxol, behavior, anxiolytic effect.

УДК 612.84

МОДУЛЯЦИЯ АМПЛИТУДЫ ГАММА ОСЦИЛЛЯЦИЙ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА НЕЙРОНОВ ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЫ МЫШЕЙ УЛУЧШАЕТ КОДИРОВАНИЕ ЗРИТЕЛЬНЫХ СТИМУЛОВ

Смирнов И.В.¹, Иджилова О.С.¹, Волгушев М.А.^{1,2}, Малышев А.Ю.¹

¹*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

²*Университет Коннектикута, Storrs, США*

E-Mail: ivan.vas.smirnov@gmail.com

Аннотация: Процесс обработки информации нейронами неокортекса сопровождается возникновением гамма-осцилляций полевых и мембранных потенциалов. В этой работе, используя петч-кламп регистрацию простых клеток первичной зрительной коры анестезированных мышей, мы показали, что сила гамма осцилляций в мембранном потенциале модулируется медленными колебаниями, вызванными зрительными стимулами. Используя в качестве модели нейроны на переживающих срезах мозга мышей, мы продемонстрировали, что подобная модуляция гамма-осцилляций улучшает кодирование медленных синусоидальных сигналов последовательностью потенциалов действия.

Ключевые слова: зрительная кора, нейрон, гамма осцилляции, кодирование сигналов

Введение: В связи с широким распространением генетических инструментов в последнее время мыши становятся важным объектом исследований в различных областях нейронаук, в том числе и в физиологии зрительной системы [1]. Гамма осцилляции (25-70 Гц) играют важную роль в различных аспектах обработки зрительной информации и способствуют синхронизации активности нейронных ансамблей. В предыдущих работах на зрительной коре кошек было показано, что во время предъявления зрительных стимулов в мембранном потенциале нейронов возникают гамма осцилляции, которые модулируются временной частотой зрительных стимулов таким образом, что во время зрительного ответа эти осцилляции становятся сильнее во время фаз деполяризации и слабее в фазу гиперполяризации [2]. В более поздних работах на математических моделях нейронов было показано, что подобная модуляция высокочастотных осцилляций приводит к улучшению кодирования медленных осцилляций мембранного потенциала и увеличению скорости передачи информации в нейронных сетях [3].

Используя регистрацию методом пэтч-кламп нейронов зрительной коры на анестезированных мышах мы обнаружили, что во время предъявления зрительных стимулов в виде движущихся решеток в мембранном потенциале нейронов возникают осцилляции в гамма диапазоне, огибающая которых синфазна с частотой зрительного стимула. В экспериментах на переживающих срезах мозга нами было показано, что подобная модуляция приводит к улучшению кодирования медленных колебаний через последовательности потенциалов действия.

Методика: Эксперименты были выполнены на взрослых мышах линии C57/Bl6 обоих полов. Животные были анестезированы с помощью внутривентральной инъекции уретана (0.7 — 1 г/кг веса). Петч электроды были заполнены следующим раствором мМ: 140 К-глюконата, 20 KCl, 4 Mg-АТР, 0,3 Na₂-GTP, 10 Na-Фосфокреатинин, 10 HEPES, pH 7.25. Сопротивление электродов составляло 3-4 МОм. Мембранный потенциал регистрировался с помощью усилителя Multiclamp 700B и оцифровывался с частотой 20кГц с помощью Digidata 1550 (Molecular devices, USA).

Зрительная стимуляция осуществлялась с помощью движущихся решеток, демонстрируемых на экране монитора и ориентированных под различными углами. Зрительные стимулы генерировались с помощью программного обеспечения Psychopy3. Монитор был расположен на расстоянии 25 см от животного и покрывал 60-70 градусов зрительного пространства. Пространственная и временная частоты зрительных стимулов составляли 0.04 c/d и 2 Гц соответственно. Решетки двигались в 12 различных направлениях в псевдослучайном порядке. Каждый зрительный стимул предъявлялся в течении 2 секунд. Между зрительными стимулами предъявлялся серый экран в течении 0,5 секунд.

В экспериментах на срезах электроды были заполнены следующим раствором (мМ): 130 К-глюконата, 20 KCl, 4 Mg-АТР, 0,3 Na₂-GTP, 10 Na-Фосфокреатинин, 10 HEPES, рН 7.25. Сопротивление электродов составляло 4 — 6 МОм. Мембранный потенциал регистрировался с помощью усилителя Multiclamp 700В и оцифровывался с частотой 10кГц используя Digidata 1550 (Molecular devices, USA).

Результаты: Во время *in vivo* экспериментов нами было зарегистрировано 24 нейрона из 2-5 слоёв первичной зрительной коры мышей; 16 клеток были классифицированы нами как простые. Ответ простых клеток во время ответа на оптимально ориентированные решетки характеризовались наличием сильной модуляции гамма-осцилляций, происходящей с частотой зрительного стимула (рис 1а). В то же время во время предъявления зрительного стимула неоптимальной ориентации, в мембранном потенциале не возникали ни гамма осцилляции, ни медленные колебания мембранного потенциала. (рис 1б).

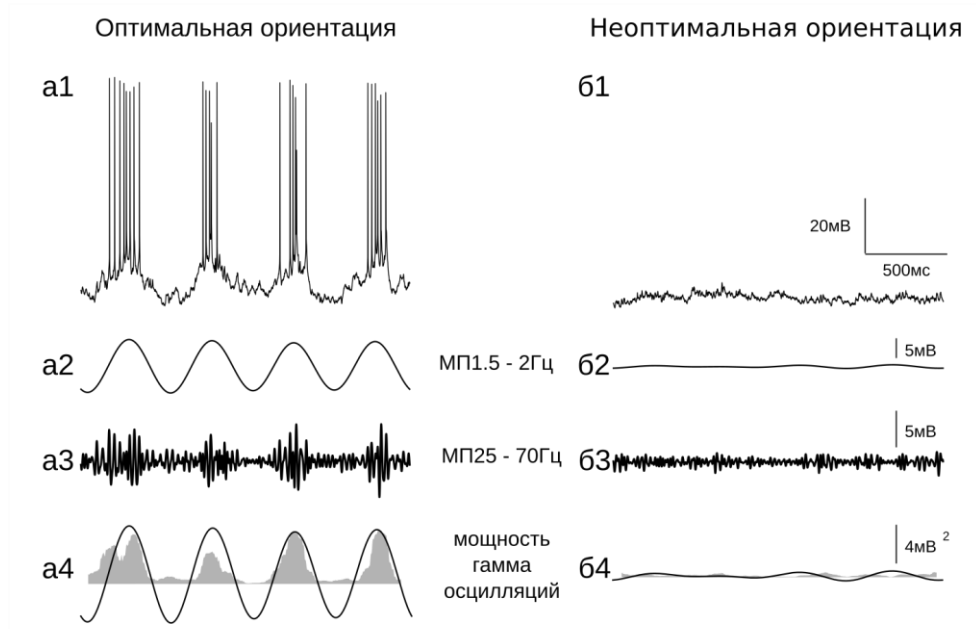


Рисунок 1. Пример внутриклеточной записи ответа нейрона зрительной коры в ответ на предъявление зрительного стимула в виде движущейся решетки

оптимальной (а) и неоптимальной (б) ориентации.

1 Мембранный потенциал, записанный методом петч-кламп в режиме фиксации тока. 2. Осцилляция мембранного потенциала с частотой зрительного стимула, полученная методом Фурье фильтрации. 3. Осцилляции мембранного потенциала в гамма диапазоне, полученные методом Фурье фильтрации (потенциалы действия были предварительно удалены). 4. Мощность гамма осцилляции, полученная методом скользящего RMS.

Для проверки гипотезы, что подобная модуляция гамма осцилляций может улучшать кодирование медленных колебаний мембранного потенциала через последовательность потенциалов действия, были выполнены эксперименты на переживающих срезах мозга. Мы регистрировали потенциалы действия возникающие в ответ на инъекцию в нейроны тока синусоидальной формы с частотой 2 Гц (рис 2). Каждый цикл данной синусоиды представлял собой или «чистую» синусоиду (рис. 2а), или синусоиду, к которой добавлялся немодулированный шум в гамма диапазоне (рис 2б), или синусоиду, к которой добавлялся шум в гамма диапазоне, промодулированный этой же синусоидой (рис. 2в). Всего в этих экспериментах было зарегистрировано 9 нейронов 2/3 слоя. Для каждой такой записи мы рассчитывали среднее количество вызванных потенциалов действия и среднюю частоту потенциалов действия в пачке.

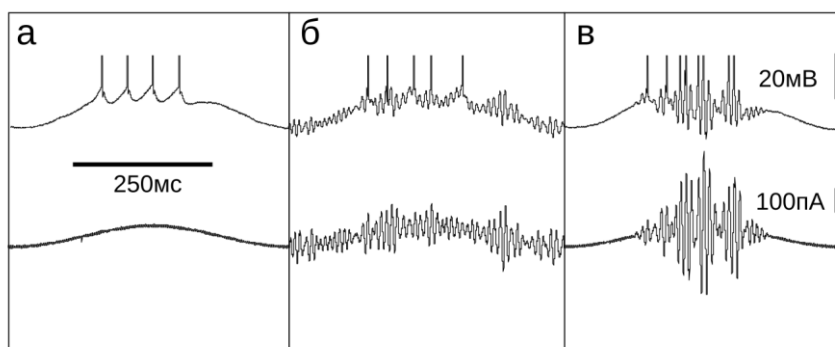


Рисунок 2. Пример инжектированного тока (снизу) и вызываемых им изменений мембранного потенциала (сверху) нейронов в экспериментах на переживающих срезах мозга.

а). Пример синусоиды без добавления шума в диапазоне гамма осцилляций.

б). Пример синусоиды с добавлением немодулированного шума в диапазоне гамма осцилляций.

в) Синусоида с добавлением модулированного шума в диапазоне гамма осцилляций.

Для «чистой» синусоиды и синусоиды с добавлением немодулированного шума среднее количество потенциалов действия в пачке не имело значимых различий ($0,79 \pm 0,06$ и $0,95 \pm 0,01$, $P > 0,05$; нормированные значения), в то время как среднее количество потенциалов действия в пачке для синусоиды с добавлением модулированного шума было значимо выше ($1,26 \pm 0,07$). При исследовании частоты генерации потенциалов действия в пачке нами были получены схожие результаты. Частота генерации потенциалов действия не имела значимых различий для «чистой» синусоиды и синусоиды с добавлением немодулированного шума, в то время как частота генерации потенциалов действия в группе с модулированным была значимо выше ($0,94 \pm 0,02$; $0,94 \pm 0,02$ и $1,13 \pm 0,04$ соответственно; $p < 0,001$; нормированные значения). В качестве статистического теста использовалась ANOVA с критерием Тьюки.

Заключение: В ходе исследования нами было обнаружено, что в простых клетках первичной зрительной коры мыши осцилляции мембранного потенциала в гамма диапазоне модулируются частотой предъявляемого зрительного стимула. В то же время в исследовании на срезах мы показали, что данная модуляция может приводить к улучшению кодирования нейроном медленных осцилляций мембранного потенциала через последовательности потенциалов действия.

Таким образом, феномен амплитудной модуляции гамма осцилляций мембранного потенциала с частотой зрительного стимула, изначально описанный на кошках, может представлять собой универсальный механизм кодирования зрительной информации.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-15-00398).

Литература

1. Matteo C, Churchland AK. Probing perceptual decisions in rodents. // *Nature neuroscience* — 2013 — vol. 16 - № 1 — P 31. doi:10.1038/nn.3410
2. Volgushev, M, Pernberg, J, Eysel, UT. Gamma-frequency fluctuations of the membrane potential and response selectivity in visual cortical neurons. // *The European journal of neuroscience* — 2003 — vol. 17 — PP. 1768–1776. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02609.x.
3. Hoch T., Volgushev S., Malyshev, A., Obermayer, K., Volgushev, M. Modulation of the amplitude of γ -band activity by stimulus phase enhances signal encoding. // *European Journal of Neuroscience* — 2011 — vol. 33 — N7 — PP. 1223-1239. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07593.x.

MODULATION OF THE AMPLITUDE OF GAMMA-BAND OSCILLATIONS BY STIMULUS

PHASE IN MOUSE VISUAL CORTEX NEURONS IMPROVES SIGNAL ENCODING

Running title: GAMMA-BAND OSCILLATIONS IN MOUSE VISUAL CORTEX
NEURONS

I.V. Smirnov¹, O.S. Idzhilova¹, M.A. Volgushev² and A.Y. Malyshev¹

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russia*

² *University of Connecticut, Storrs, USA*

Abstract: Information processing by neurons of the neocortex is accompanied by the appearance of gamma-oscillations of field and membrane potentials. In this work, using patch-clamp registration of simple cells of the primary visual cortex of anesthetized mice, we showed that the strength of gamma oscillations in the membrane potential is modulated by slow oscillations evoked by visual stimuli. Using patch-clamp registration of neurons on the experiencing slices of the neocortex of mice, we have shown that such modulation of gamma oscillations improves the coding of slow sinusoidal signals into a sequence of action potentials.

Key words: visual cortex, neuron, gamma-oscillations, signal encoding

УДК 57.024

БЫСТРАЯ ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛЕЙ МЕСТА В НОВОЙ ОБСТАНОВКЕ

Сотсков В.П.¹, Плюснин В.В.^{2,3}, Поспелов Н.А.¹, Анохин К.В.^{1,4}

¹*Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия.*

²*Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва,
Россия.*

³*Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия*

⁴*НИИ Нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН, Москва, Россия*

E-mail: ysotskov@list.ru

Аннотация: Формирование нейронных специализаций - важный вопрос современной нейрофизиологии. Данная работа посвящена описанию динамики формирования специализации клеток места в гиппокампе мышей. Для этого

было проведено прямое измерение активности нейронов места в трёх последовательных сессиях съёмки с интервалом 24 часа. Была охарактеризована специфичность активности клеток места по отношению к каждому из полей места, а также латенция формирования полей места. Было показано, что существенная часть (26%) полей места формируется в ходе самого первого их посещения животным, причём в последующих сессиях латенция формирования полей места снижалась вне зависимости от того, сохранялась ли у данного животного когнитивная карта первого дня. Также было показано, что селективность клеток растёт в течение каждой сессии, но не накапливается между сессиями.

Ключевые слова: клетки места; поля места; когнитивная специализация; кальциевый имиджинг; минископы

Понимание механизмов специализации отдельных нейронов относительно внешних стимулов является одним из ключевых вопросов нейрофизиологии. Гиппокампальные клетки места представляют собой хорошо изученную модель такой специализации [1], их рецептивные поля (поля места) сохраняются в течение долгого времени [2], однако кратковременные свойства полей места в начальный момент помещения животного в новую обстановку остаются слабо исследованными. Для прямого измерения динамики специализации пространственно селективных клеток нами была проведена съёмка активности нейронов поля CA1 гиппокампа бодрствующих мышей при помощи монтируемых на голову миниатюрных микроскопов (минископов) в процессе свободного, неподкрепляемого исследования животными новой обстановки, а также в ходе двух повторных сессий в той же обстановке через 24 ч и 48 ч.

Методика: Для данного исследования было взято $n = 12$ взрослых половозрелых мышей линии C57Bl6. Животным под наркозом была

произведена транскраниальная микроинъекция вирусных частиц, кодирующих различные кальциевые сенсоры, затем, через 2 недели после микроинъекций, животным под наркозом были имплантированы микроэндоскопы (GRIN-линзы), после чего были установлены крепления для хронической регистрации нейронной активности минископом Nvista HD [3]. Через неделю после появления удовлетворительного кальциевого сигнала животные с подключёнными минископами Nvista HD помещались на 15 мин в новую обстановку (кольцевой трек с ориентирами), где демонстрировали свободное исследовательское поведение. Через 24ч и 48ч производились аналогичные сессии съёмки.

Данные нейронной активности были извлечены из сырого видеосигнала при помощи алгоритмов NoRMCorre [4] и MIN1PIPE [5], после чего полученные временные ряды активности каждого нейрона были сопоставлены с траекторией животного. В результате этого сопоставления, на основе пространственной статистики активаций, были выделены пространственно-селективные клетки (клетки места). У каждой из клеток допускалось наличие нескольких полей места; при этом, в течение всей сессии для каждого поля места была подсчитана динамическая селективность как отношение числа активаций при данном проходе животным этого поля места к полному числу активаций за данный круг (возможно, не полный). Далее, для каждого поля места была подсчитана латенция специализации как номер (и время) прохода через поле места, начиная с которого динамическая селективность устойчиво (3 и более раз) превышает значение 50%.

Результаты: На второй и третий день эксперимента у части животных (4 из 12) наблюдалось сохранение когнитивной карты (т.е., совокупности полей места), тогда как у другой части наблюдалось перестроение когнитивной карты. Нами было показано, что в условиях новой обстановки средняя латенция специализации составила 231 с или 7 посещений. При этом, в существенной

части (26%) клеток специализация наступала в самый первый момент посещения животным соответствующего поля места. В последующих сессиях съёмки наблюдалось устойчивое сокращение латенции специализации, безотносительно перестроения или сохранения когнитивной карты у животных на второй и третий день эксперимента. При этом динамическая селективность росла в течение каждой из сессий, но её накопления между сессиями не наблюдалось. Кроме того, для каждой сессии был проведён популяционный анализ всех нейронов, не обязательно селективных, и было показано, что данные нейронной активности позволяют восстановить траекторию животных в кольцевом треке. Также было показано, что ошибка реконструкции траектории находится в хорошем соответствии с динамической селективностью.

Заключение: Нами впервые была измерена динамика специализаций отдельных клеток места, было показано, что селективность клеток накапливается во время сессии, но её накопления в последующие дни при этом не происходит. Также было измерено время, требующееся для специализации клеток, при этом было показано наличие клеток, специализирующихся сразу. Эти факты могут служить мощным фундаментом для поиска триггеров, приводящих к специализации, будь то отдельные акты поведения или определённые состояния активности популяции нейронов.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект», а также гранта РФФИ № 20-15-00283.

Литература

- 1 O'Keefe J., Dostrovsky J.: The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. // Brain Res. - 1971 - 4(1):171-5. doi: 10.1016/0006-8993(71)90358-1.

- 2 Ziv Y., Burns L.D., Cocker E.D., Hamel E.O., Ghosh K.K., Kitch L.J., El Gamal A., Schnitzer M.J.: Long-term dynamics of CA1 hippocampal place codes. // *Nat Neurosci.* - 2013 - 16(3):264-6. doi: 10.1038/nn.3329.
- 3 Ghosh K.K., Burns L.D., Cocker E.D., Nimmerjahn A., Ziv Y., Gamal A.E., Schnitzer M.J.: Miniaturized integration of a fluorescence microscope. // *Nat Methods.* -2011 - 8(10):871-8. doi: 10.1038/nmeth.1694.
- 4 Pnevmatikakis E.A., Giovannucci A.: NoRMCorre: An online algorithm for piecewise rigid motion correction of calcium imaging data. // *J Neurosci Methods.* - 2017 - 291:83-94. doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.07.031.
- 5 Lu J, Li C, Singh-Alvarado J, Zhou ZC, Fröhlich F, Mooney R, Wang F. MIN1PIPE: A Miniscope 1-Photon-Based Calcium Imaging Signal Extraction Pipeline. // *Cell Rep.* - 2018 - Jun 19;23(12):3673-3684. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.062.

THE RAPID DYNAMICS OF PLACE CELL EMERGENCE IN A NOVEL ENVIRONMENT

Sotskov V. P.¹, Plusnin V. V.^{2,3}, Pospelov N. A.¹ and Anokhin K.V.^{1,4}

1 Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

2 National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

3 Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

4 P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology RAS, Moscow, Russia

Abstract: The emergence of neuronal specializations poses one of the most important questions in modern neuroscience. This study describes the dynamics of hippocampal place cell tuning in mice. To address this, we performed a direct measurement of place cell activity in three consequent imaging sessions 24h apart from each other. The specificity of place cells and the tuning latency were characterized for each place field. It was shown that a significant part (26%) of place fields do form during the very first animal’s attendance of them. Moreover, the average tuning latency in further sessions decreased despite the retention of the first

day's cognitive map in a given animal. Also it was shown that selectivity of place cells increases within each session, but does not cumulate across sessions.

This research has been supported by the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University «Brain, Cognitive Systems, Artificial Intelligence» and Russian Scientific Foundation grant № 20-15-00283.

Key words: place cells; place fields; cognitive specialization; calcium imaging; miniscopes

УДК 577.24

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА РАЗВИТИЕ НИКОТИНОВОЙ
ЗАВИСИМОСТИ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС ОПОСРЕДУЕТСЯ ИЗМЕНЕНИЕМ
ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ВЕНТРАЛЬНОЙ
ТЕГМЕНТАРНОЙ ОБЛАСТИ

Стратилов В.А.¹, Ветровой О.В.^{1, 2}

¹*ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург,
Россия.*

²*ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский Государственный Университет”,
Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия.*

E-mail: stratilov.v@infran.ru

Ключевые слова: пренатальная гипоксия; глутаматергическая система; никотиновая зависимость; вентральная тегментарная область; аддикции.

Аннотация: Основная проблема нейробиологии аддикций заключается в отсутствии понимания причин широкой вариабельности индивидуальной предрасположенности к зависимостям [1], [2]. Накоплен существенный массив информации о наследственных факторах риска развития аддикций [3], [4], однако до сих пор не сформирована цельная картина представлений о влиянии факторов внешней среды, особенно в период перинатального онтогенеза, на эффективность функционирования системы «вознаграждения».

Клинические данные и результаты экспериментальных исследований на животных показывают влияние стресса матери, сопровождающегося выбросом эндогенных глюкокортикоидных гормонов, а также патологий плаценты на дальнейшее физическое [5]–[8] и когнитивное развитие потомства. Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм пренатального стресса [9], [10].

В настоящем исследовании была произведена оценка влияния такого широко распространённого фактора, как пренатальная гипоксия (ПГ), сочетающего в себе, как компонент стресса матери, так и имитацию кислородной депривации плода, на дальнейшее развитие у потомства никотиновой зависимости во взрослом возрасте.

Методика: С целью моделирования пренатальной гипоксии самок крыс подвергали 3 сеансам тяжелой гипобарической гипоксии на 14-16 сутки беременности (3 часа, 180 мм.рт.ст. (5% O₂), 20-25 °C). У взрослых 3-месячных потомков оценивалась склонность к потреблению никотина (тест свободного потребления) в течение 2 недель, а также степень развития абстиненции в тесте предпочтения места (мотивационный эффект антагониста никотиновых ацетилхолиновых рецепторов – мекамиламина) [11] после 2 недельной контролируемой индукции никотиновой зависимости при помощи осмотических помп Alzet. Количество дофамина в стриатуме и вентральной тегментарной области мозга (VTA) оценивалось методом ИФА. Уровни

фосфорилированного по 34 треониновому остатку белка DARPP-32 (pThr34DARPP-32) в прилежащем ядре стриатума (NAcc) оценивались методом вестерн-блот. Плотность глутаматергической иннервации дофаминергических нейронов VTA оценивалась методом тройной иммуофлюоресценции.

Результаты: У ПГ крыс нами выявлена повышенная склонность к свободному потреблению никотина по сравнению с контрольными животными на вторую неделю тестирования. Также в тесте условнорефлекторной реакции избегания с использованием мекамиламина после 2 недельного контролируемого потребления никотина было обнаружено усиленное избегание мекамиламин-ассоциированной половины тестовой установки у ПГ крыс по сравнению с контролем.

При изучении особенностей функционирования дофаминергической системы мозга взрослых крыс, переживших ПГ, нами было обнаружено увеличение доли DARPP-32, фосфорилированного по Thr34, по отношению к общему DARPP-32 в NAcc на фоне отсутствия изменений количества дофамина в стриатуме и среднем мозге, и дофаминовых рецепторов 1го типа в стриатуме (вестерн блот, иммуофлюоресценция). Наблюдаемые паттерны фосфорилирования белка DARPP-32 при отсутствии изменений в количестве дофамина и его рецепторов 1го типа в NAcc могут быть объяснены как локальным ослаблением глутаматной стимуляции нейронов NAcc, так и усилением глутаматной стимуляции нейронов VTA. С целью проверки гипотезы измененной глутаматергической стимуляции дофаминергических нейронов VTA, иммуогистохимическим методом нами была установлена плотность VGluT2-позитивного (везикулярный глутаматный транспортер) сигнала на Nurr1 (Nuclear related-1 protein, транскрипционный фактор, маркер дофаминергических нейронов и их клеток-прекурсоров) позитивных телах нейронов, демонстрирующая увеличенную иннервацию дофаминергических нейронов VGluT2-позитивными терминалями у ПГ крыс по сравнению с

контролем. Это потенциально может играть огромную роль в развитии именно никотиновой зависимости, поскольку в VTA чувствительные к никотину nAChR7 располагаются преимущественно на глутаматергических терминалях.

Заключение: Таким образом, нами установлено, что:

1. Пережитая на 14-16 сутки внутриутробного развития, пренатальная гипоксия вызывает повышенную склонность к потреблению никотина во взрослом возрасте у крыс.
2. Абстинентный синдром, вызванный отменой 2-недельного хронического приема никотина и форсированный однократным введением мекамиламина более выражен у крыс, переживших пренатальную гипоксию.
3. Эффект пренатальной гипоксии не связан с изменениями в общем уровне дофамина в вентральной тегментарной области и прилежащем ядре стриатума взрослых крыс, также он не связан с изменением в количестве дофаминового рецептора первого типа в прилежащем ядре.
4. Пренатальная гипоксия приводит к достоверному увеличению доли фосфорилированного по 34 треониновому остатку белка DARPP-32 в прилежащем ядре стриатума у взрослых крыс.
5. Изменения в паттернах фосфорилирования DARPP-32, по-видимому, связаны с изменениями в глутаматной трансдукции в вентральной тегментарной области и прилежащем ядре стриатума.

Литература

- [1] S. S. Martins, J. Santaella-Tenorio, B. D. L. Marshall, A. Maldonado, and M. Cerdá, "Racial/ethnic differences in trends in heroin use and heroin-related risk behaviors among nonmedical prescription opioid users," *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 151, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.03.020.
- [2] D. A. Nielsen *et al.*, "Former heroin addicts with or without a history of cocaine dependence are more impulsive than controls," *Drug and Alcohol Dependence*, vol. 124, no. 1–2, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.12.022.

- [3] J. C. Crabbe, "Genetic Contributions to Addiction," *Annual Review of Psychology*, vol. 53, no. 1, Feb. 2002, doi: 10.1146/annurev.psych.53.100901.135142.
- [4] L. A. Briand and J. A. Blendy, "Molecular and genetic substrates linking stress and addiction," *Brain Research*, vol. 1314, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.brainres.2009.11.002.
- [5] S. Bloom, "Antenatal dexamethasone and decreased birth weight," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 97, no. 4, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0029-7844(00)01206-0.
- [6] N. P. French, R. Hagan, S. F. Evans, M. Godfrey, and J. P. Newnham, "Repeated antenatal corticosteroids: Size at birth and subsequent development," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 180, no. 1, Jan. 1999, doi: 10.1016/S0002-9378(99)70160-2.
- [7] M. Nyirenda and L. Welberg, "Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect or maternal influence?," *Journal of Endocrinology*, vol. 170, no. 3, Sep. 2001, doi: 10.1677/joe.0.1700653.
- [8] J. Reinisch, N. Simon, W. Karow, and R. Gandelman, "Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth," *Science*, vol. 202, no. 4366, Oct. 1978, doi: 10.1126/science.705336.
- [9] O. Vetrovoy *et al.*, "Long-Term Effects of Prenatal Severe Hypoxia on Central and Peripheral Components of the Glucocorticoid System in Rats," *Developmental Neuroscience*, 2021, doi: 10.1159/000512223.
- [10] F. Xiong and L. Zhang, "Role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in developmental programming of health and disease," *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 34, no. 1, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.yfrne.2012.11.002.
- [11] T. Suzuki, Y. Ise, M. Tsuda, J. Maeda, and M. Misawa, "Mecamylamine-precipitated nicotine-withdrawal aversion in rats," *European Journal of Pharmacology*, 1996, doi: 10.1016/S0014-2999(96)00723-6.

**THE INFLUENCE OF PRENATAL HYPOXIA ON THE DEVELOPMENT
OF NICOTINE ADDICTION IN ADULT RATS PROMOTED BY
ALTERATIONS IN GLUTAMATE STIMULATION OF THE VENTRAL
TEGMENTAL AREA IN ADULT RATS**

Stratilov V.A.¹, Vetrovoy O.V.^{1,2}

¹ *Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg,
Russia*

² *Faculty of Biology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*

Abstract: The main problem of the addictive neurobiology is the lack of understanding the reasons for the wide variability of individual predisposition to addictions [1], [2]. A substantial amount of information has been accumulated on hereditary risk factors for the development of addictions [3], [4], however, a complete picture of the concept of the influence of environmental factors, especially during the period of perinatal ontogenesis, on the efficiency of the “reward” system has not yet been formed.

Clinical data and the results of experimental studies on animals show the effect of maternal stress, accompanied by the release of endogenous glucocorticoid hormones, as well as pathologies of the placenta, on the further physical [5] - [8] and cognitive development of the offspring. Hypoxia is one of the most common forms of prenatal stress [9], [10].

In the present study, the influence of such a widespread factor as prenatal hypoxia (PG) on the further development of nicotine addiction in offspring in adulthood was assessed.

Key words: prenatal hypoxia; glutamatergic system; nicotine addiction; ventral tegmental area; addiction.

УДК 612.821

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С
НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕМ, ПРИ ВВЕДЕНИИ В ГИППОКАМП
ИНГИБИТОРОВ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.

Третьякова Л.В., Квичанский А.А., Большаков А.П., Гуляева Н.В.

*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

E-mail: kind.dr.lee@gmail.com

Аннотация: Работа направлена на уточнение вклада кортикостероидных рецепторов в нейровоспалительный ответ. Изучены изменения экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, в гиппокампе после введения в него ингибиторов глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов (мифепристона и спиронолактона, соответственно). На модели острого локального нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом (ЛПС/LPS), ингибиторы оказывали слабое влияние на воспалительный ответ. Эти данные не подтверждают участие кортикостероидных рецепторов в нейровоспалительном ответе в данной модели.

Ключевые слова: гиппокамп, нейровоспаление, цитокины, мифепристон, спиронолактон.

Глюкокортикостероиды (ГКС) известны как основные регуляторы стрессового и воспалительного ответов как на локальном, так и на системном уровнях. Они осуществляют свои функции через два типа рецепторов – глюкокортикоидный и минералокортикоидный, которые экспрессируются многими типами клеток, в т.ч. клетками нервной и иммунной системы. Как правило, активация данных рецепторов приводит к ингибированию активности иммунных клеток и индукции апоптоза лимфоцитов [1]. Однако в некоторых ситуациях ГКС могут усиливать воспалительные процессы [2], в том числе нейровоспаление. Считают, что вышедший из-под контроля нейровоспалительный процесс может оказывать повреждающее воздействие на гиппокамп, высокочувствительную к нейровоспалению структуру, и лежать в основе таких патологий, как

расстройства депрессивного спектра, эпилепсия, постинсультные и посттравматические аффективные и когнитивные нарушения [3, 4]. Ранее нами было показано, что введение дексаметазона (агониста глюкокортикоидных рецепторов) самого по себе в гиппокамп приводит к слабому нейровоспалительному ответу. При этом применение дексаметазона во время нейровоспаления, индуцированного ЛПС, может вызывать как усиление, так и подавление экспрессии генов некоторых провоспалительных цитокинов в гиппокампе [5]. В данной работе был проведен анализ влияния локального введения ингибиторов глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов (мифепристона и спиронолактона, соответственно) на развитие острого нейровоспаления в гиппокампе крысы.

Методика: С целью индукции локального острого нейровоспаления в гиппокамп вводили бактериальный липополисахарид (ЛПС) *E.Coli* (0.2 г/л), широко используемый в качестве провоспалительного агента *in vivo*. В ходе работы было изучено влияние мифепристона ($1.05 \cdot 10^{-14}$ моль) и спиронолактона ($1.3 \cdot 10^{-14}$ моль) как самих по себе, так и в комбинации с ЛПС, на процессы нейровоспаления по изменению экспрессии генов некоторых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе. В качестве растворителя был выбран фосфатно-солевой буфер (PBS), так как его внутригиппокампальное введение не вызывало изменений морфологии микроглии. Это позволило использовать группу животных с инъекцией PBS в качестве контроля для оценки локального воздействия на ткань гиппокампа экспериментальных веществ.

В эксперименте принимало участие 49 самцов крыс линии Wistar (300-380 г), которые были разделены на 7 групп по 6-8 особей в каждой: (1) интактные животные; (2) PBS; (3) LPS+PBS; (4) спиронолактон+PBS; (5) спиронолактон+LPS+PBS; (6) мифепристон+PBS; (7) мифепристон+LPS+PBS.

Все хирургические манипуляции проводились под ингаляционным наркозом (2-3% изофлуран). Трепанацию черепа производили в левой (AP= -3.5 мм, L= +2.00 мм) и правой (AP=-3.5 мм, L=-2.00 мм) теменных костях. Вещества в объёме 1 мкл инъецировали в зубчатую извилину дорсального гиппокампа (H=-3.5 мм) при помощи шприца Hamilton со скоростью 0.15 мкл/сек. После операции животных возвращали в их клетки. Через 3 дня после инъекции крысы были анестезированы 10% хлоралгидратом и подвергнуты транскардиальной перфузии 0.9% раствором NaCl, после чего были препарированы образцы тканей дорсального и вентрального гиппокампов левого полушария для оценки экспрессии мРНК генов, ассоциированных с нейровоспалением (Il1b, Tnf, Il6, Cx3cl1, Cx3cr1, Ccl2, Tgfb1, Ncf1) методом ПЦР "в реальном времени". Образцы правых полушарий фиксированы в 4% формальдегиде для последующего иммуногистохимического окрашивания на Iba1 с целью оценки развития микроглиоза в зоне нейровоспаления.

Результаты: Было обнаружено, что в дорсальном гиппокампе введение ЛПС приводило к статистически значимому увеличению экспрессии генов Il1b, Tnf, Tgfb1, Ccl2 и Ncf1 по сравнению с контрольной группой. Мифепристон и спиронолактон сами по себе не оказывали влияния на уровни экспрессии ранее упомянутых генов (Il1b, Tnf, Tgfb1, Ccl2 и Ncf1), а также не предотвращали увеличение их экспрессии во время нейровоспаления, индуцированного введением ЛПС, в дорсальном гиппокампе. Однако введение этих ингибиторов вызывало тенденцию к снижению экспрессии Il6, который был повышен после введения ЛПС. В вентральном гиппокампе была зафиксирована только тенденция к увеличению экспрессии генов Il1b и Ncf1 после инъекции ЛПС.

Заключение: Используя модель острого локального нейровоспаления, индуцированного внутригиппокампальным введением ЛПС, мы обнаружили, что введение ингибиторов глюкокортикоидного и минералокортикоидного

рецепторов (мифепристона и спиронолактона, соответственно) оказывает слабое влияние на нейровоспалительный ответ. По-видимому, интенсивное нейровоспаление, вызванное введением ЛПС в ткань гиппокампа, не опосредовано активацией глюкокортикоидных и минералкортикоидных рецепторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-315-90081.

Литература:

1. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. // Nat Rev Immunol. – 2017 – Vol. 17 - PP. 233–247. doi: 10.1038/nri.2017.1.
2. Bolshakov AP, Tret'yakova LV, Kvichansky AA, Gulyaeva NV. Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation. // Biochemistry (Moscow) – 2021 - Vol. 86 - № 2 - PP. 156-167. doi: 10.1134/S0006297921020048.
3. Gulyaeva NV. Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response // Biochemistry (Moscow) – 2019 - Vol. 84 - № 11 - PP. 1306-1328. doi: 10.1134/S0006297919110087.
4. Gulyaeva NV. Stress-Associated Molecular and Cellular Hippocampal Mechanisms Common for Epilepsy and Comorbid Depressive Disorders // Biochemistry (Moscow) – 2021 – Vol. 86 - № 6 – PP. 641-656. doi: 10.1134/S0006297921060031.
5. Tret'yakova LV, Kvichansky AA, Bolshakov AP, Gulyaeva NV. Dexamethasone Modulates Lipopolysaccharide-Induced Expression of Proinflammatory Cytokines in Rat Hippocampus. // Neurochem J. – 2021 – Vol. 15 - № 3 – PP. 302-307. doi: 10.1134/S1819712421330011.

EXPRESSION OF NEUROINFLAMMATION-ASSOCIATED GENES AFTER INTRAHIPPOCAMPAL ADMINISTRATION OF CORTICOSTEROID RECEPTOR INHIBITOR

Tret'yakova L.V., Kvichansky A.A., Bolshakov A.P., Gulyaeva N.V.

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia

Abstract: The study was aimed at elucidation of corticosteroid receptors contribution in the neuroinflammatory response. Expression of genes associated with neuroinflammation were studied after intrahippocampal administration of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor inhibitors (mifepristone and spironolactone, respectively). In LPS-induced model of acute local neuroinflammation, the inhibitors had little effect, thus, not supporting the involvement of corticosteroid receptors in neuroinflammatory response.

Key words: hippocampus, neuroinflammation, cytokines, mifepristone, spironolactone.

УДК 591.513.2

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО
СТРЕССА
НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ У ВЗРОСЛЫХ КРЫС

**Филенко П.А.^{1,2}, Сидорина В.В.¹, Шаркова А.В.¹, Закиров Ф.Х.¹, Зайченко
М.И.¹, Григорьян Г.А.¹**

*1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва,
Россия*

*2 Биологический факультет Московского государственного университета им.
М.В. Ломоносова*

E-mail: p.filenko98@gmail.com

Аннотация: Влияние стресса на когнитивные функции в настоящее время активно изучается, так как в зависимости от интенсивности и длительности

может оказывать как негативное, так и стимулирующее воздействие. В работе исследуется влияние острого и хронического провоспалительного стресса на пространственное обучение и память в водном лабиринте у крыс.

Ключевые слова: стресс; липополисахарид; водный лабиринт Морриса; когнитивные функции

Влияние стрессовых воздействий на биохимические и иммунологические процессы в организме изучено достаточно хорошо. Однако насчет влияния провоспалительного стресса на когнитивные функции в научном сообществе нет единого мнения. Существующие исследования [1, 2, 3, 4] показывают неоднозначность воздействия на пространственное обучение и память. Известно, что острый стресс при определенных условиях может оказывать стимулирующее воздействие благодаря активации ГГНС, выбросу катехоламинов и глюкокортикоидов, активации симпатической нервной системы и купированию подавляющего действия за счет активации стресс-лимитирующих систем. При хроническом стрессе происходят аналогичные процессы, но длительность воздействия приводит к истощению и, как следствие, нарушению нормального функционирования организма. Несмотря на актуальность проблемы, исчерпывающих данных о воздействии стресса на обучение и память к настоящему времени нет.

Работа направлена на уточнение представления о влиянии стрессовых воздействий на когнитивные функции в зрелом возрасте.

Методика: Острый стресс создавался путём однократного подкожного введения липополисахарида *Escherichia coli* (350 мкг/кг) за час до обучения. Хронический стресс создавался путём введения 200 мкг/кг ЛПС в течение семи дней за час до обучения. Контрольным крысам по аналогичной схеме вводили

физиологический раствор. В каждой из 4 групп было по 10 крыс. Влияние стресса оценивали в водном лабиринте Морриса. Исследовали проявление долговременной памяти в течение 9 дней при постоянном положении платформы и интервалом между пробами 24 часа, на десятый день проводилась тестовая проба при отсутствии платформы; и рабочей памяти в течение 4-х дней с 4-мя пробами в день и интервалом между пробами в 30с., положение платформы каждый день менялось. Так же проводились измерения биохимических маркеров стресса в крови.

Результаты: Крысы после острого однодневного стресса демонстрировали меньшее время достижения платформы по сравнению с другими группами крыс. Наиболее отчетливо проявляется разница в проплываемой дистанции. В группе с острым стрессом этот показатель был достоверно меньше по сравнению с другими группами. В то же время скорость плавания у стрессированных групп была ниже, чем у контрольных, но между стрессированными группами отличалась незначительно. Группа крыс с острым стрессом проводила меньше времени на периферии бассейна, чем другие группы. В тестовой пробе крысы из группы с острым и хроническим стрессом проводили больше времени в квадранте и в зоне платформы по сравнению с контрольными, однако различия оказались недостоверными. Тестирование на краткосрочную память показало значительные различия за счет худших результатов группы с хроническим стрессом. Однако, эффект взаимодействия ГРУППА x ПРОБА оказался недостоверным. После стрессового воздействия уровень кортикостерона значимо возрастал во всех группах.

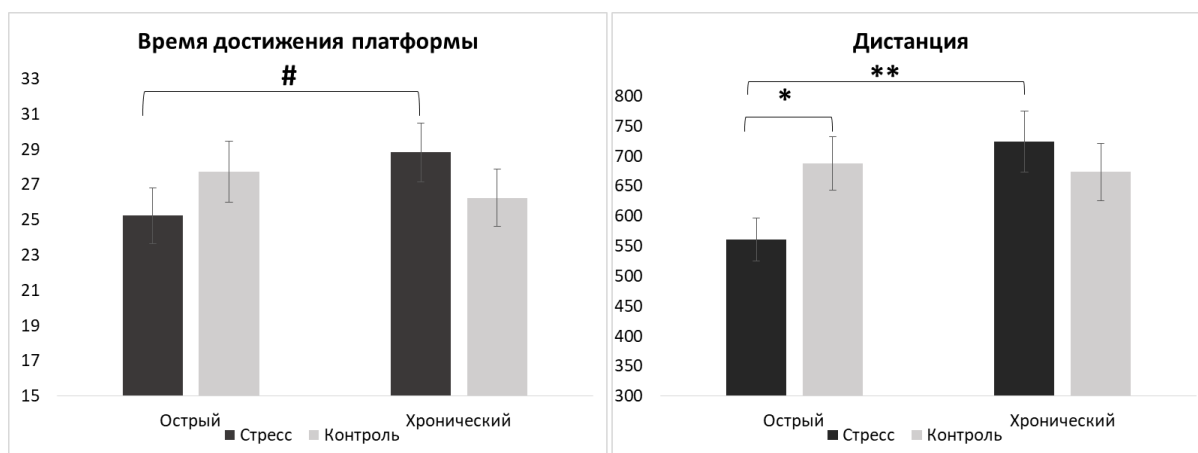


Рисунок 1. Время достижения платформы (А) и проплываемая до платформы дистанция (Б). По вертикальной оси (А) - время в с и (Б) дистанция в см..* - различия статистически достоверны при $p < 0.05$, # - различия на уровне тенденции $p < 0.1$.

Закключение: Полученные результаты показывают, что воздействие стресса на долговременную память производит неоднозначный эффект. Крысы, получавшие однократный стресс на уровне тенденции находили платформу быстрее и для её достижения достоверно проходили наименьшее расстояние. Различия в пробах на кратковременную память показывают, что хронический стресс изменяет поведение крыс в водном лабиринте Морриса, значительно ухудшая обучение.

Литература

1. Keymoradzadeh A, Hedayati Ch M, Abedinzade M, Gazor R, Rostampour M, Taleghani BK. Enriched environment effect on lipopolysaccharide-induced spatial learning, memory impairment and hippocampal inflammatory cytokine levels in male rats. *Behav Brain Res.* 2020 Sep 15;394:112814. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112814. Epub 2020 Jul 22. PMID: 32707137.
2. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, Lu D, Wei W, Wang Y, Li H, Fu Y, Zhu L. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep.* 2019 Apr 8;9(1):5790. doi: 10.1038/s41598-019-42286-8. PMID: 30962497; PMCID: PMC6453933.
3. Czerniawski J, Guzowski JF. Acute neuroinflammation impairs context discrimination memory and disrupts pattern separation processes in hippocampus. *J Neurosci.* 2014 Sep 10;34(37):12470-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0542-14.2014. PMID: 25209285; PMCID: PMC4160778.
4. Huang ZB, Wang H, Rao XR, Liang T, Xu J, Cai XS, Sheng GQ. Effects of immune activation on the retrieval of spatial memory. *Neurosci Bull.* 2010 Oct;26(5):355-64. doi: 10.1007/s12264-010-0622-z. PMID: 20882061; PMCID: PMC5560354.

EFFECTS OF ACUTE AND CHRONIC PROINFLAMMATORY LIPOPOLYSACCHARIDE STRESS ON LEARNING AND MEMORY IN ADULT RATS

Filenko P. A.^{1,2}, Sidorina V. V.¹, Sharkova A.V.¹, Zakirov F. Kh.¹, Zaichenko M.
I.¹, Grigoryan G. A.¹

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, Russia*

Abstract: The effect of stress on cognitive functions is currently being actively studied, since, depending on the intensity and duration, it can have either negative or stimulating effects. The paper investigates the effect of acute and chronic pro-inflammatory lipopolysaccharide stress on spatial learning and memory in the Morris water maze in adult rats.

Key words: stress, lipopolysaccharide, Morris water maze, cognitive function

УДК 612.85

КОДИРОВАНИЕ ЗВУКОВ НЕЙРОНАМИ С V-ОБРАЗНЫМИ ЧАСТОТНЫМИ РЕЦЕПТИВНЫМИ ПОЛЯМИ В СЛУХОВЫХ ЦЕНТРАХ МОЗГА ДОМОВОЙ МЫШИ

Хорунжий Г.Д., Егорова М.А.

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

E-mail: khurunzhii.gd@gmail.com

Аннотация: Изучение функциональной специализации нейронов слуховых центров мозга в обработке звуковой информации является актуальной задачей физиологии слуха. В настоящей работе выполнен сравнительный анализ частотных и временных свойств активности V-образных нейронов слуховых центров ствола мозга и слуховой коры мыши. Полученные данные выявили принципиальные различия между стволовым и корковым уровнями слуховой системы как по доле V-образных нейронов, так и по временным характеристикам их активности, что позволило предположить различную специализацию данных нейронов в обработке звуков слуховыми центрами ствола мозга и слуховой корой.

Ключевые слова: слух, одиночные нейроны, частотные рецептивные поля, временной анализ звука, задние холмы, слуховая кора

При исследовании механизмов кодирования звуковых сигналов нейронами слуховых центров мозга млекопитающих большое внимание уделяется

изучению строения их частотных рецептивных полей [1-5]. Разработанные классификации частотных рецептивных полей слуховых нейронов, как правило, основаны на особенностях соотношения их тормозных и возбуждающих входов. При этом во всех классификациях выделяют, в первую очередь, нейроны, имеющие узкую частотную настройку, близкую к частотной настройке слухового нерва, т.е. нейроны с узкими частотными рецептивными полями, а также широко настроенные нейроны, с широкими частотными рецептивными полями, так называемые V-образные нейроны [1-3, 5]. Впервые в восходящем слуховом пути V-образные нейроны появляются в постеро-вентральном кохлеарном ядре. Это - так называемые клетки-октопусы [6]. Далее по ходу слухового пути V-образные нейроны были обнаружены в центральном ядре заднего холма (ЦЯ) среднего мозга и в первичной слуховой коре (СК) [1, 3]. Такие нейроны, как правило, имеют широкие, симметричные области возбуждательного ответа, слабые боковые тормозные зоны и фазные характеристики ответа на звук. Эти свойства существенно отличают V-образные нейроны от остальных нейронов слуховой системы, что дает основания предположить, что и их функции должны обладать определенной спецификой. Для понимания роли данных нейронов в обработке слуховой информации необходимо выполнить сравнительный анализ частотно-временных свойств их активности на различных уровнях слуховой системы, что и стало целью нашей работы.

Методика: В работе внеклеточно регистрировали импульсную активность одиночных нейронов слухового центра среднего мозга (ЦЯ) и СК у наркотизированных мышей *Mus musculus*, самок – гибридов линии NMRI с дикими животными в возрасте 8–15 недель. Методика подготовки животного к эксперименту и регистрации импульсной активности одиночных нейронов ЦЯ и СК подробно описана ранее [1,3]. Анестезию поддерживали внутрибрюшинными инъекциями смеси кетамина (кетавет, 35 мг/кг) и

ксилазина (ромпун, 0.1 мг/кг) каждые 20 - 45 мин. Для излучения звука в диапазоне частот 1 - 30 кГц использовали электродинамический излучатель (Thiel, C2 33/8), в диапазоне 12 - 75 кГц - изготовленный по специальному заказу электростатический излучатель. Излучатели были размещены на расстоянии 60 см от уха животного, контралатеральной стороне регистрации, под углом 45° к сагиттальной плоскости.

Для регистрации активности нейронов ЦЯ использовали стеклянные микропипетки с диаметром кончика 1-3 мкм и сопротивлением 5-7 МОм, заполненные 3М раствором KCl. Генерация сигналов и тестирование частотных рецептивных полей нейронов производились автоматически на базе двухканального комплекса Tacita и системной платы BOTIM3 (тактовая частота 250 кГц, разрешение по амплитуде 12 бит) с использованием контролируемой компьютером однотоновой парадигмы, разработанной Dr. Dörrscheidt (Германия). Тональные сигналы длительностью 60 мс, включая время нарастания и спада по 5 мс, предъявляли с интервалом 300 мс. Каждый сигнал предъявляли трижды, в случайном порядке комбинаций 16 фиксированных частот и 16 интенсивностей (256 различных тонов).

Для регистрации активности нейронов СК использовали изолированные лаком вольфрамовые микроэлектроды с диаметром кончика 1-3 мкм и сопротивлением 5-6 МОм. Регистрацию производили на глубине 300 - 600 мкм, что соответствовало расположению III-V слоев коры. Генерация звуков и тестирование частотных рецептивных полей нейронов выполнялись автоматически на базе встроенной в PC системной платы TMS320C30 (тактовая частота 200 кГц, разрешение по амплитуде 16 бит) с использованием специализированных программ (TMS97), разработанных Dr. Schulze-Krüger (Германия). Тональные сигналы длительностью 100 мс, включая время нарастания и спада по 5 мс, предъявляли однократно с интервалом 900 мс в случайном порядке комбинаций 45 фиксированных частот и 15 интенсивностей (т.е. 675 различных сигналов).

Измерения производили во всем частотном диапазоне слуха мыши (3 - 80 кГц) при интенсивностях сигнала от пороговых до 105 дБ над порогом ответа нейрона (что соответствует диапазону от -20 до 85 дБ над 20 мкПа). Изучены характеристики активности 41 нейрона ЦЯ и 96 нейронов СК, частотные возбуждающие рецептивные поля которых имели V-образную форму.

Результаты: В ЦЯ доля нейронов с V-образными рецептивными полями составляла 30%. При действии тона характеристической частоты (ХЧ) у этих нейронов преобладали фазные свойства ответа (82% нейронов): фазный разряд, образованный 1-3-мя спайками в начале действия тона, или пачечный разряд (рис., а, б). Количество спайков в пачках составляло у разных нейронов 4-10 импульсов, и разряд заканчивался ранее окончания тонального сигнала. В ответ на сигналы, охватывающие все возбуждающее рецептивное поле нейрона, значительная часть нейронов (41%, 16 единиц) не изменяли типа разряда. Среди них 61% нейронов имел фазные ответы, 31% – пачечные. 24 V-образных нейрона (59%) изменяли тип разряда в зависимости от частоты и интенсивности сигнала. Чаще всего фазный ответ заменялся пачечным и, наоборот, пачечный – фазным. Такие изменения были отмечены у пятой части всех исследованных V-образных нейронов (21%, 8 единиц). Таким образом, почти две трети V-образных нейронов сохраняли фазные характеристики ответа при действии любых звуковых стимулов (рис.,а). Почти половина исследованных V-образных нейронов ЦЯ (49%, 19 единиц) демонстрировали постоянство латентных периодов ответов как на сигналы ХЧ, так и на тоны не-характеристических частот (рис.,а). Их латентности практически не изменялись с изменением частоты и интенсивности сигнала, составляя в среднем 11 ± 2 мс. Около четверти исследованных нейронов (28%, 11 нейронов) изменяли латентные периоды ответов в пределах 6 мс (рис.,б). Лишь у 9-ти нейронов (23%) с изменением параметров сигнала латентный период ответа увеличивался на 8 – 38 мс. В ответах нейронов, латентный период которых не изменялся или изменялся в пределах 6 мс, всегда был выражен начальный фазный компонент.

Увеличение латентности ответа нейрона более, чем на 6 мс, всегда сопровождалось утратой фазного компонента в ответе, который при этом становился позднелатентным.

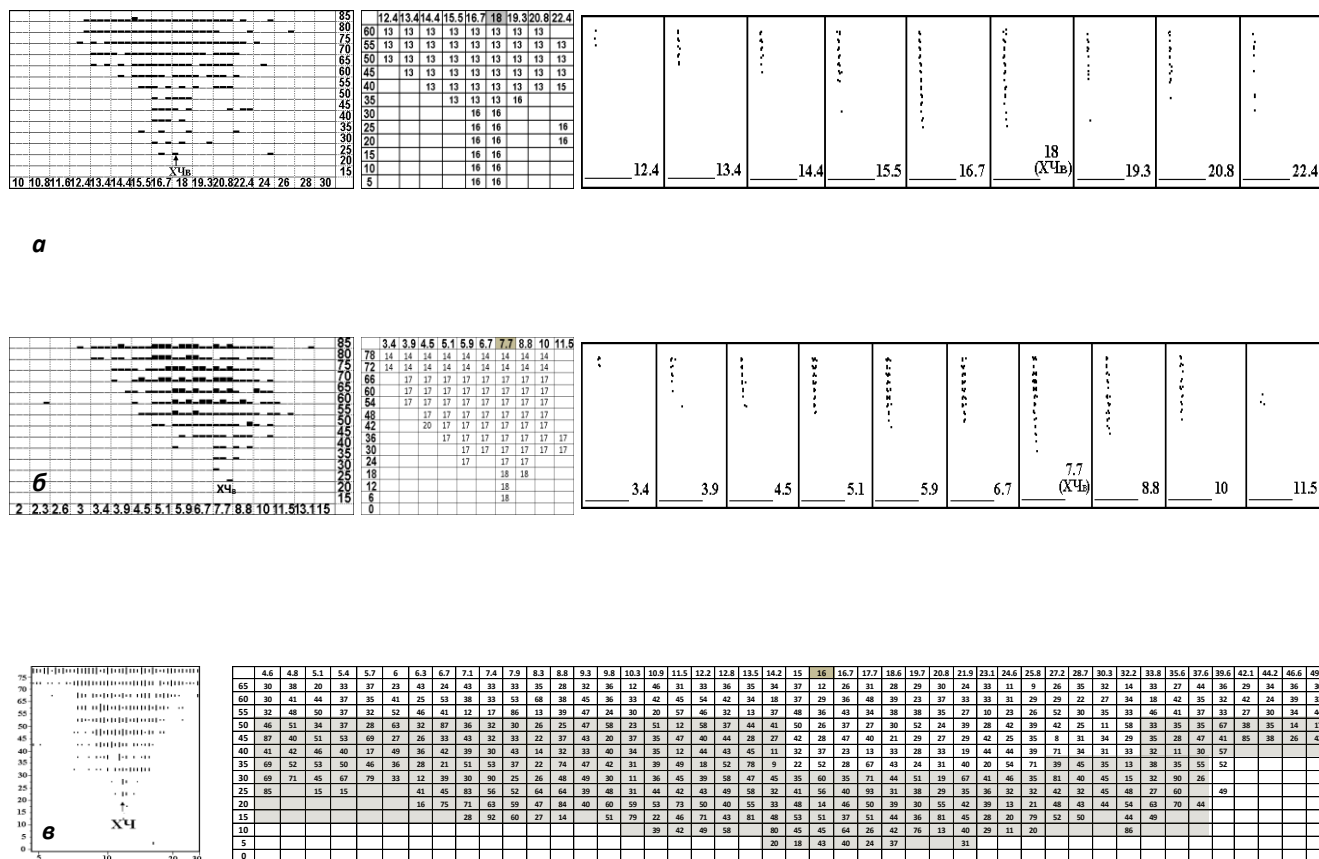


Рис. Временные характеристики активности V-образных нейронов ЦЯ с фазными (а) и пачечными (б) разрядами, а также типичного V-образного нейрона СК (в). Слева – частотные возбуждающие рецептивные поля нейронов; абсцисса: частота, кГц, ордината: уровень сигнала, дБ УЗД. Высота столбиков/вертикальных линий на диаграммах пропорциональна числу спайков в ответе нейрона на сигнал данной частоты и интенсивности. На цифровых диаграммах показано распределение латентных периодов ответов нейрона на соответствующие сигналы, охватывающие все возбуждающее рецептивное поле. Абсцисса: частота сигнала, кГц, ордината: уровень сигнала, дБ над порогом ответа нейрона. Серым на шкале частот выделена возбуждающая ХЧ

нейрона (ХЧ_В). На цифровой диаграмме серым выделен периферический пояс ответов с латентностями, превышающими 40 мс. Для нейронов ЦЯ приведены растровые диаграммы ответов (справа на *а,б*). Каждая точка – один спайк в ответе нейрона на сигнал соответствующей частоты и интенсивности. Для каждой частоты сигнала (указана цифрами) приведена отдельная диаграмма в координатах время (абсцисса), уровень сигнала (ордината), возрастает снизу вверх. Горизонтальная линия под каждой диаграммой – отметка стимула.

В СК доля нейронов с V-образными рецептивными полями составляла 69%. Все V-образные нейроны СК имели фазные характеристики активности при действии любых звуков, вызывавших ответ данного нейрона. Преобладающим типом разряда у этих нейронов был фазный (72%, 78 нейронов). Разряды остальных нейронов были пачечными.

Анализ латентных периодов ответов V-образных нейронов СК выявил их высокую вариабельность во всей области возбудительного рецептивного поля. У всех нейронов латентные периоды ответов изменялись более, чем на 2 мс в зависимости от характеристик стимула. Лишь у четырех нейронов изменения латентностей не превышало 6 мс. У остальных нейронов латентные периоды ответов изменялись более, чем на 6 мс. В рецептивных полях 40 нейронов (42% V-образных нейронов, рис., в) можно было выделить центральную и периферическую области. В центральной области латентные периоды ответов не превышали 40 мс, а диапазон их изменения был не более 15–20 мс. На периферии латентности превышали 40 мс, а диапазон их изменения составлял 20–70 мс. В рецептивных полях 34 нейронов (35%) имелись периферические области позднелатентного ответа (с латентностью 40-45 мс и более), но они не образовывали единого периферического позднелатентного пояса ответов. 7 нейронов почти на все сигналы отвечали с латентным периодом, превышающим 40 мс. У 11 нейронов латентности варьировали в диапазоне 15-70 мс во всем рецептивном поле, что не позволяло выделить центр и периферию.

Заключение: Результаты настоящей работы позволяют предположить, что специализация V-образных нейронов изменяется по мере перехода от более древних в эволюционном аспекте структур ствола мозга к более молодой слуховой области неокортекса. На уровне ствола мозга V-образные нейроны обладают наиболее стабильными среди всех групп нейронов латентными периодами ответов, что очевидно подразумевает их участие в точном временном кодировании начала звукового сигнала. Для клеток-октопусов вентрального кохлеарного ядра и близких к ним по характеристикам активности V-образных нейронов ЦЯ это можно считать подтвержденным фактом [5-7]. В СК, где V-образные нейроны составляют абсолютное большинство нейрональной популяции, они демонстрируют высокую стабильность паттернов и почти такую же высокую вариабельность латентных периодов ответов. По-видимому, в СК возрастает вклад временного кодирования акустических сигналов. Об этом свидетельствует увеличение доли V-образных нейронов и появление в их рецептивных полях центральной и периферической областей с разной динамикой латентных периодов ответов. Таким образом, вклад V-образных нейронов СК во временную обработку звука увеличивается в восходящем слуховом пути.

Работа выполнена при поддержке федерального бюджета по госзаданию на 2019-2021 годы (№ регистрации темы АААА-А18-118013090245-6).

Литература

1. Egorova M., Ehret G., Vartanian I., Esser K.-H. Frequency response areas of neurons in the mouse inferior colliculus. I. Threshold and tuning characteristics // Exp. Brain Research. 2001. V.140. P. 145-161.
2. Linden J.F., Liu R.C., Sahani M., Schreiner C.E. Spectrotemporal Structure of Receptive Fields in Areas AI and AAF of Mouse Auditory Cortex // J. Neurophysiol. 2003. V. 90. P. 2660 – 2675.
3. Егорова М.А. Частотная настройка нейронов первичного слухового поля (A1) и переднего слухового поля (AAF) слуховой коры мыши (*Mus musculus*) // Журн. Эвол. Биохим. и физиол. 2005. Т.41. № 4. С. 379-382.

4. Хорунжий Г.Д., Егорова М.А. Временные характеристики импульсной активности нейронов с V-образными частотными рецептивными полями в слуховом центре среднего мозга домовой мыши (*Mus musculus*) // Журн. Эвол. Биохим. и физиол. 2014. Т. 50. №4. С. 314–318.

5. Egorova M.A., Akimov A.G., Khorunzhii G.D., Ehret G. Frequency response areas of neurons in the mouse inferior colliculus. III. Time-domain responses: Constancy, dynamics, and precision in relation to spectral resolution, and perception in the time domain // *PlosOne*. 2020. V. 140. P. 145-161.

6. Rhode W. S., Oertel D., Smith P. H. Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat ventral cochlear nucleus // *J. Comp. Neurol.* 1983. V. 213(4). P. 448-463.

7. Golding N.L., Robertson D., Oertel D. Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision // *J. Neurosci.* 1995. V. 15(4). P. 3138-3153.

SOUND PROCESSING IN V-SHAPED NEURONS OF HOUSE MOUSE AUDITORY BRAINSTEM AND CORTEX

G.D. Khorunzhii and M.A. Egorova

*I.M. Sechenov Institute of evolutionary physiology and biochemistry of Russian
academy of sciences, St. Petersburg, Russia*

Abstract: Spectro-temporal properties of the V-shaped neurons in the auditory brainstem and primary auditory cortex are studied. The obtained data revealed a strong difference between the brainstem and cortical levels of the auditory system both in the ratio and in the temporal properties of V-shaped neurons activity, providing a suggestion about the different role of these neurons for sound processing in the auditory brainstem and cortex.

Key words: hearing, inferior colliculi, primary auditory cortex, single neurons, frequency receptive fields, temporal sound analysis

УДК: 612; 612,65; 612,66; 612,88

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ НЕЙРОНОВ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ У КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij НА СТИМУЛЯЦИЮ ЗОНЫ ВИБРИСС.

Цветаева Д.А.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН. Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный Центр Психического Здоровья. Москва, Россия
e-mail: dariatsvetaeva8954@gmail.com

Аннотация: Дефицит первичного торможения и нарушение баланса между первичным и вторичным торможениями у крыс WAG/Rij может быть основанием развития у этих животных комбинированной патологии: АЭ и депрессии. У крыс WAG/Rij многокомпонентная высокочастотная фазная реакция является нейронным эквивалентом пик-волновой активности.

Ключевые слова: нейрон, соматосенсорная кора, вибриссы, абсанс-эпилепсия (АЭ)

Введение

Крысы линии WAG/Rij генетически предрасположены к абсанс-эпилепсии (АЭ) [1] и демонстрируют депрессивно подобное поведение [2]. ЭЭГ проявлением эпилептического приступа является генерализованная пик-волновая активность (spike-wave discharges), которая формируется у этих животных в 5–6 месячном возрасте [3]. Эпилептический приступ продолжается в течение нескольких секунд, а частота пик-волновых разрядов у крыс WAG/Rij уменьшается от начала приступа до его окончания с 15 до 6-7 Гц [4].

Особая роль в возникновении эпилептического приступа отводится соматосенсорной системе. Предполагается, что триггерной зоной генерации пик – волновой активности является соматосенсорная кора [5], а ограничение видоспецифической афферентации за счет выстригания вибрисс в течение первых трех недель жизни крысенка, провоцирует более раннее развитие АЭ [6].

Задачей настоящего исследования было выявление специфики реакций одиночных нейронов соматосенсорной зоны коры на стимуляцию области

вибрисс у крыс WAG/Rij 2-3-х месячного возраста, когда АЭ ещё не сформирована и 6-7-ми месячного возраста, когда АЭ хорошо выражена.

Методы исследования

Использовали самцов крыс линии Wistar (контрольные животные) и линии WAG/Rij (собственное разведение). Все эксперименты выполняли в соответствии с протоколом использования лабораторных животных ИВНД и НФ РАН, основанного на директиве Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС). В остром опыте под уретановым наркозом (0,15 г на 100 г массы тела животного) с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 М раствором NaCl (диаметр кончика ≤ 1 мкм) регистрировали внеклеточную активность одиночных нейронов. Регистрирующий электрод ориентировали по координатам AP +2,5; L 5,5 и погружали вертикально. В этом случае он входил в соматосенсорную кору тангенциально под углом 45^0 . Ориентируясь на морфометрические исследования [7], было рассчитано, что IV слой коры в этом случае занимает пространство на глубине от 550 до 1400 мкм. Регистрацию активности нейронов осуществляли в этом диапазоне.

Стимулирующие игольчатые электроды (межэлектродное расстояние 4 мм) вводили кожу вдоль ряда С вибрисс. Стимуляцию осуществляли одиночным прямоугольным импульсом тока силой 0,5 мкА, длительностью 0,2 мс, что, как правило, в 2 раза превышало силу раздражения, вызывающую минимальное подергивание вибрисс.

Импульсную активность нейрона регистрировали в течение 4 секунд – 2 с до и 2 с после стимула. Для анализа реакций по результатам 10 раздражений строили перистимульные гистограммы с разрешением бина от 1 до 16 мс. На основе сравнения средней частоты потенциалов действия в фоне и после раздражения программа выделяла предполагаемые зоны реакции (возбуждение/торможение) по критерию 30% увеличения или уменьшения средней частоты разрядов. После установления значимого отличия частоты

потенциалов действия в предполагаемой зоне реакции по сравнению с фоном (использовали непараметрический критерий Вилкоксона) вычисляли латентный период (время от момента нанесения раздражения до начала зоны реакции), продолжительность реакции и частоту потенциалов действия в зоне реакции. Статистическую значимость межгрупповых различий определяли с использованием параметрического t-теста (все анализируемые показатели имели нормальное распределение - тест Шапиро–Уилка) и теста двух пропорций (two-sided).

Результаты

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 2-3-х месячных крыс линии Wistar.

В экспериментах на 6 крысах линии Wistar зарегистрированы 48 нейронов. Из них 37 нейронов реагировали на одиночную электрическую стимуляцию области вибрисс. По критериям латентного периода и длительности реакции выделено 4 компонента ответа на стимуляцию области вибрисс: первичное возбуждение, первичное торможение, вторичное возбуждение и вторичное торможение. Первичное возбуждение возникало с латентным периодом 27.8 ± 8.3 мс и продолжалось 51.5 ± 44 мс. Вторичное возбуждение возникало с латентным периодом 209.3 ± 67.5 мс было тоническим (продолжительность 313 ± 224.7 мс). По латентному периоду и продолжительности первичное и вторичное возбуждения значимо отличались ($t(13.1)-45$. $P < 0,001$; $t(5.6)-45$. $P < 0,001$ соответственно). Первичное торможение возникало с латентным периодом 70.6 ± 23.4 мс, а латентный период вторичного торможения составлял 697.5 ± 146 мс. Отличия были значимы ($t(15.3)-26$. $P < 0,001$).

Встречаемость отдельных компонентов реакции была различной.

Первичное возбуждение выявлено у половины всех зарегистрированных нейронов, первичное торможение обнаружено у 25% клеток. Вторичное

возбуждение выявили у 48%, а вторичное торможение у 30% нейронов соматосенсорной коры (Рис 1 А).

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 2-3-х месячных крыс линии WAG/Rij

У 8 крыс WAG/Rij зарегистрировали 58 нейронов соматосенсорной коры. Из них 49 нейронов реагировали на одиночную электрическую стимуляцию области вибрисс. Компонентный состав реакций не отличался от обнаруженного у крыс Wistar. Временные параметры ответов в основном не различались. Существенные отличия были обнаружены по критерию встречаемости тормозных компонентов ответа. Число нейронов, реагирующих первичной тормозной реакцией, у крыс линии WAG/Rij было значимо меньше ($p=0.04$ по тесту двух пропорций - two-sided). В отличие от первичного торможения, вторичное торможение у крыс линии WAG/Rij зарегистрировано у большего числа нейронов соматосенсорной коры (59% у WAG/Rij, 30% у Wistar). Различие значимо – $p=0.03$ по тесту двух пропорций (two-sided). (Рис 1 А)

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 6-7-и месячных крыс линии Wistar.

У 6-ти крыс линии Wistar зарегистрирована активность 52-х нейронов, из которых 49 реагировали на одиночную электрическую стимуляцию области вибрисс. Как правило, реакция была схожей с выявленной у крыс линии Wistar более раннего возраста и состояла из коротколатентного возбуждения 24.7 ± 2.9 мс), коротколатентного торможения ($68/6 \pm 27.6$ мс), длиннолатентного тонического возбуждения (252.2 ± 67.5 мс) и длиннолатентного торможения (623.2 ± 109.6 мс).

Реакция нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс у 6-7-и месячных крыс линии WAG/Rij.

У 6 крыс линии WAG/Rij в возрасте, когда АЭ уже хорошо выражена, исследована реакция 51 нейрона соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс. 46 нейронов реагировали на афферентную стимуляцию. Компонентный состав реакций был таким же, как и у крыс Wistar. Наибольшее отличие реакции у крыс линии WAG/Rij заключается в изменении структуры вторичного возбуждения. У 33% нервных клеток оно представлено многокомпонентной фазной реакцией (рис 1 Б), в виде серии из 6–8 коротких по продолжительности (56.0 ± 20.7 мс) высокочастотных разрядов нейрона и тормозных пауз.

Длительность периодов между фазными разрядами колеблется в пределах от 56 до 240 мс, что соответствует частоте от 17 Гц до 4 Гц, и находится в диапазоне частот пик-волновой активности у крыс линии WAG/Rij [4]. Это свидетельствует в пользу того, что данную фазную реакцию можно рассматривать в качестве нейронного эквивалента пик-волновой активности – основного признака АЭ. Еще одним аргументом в пользу этого предположения может служить сходство фазной активности, зарегистрированной нами, с активностью таламических и корковых нейронов у крыс линии GAERS во время эпилептического приступа [8].

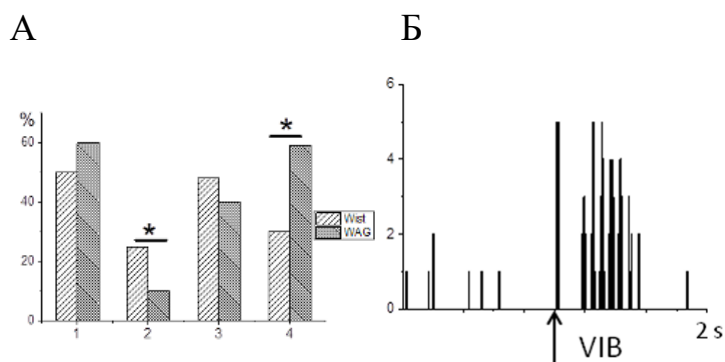


Рис. 1 Реакции нейронов соматосенсорной коры на стимуляцию области вибрисс.

А) соотношение активационных и тормозных компонентов ответа на стимуляцию области вибрисс у крыс Wistar и WAG/Rij. (1) – первичное возбуждение, (2) – первичное торможение, (3) – вторичное возбуждение, (4) – вторичное торможение.

* $p < 0,05$ по критерию двух пропорций (two-sided).

Б) фазная реакция нейрона у крысы линии WAG/Rij. Суммарная перистимульная гистограмма (10 предъявлений). Эпоха анализа – 2 с; 1 бин – 8 мс. По оси ординат количество спайков в бине. Стрелка – момент нанесения раздражения.

Выводы

- Первичное торможение у 2-3-х месячных крыс линии WAG/Rij, когда пик-волновая активность ещё не сформирована, выявлено у меньшего числа нейронов, чем у крыс линии Wistar. Вторичное торможение проявляется в большей степени у крыс линии WAG/Rij по сравнению с крысами линии Wistar. Дефицит первичного торможения, как и нарушение баланса между первичным и вторичным торможениями у 2-3-х месячных крыс WAG/Rij, может быть одним из оснований развития у этих животных комбинированной патологии: АЭ и депрессии.

- Вторичное возбуждение на стимуляцию вибрисс у 33% нейронов 6-7-и месячных крыс линии WAG/Rij представлено фазной реакцией, которая по основным показателям соответствует пик-волновому разряду, что позволяет считать ее нейронным эквивалентом эпилептической активности. Тот факт, что фазную реакцию можно вызвать одиночным электрическим стимулом из области вибрисс указывает на то, что афферентное возбуждение от вибрисс способно инициировать приступ АЭ у крыс линии WAG/Rij.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-013-00176.

Литература

1. White H, Löscher W (2014) Searching for the ideal antiepileptogenic agent in experimental models: single treatment versus combinatorial treatment strategies. *Neurotherapeutics* 11:373–384. <https://doi.org/doi: 10.1007/s13311-013-0250-2>.
2. Sarkisova K, van Luijckelaar G (2011). The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35:854–876. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.pnpbp. 2010.11.010>.
3. Coenen A, van Luijckelaar G (2003) Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behavior Genetics* 33:635-655. <https://doi.org/doi: 10.1023/a:1026179013847>.
4. Bosnyakova D, Gabova A, Zharikovae A, Gnezditski V, Kuznetsova G, van Luijckelaar G (2007) Some peculiarities of time-frequency dynamics of spike-wave discharges in humans and rats. *Clinical Neurophysiology* 118:1736-43. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2007.04.013>.
5. Sitnikova E, van Luijckelaar G (2004) Cortical control of generalized absence seizures: effect of lidocaine applied to the somatosensory cortex in WAG/Rij rats. *Brain Research* 1012:127-137. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.brainres.2004.03.041>.
6. Sitnikova E (2011) Neonatal sensory deprivation promotes development of absence seizures in adult rats with genetic predisposition to epilepsy. *Brain Research* 1377:109–118. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.067>.
7. Shubina O, Teltsov L, Komusova O (2015) Cytological and morphometric features of the cortex of white rats. *Modern problems of science and education*. Issue № 2 (part 1).
8. Pinault D, O'Brien T (2005) Cellular and network mechanisms of genetically-determined absence seizures. *Thalamus and Related Systems* 3:181–203. <https://doi.org/doi: 10.1017/S1472928807000209>. Epub 2007 Jan 22.

Работа принята к печати в Российский физиологический журнал им. И.М.

Сеченова 2021, том 107, № 10, с. 1–10

CHARACTERISTICS OF NEURONAL RESPONSES OF THE SOMATOSENSORY CORTEX IN WAG/Rij RATS TO VIBRISSA STIMULATION AREA

Tsvetaeva D.A.^{1,2}

¹ *Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Higher Nervous Activity
and Neurophysiology RAS. Moscow, Russia*

² *Federal State Budgetary Scientific Institution Mental Health Research Centre.*

Moscow, Russia

e-mail: dariatsvetaeva8954@gmail.com

Abstract: A deficit in primary inhibition and an imbalance between primary and secondary inhibition in WAG/Rij rats may underlie the development of a combined pathology in these animals: AE and depression. A multicomponent high-frequency phase response in WAG/Rij rats is the neural equivalent of spike-wave discharges.

Key words: neuron, somatosensory cortex, vibrissae, absence epilepsy

УДК 612.821

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЫБРОСА ГАМК В СИНАПСЕ ОБРАЗОВАННЫМ
ХОЛЕЦИСТОКИНИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ ИНТЕРНЕЙРОНОМ НА
ПИРАМИДНОМ НЕЙРОНЕ В ГИППОКАМПЕ

Шайдунов В.А.¹, Вазетдинова А.А.²,

¹*ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия.*

² *ФГАОУ ВО "Казанский федеральный университет", Казань, Россия,*

E-mail: shajdurovvladimir@gmail.com

Аннотация: Отличительной особенностью выброса ГАМК в гиппокампальном синапсе, образованном холецистокинин-положительным нейроном на пирамидном нейроне, является наличие ярко выраженного асинхронного выброса (АВ) нейромедиатора. Целью работы является построение биофизической модели выброса нейромедиатора в данном синапсе на основе динамики кальция в терминали. Калибровка свободных параметров модели

проводилась на данных синаптического выброса, полученных в различных экспериментальных условиях: в присутствии кальциевого буфера ЭГТА в пресинаптической терминали, блокировке потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов ω -конотоксином, и разных концентрациях внеклеточного кальция. Анализ полученной модели свидетельствует о том, что важную роль в выраженности асинхронного выброса может играть сниженная активность кальциевого насоса плазматической мембраны (PMCA).

Ключевые слова: везикулярный выброс; динамика кальция в терминали;

Асинхронный выброс (АВ) нейромедиатора является специфическим свойством, как для некоторых синапсов в ЦНС, так и нервно-мышечных соединений. В ЦНС асинхронный выброс после пачки, включающей в себя более пяти потенциалов действия, наиболее ярко выражен в синапсе, образованном холецистокинин-положительными тормозными интернейронами на пирамидных нейронах в гиппокампе. Традиционно считается, что выраженность асинхронного выброса существенно определяется динамикой концентрации Ca^{2+} в пресинаптической терминали. Более того, как это было показано в [1] пространственное расположение сайтов выброса медиатора может оказывать большое влияние на соотношение между интенсивностью синхронного и асинхронного выброса медиатора. Таким образом, необходима модель, которая учитывала бы не только различные механизмы регуляции уровня Ca^{2+} в терминали, но и пространственную динамику уровня кальция. Однако до сих пор нет биофизической модели выброса нейромедиатора, описывающей, как синхронную компоненту выброса, так и ярко выраженную асинхронную компоненту, которая бы согласовывалась с известными экспериментальными данными, описывающими функционирование этого синапса в различных условиях.

Работа направлена на получение модели выброса ГАМК в синапсе, образованном холецистокинин-положительным нейроном на пирамидном нейроне в гиппокампе.

Методика: Частота синаптического выброса рассчитывалась согласно кинетической модели [2], исходя из динамики кальция на нескольких ($N=2-3$) расстояниях от потенциал-зависимых кальциевых каналов. Пространственно-временное распределение кальция рассчитывалось, исходя из уравнений реакции диффузии в системе с несколькими простыми и кооперативными буферами кальция. Подбор свободных параметров кинетической модели везикулярного выброса (максимальное количество везикул, скорость восполнения везикулярного пула, расстояние до потенциал-зависимых кальциевых каналов) проводился с помощью ABC-SWARM алгоритма [3]. Подбор оставшихся свободных параметров проводился частично с помощью подбора и использованием генетического алгоритмов.

Результаты: Моделирование кальция внутри терминали и расчет частоты синаптического выброса медиатора с использованием классической кинетической модели [2], качественно согласуется с различными экспериментальными данными:

- 1) Добавлении кальциевого буфера EGTA 1-2мМ в пресинаптической терминали приводит к сдвигу начала асинхронного релиза на 10-20 потенциалов действия при частоте стимуляции 50Гц,
- 2) Блокировка потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов ω -конотоксином- приводит к исчезновению синхронной компонентны везикулярного выброса, а также более медленному нарастанию асинхронной
- 3) Снижение частоты стимуляции с 50 до 10 гц, приводит к полному исчезновению асинхронного выброса.

Однако в условиях, когда искусственно увеличивается внеклеточная концентрация Ca^{2+} , мы обнаружили некоторые расхождения между

экспериментальными результатами и результатами моделирования. Согласно экспериментальным данным, увеличение внеклеточной концентрации кальция приводило к усилению фазического выброса в начале пачки и усилению депрессии. Оба этих феномена также наблюдались при моделировании. Однако в модели наблюдается существенное увеличение длительности асинхронной компоненты после окончания пачки потенциалов действия. Подобное увеличение длительности асинхронной компоненты не наблюдалось в экспериментах, где происходило увеличение внеклеточной концентрации кальция. По всей видимости, увеличение продолжительности асинхронного выброса, обнаруженное в модели при увеличении экстраклеточного кальция с 2 до 4 мМ, и отсутствие такого эффекта в эксперименте связано с недостаточно точным моделированием диффузии кальция за пределы аксонального бутона. Введение в систему кальциевого насоса плазматической мембраны (PMCA) с плотностью близкой к физиологической приводит к существенному подавлению асинхронной компоненты, что свидетельствует о том, что важную роль в выраженности асинхронного выброса может играть дефицит активности этого насоса.

Заключение: Полученная модель демонстрирует, что описание везикулярного релиза в рамках кинетической модели везикулярного выброса [2] и кальциевой динамики с дефицитом PMCA, согласуется с известными экспериментальными данными.

Литература

1. Asynchronous glutamate exocytosis is enhanced in low release probability synapses and is widely dispersed across the active zone Philipe R. F. Mendonça, Erica Tagliatti, Helen Langley, Dimitrios Kotzadimitriou, Criseida G. Zamora-Chimal, Yulia Timofeeva, Kirill E. Volynski bioRxiv 2021.05.04.441792; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.04.441792>

2. Allosteric modulation of the presynaptic Ca^{2+} sensor for vesicle fusion. Lou, X., Scheuss, V. & Schneggenburger, R. *Nature* **435**, 497–501 (2005). <https://doi.org/10.1038/nature03568>
3. A hybrid algorithm based on particle swarm and artificial bee colony for high-dimensional optimization problems, Zhiyong Li, Weiyong Wang, Yanyan Yan, Zheng Li, PS–ABC: Expert Systems with Applications, Volume 42, Issue 22, 2015, ISSN 0957-4174, <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2015.07.043>

A MODEL OF VESICULAR RELEASE IN THE HIPPOCAMPAL SYNAPSE BETWEEN CCK-POSITIVE INTERNEURON AND PYRAMIDAL CELL

Shaydurov V.A.¹, Vazetdiona A.A.²

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow, Russia*

² *Kazan Federal University, Kazan, Russia*

Abstract: Distinctive feature of a synapse formed by hippocampal CCK-positive interneuron on the CA1 pyramidal neuron is the prominence of GABA asynchronous release. Here, we created a biophysically detailed model of neurotransmitter release in this synapse that is based on calcium dynamics in a terminal. Free parameters of the model were fitted based on several experimental results, including the presence of EGTA in the terminal, the presence of voltage-gated Ca^{2+} channel antagonist ω -conotoxin, and varying external calcium concentration. Obtained results suggest that reduced PMCA activity could be critical for the increasing asynchronous release rate.

Key words: vesicular release; calcium dynamics in the terminal

УДК 591.513.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТТЕРНОВ АКТИВНОСТИ МОЗГА ПРИ
ФОРМИРОВАНИИ СЛАБОЙ ПАМЯТИ И ЕЁ УСИЛЕНИИ В ЗАДАЧЕ
УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОГО ЗАМИРАНИЯ У МЫШЕЙ

Юрин А.М.¹, Ивашкина О.И.^{1,2}, Торопова К.А.^{1,2}, Анохин К.В.^{1,3}

¹ *Институт перспективных исследований мозга МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия.*

² *НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.*

³ *ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия.*

E-mail: yurin988@yandex.ru

Аннотация: Исследование механизмов влияния прошлого опыта на текущее поведение и обучение является одной из важнейших задач современной нейробиологии. Работа направлена на изучение эффекта повторной сессии слабого обучения на последующее воспроизведение памяти в парадигме условно-рефлекторного замирания, а также на изучение активности мозга при формировании слабой памяти и ее усилении повторным слабым обучением.

Ключевые слова: слабое обучение; усиление слабой памяти; условно-рефлекторное замирание; c-fos

Известно, что полученный в прошлом когнитивный опыт способен усиливать формирование новой памяти как у человека, так и у животных [1, 2, 3, 4]. Однако не ясно, как именно формирующаяся заново память зависит от прошлой истории индивидуального опыта. Для понимания того, какое именно влияние такой опыт оказывает на формирование новой памяти, требуются исследования, изучающие этот вопрос как на поведенческом уровне, так и на уровне анализа активности нейронов.

В связи с этим, целью работы было исследовать паттерны активности мозга при формировании и извлечении слабой памяти и памяти, усиленной повторным слабым обучением.

Методика: В исследовании использовали задачу условно-рефлекторного замирания на звук. При этом, в работе применяли слабую версию обучения, в которой животным предъявлялась последовательность условного звукового стимула (5 с, 9000 Гц, 80 дБ) и безусловного стимула — слабого электрокожного раздражения (ЭКР; 2 с, 0.75 мА). В разных группах животных количество таких сессий слабого обучения различалось: в группах «1 обучение» и «2 обучения» таких сочетаний было предъявлено соответственно одно или два. Группа «Активный контроль» не получала в ходе обучения ЭКР. У групп «2 обучения» и «Активный контроль» предъявления стимулов происходили с промежутком в три дня; животных группы «1 обучение» делили на две подгруппы и помещали в экспериментальную камеру без предъявления звукового стимула и ЭКР либо за три дня до, либо через три дня после предъявления сочетания звука и ЭКР. Поскольку данные подгруппы не отличались по поведению, для дальнейшего анализа их объединили. У половины животных каждой группы через 90 мин после второго обучения брали образцы мозга для дальнейшего иммуногистохимического анализа, второй половине животных через 3 дня после второго обучения проводили тестирование ассоциативной памяти о звуке. Для этого мышей помещали в новую незнакомую обстановку, которую они могли исследовать в течение 3 минут, после чего в течение 3 мин подавали звуковой сигнал, идентичный использованному во время обучения. Через 90 мин после тестирования памяти брали образцы мозга мышей. Кроме того, были взяты образцы мозга мышей группы пассивного контроля, находившихся во время эксперимента в домашних клетках и не подвергавшихся до этого поведенческим воздействиям.

Далее изготавливали тонкие срезы мозга и проводили иммуногистохимическое выявление белка c-Fos. Затем проводили съемку окрашенных срезов под микроскопом и анализировали плотность Fos-положительных клеток в гиппокампе, миндалине, первичной слуховой коре и ряде ассоциативных областей коры.

Результаты:

Было показано, что использованная в работе слабая версия УРЗ на звук не приводит к формированию выраженной долговременной ассоциативной памяти. Тем не менее при тестировании уровень замирания на звук у группы «1 обучение» был значимо выше, чем у группы «Активный контроль». При этом было показано, что повторное слабое обучение приводит к усилению слабой памяти, что выражалось в значимо более высоком уровне замирания у группы «2 обучения» по сравнению с двумя другими группами при тестировании на звук..

Анализ паттернов активации мозга при формирования слабой памяти и её усилении выявил значимо большую плотность Fos-положительных нейронов в таких структурах, как миндалина, прелимбическая кора, гиппокамп, ретроспленальная и фронтальная ассоциативная зоны коры у животных группы «2 обучения» по сравнению с остальными группами животных. При этом, однократное слабое обучение также приводило к значимому повышению уровня экспрессии c-fos по сравнению с группами «Активный контроль» и «Пассивный контроль», однако такое повышение было обнаружено только в одной из исследованных структур мозга — прелимбической коре.

При анализе паттернов активации мозга при извлечении слабой или усиленной памяти нами было показано увеличение плотности Fos-положительных клеток у животных группы «2 обучения» по сравнению с группой «Пассивный контроль» только в одной из исследованных структур мозга — прелимбической коре. Для остальных же структур значимых различий плотности c-Fos

положительных клеток при извлечении слабой и усиленной памяти нами выявлено не было.

Заключение: Таким образом, в работе было показано, что повторное слабое обучение в задаче условно-рефлекторного замирания на звук приводит к формированию долговременной аверсивной памяти. Это сопровождается массивной активацией ряда структур мозга, в том числе входящих в «систему страха». Извлечение такой усиленной памяти сопровождается гораздо более слабой активацией областей мозга, среди которых можно выделить прелимбическую кору. Эти данные, наряду с результатами, описанными в литературе, свидетельствуют в пользу того, что феномен усиления памяти и «поведенческих меток», судя по всему, не является зависимым от конкретной области мозга. Напротив, наши данные свидетельствуют в пользу идеи о том, что слабое обучение оставляет след в тех нейронах тех областей мозга, которые впоследствии войдут в энграмму формирующейся долговременной памяти.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект», а также при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант №075-15-2020-801) и гранта РФФИ №20-15-00283.

Литература

1. Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: plasticity of synaptic plasticity // *Trends Neurosci.* — 1996 — Vol. 19 — № 4 — PP. 126–130. doi: 10.1016/s0166-2236(96)80018-x.
2. Frankland PW, Josselyn SA, Anagnostaras SG, Kogan JH, Takahashi E, Silva AJ. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning // *Hippocampus* — 2004 — Vol. 14 — № 5 — PP. 557–569. doi: 10.1002/hipo.10208.
3. Rudy JW, Wright-Hardesty K. The temporal dynamics of retention of a context memory: Something is missing // *Learn. Memory* — 2005 — Vol. 12 — № 2 — PP. 172–177. doi: 10.1101/lm.84005.

4. Parsons RG, Davis M. A metaplasticity-like mechanism supports the selection of fear memories: Role of protein kinase A in the amygdala // J. Neurosci. — 2012 — Vol. 32 — № 23 — PP. 7843–7851. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0939-12.2012.

WEAK MEMORY FORMATION AND ENHANCEMENT: A STUDY OF BRAIN ACTIVITY PATTERNS IN FEAR CONDITIONING IN MICE

Yurin A. M.¹, Ivashkina O. I.^{1,2}, Toropova K. A.^{1,2}, Anokhin K. V.^{1,3}

*¹Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Institute of Prospective
Brain Studies, Moscow, Russia*

²National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

*³Federal State Budget Scientific Institution Research Institute of Normal Physiology
named after P.K. Anokhin*

Abstract: One of the most important tasks of modern neurobiology is to understand how past experiences shape current behavior and learning. The goal of this research is to study effects of a repeated session of weak training on animal behavior as well as on brain activity in fear conditioning task.

Key words: weak training; weak memory enhancement; fear conditioning; c-fos