

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**СОВРЕМЕННАЯ НЕЙРОБИОЛОГИЯ:  
ДОСТИЖЕНИЯ, ЗАКОНОМЕРНОСТИ,  
ПРОБЛЕМЫ, ИННОВАЦИИ,  
ТЕХНОЛОГИИ**

*Материалы Всероссийской конференции  
(г. Уфа, 22-23 октября 2015 г.)*

**УФА  
РИЦ БашГУ  
2015**

УДК 581.4.591.4.576.31.581.1

ББК 28.06.28.073

С56

***Редакционная коллегия:***

д-р биол. наук, профессор **З.Р. Хисматуллина** (*отв. ред.*);

д-р биол. наук, профессор **Л.Б. Калимуллина**;

канд. биол. наук, доцент **Л.А. Шарафутдинова**;

канд. биол. наук, доцент **А.М. Федорова** (*отв. секретарь*);

ассистент **И.И. Садргдинова**

**Современная нейробиология: достижения, закономерности, проблемы, инновации, технологии:** материалы Всероссийской конференции (г. Уфа, 22-23 октября 2015 г.) / отв. ред. З.Р. Хисматуллина. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2015. – с. ISBN 978-5-7477-3930-7

Сборника содержит научные статьи, посвященные актуальным вопросам анатомии и физиологии нервной системы, психологии и высшей нервной деятельности в норме и при патологии, освещены материалы по генетике нейрогенетике. Представлены результаты оригинальных исследований.

Предназначено для широкого круга читателей, интересующихся проблемами морфологии и физиологии нервной системы.

УДК 581.4.591.4.576.31.581.1

ББК 28.06.28.073

ISBN 978-5-7477-3930-7

© БашГУ, 2015

## НАУЧНОЕ НАСЛЕДИЕ ПРОФЕССОРА А.С. ДМИТРИЕВА

**Хисматуллина З.Р., Мочалов С.М.**

Башкирский государственный университет, Уфа, hismatullinazr@mail.ru

Научные изыскания А.С.Дмитриева были посвящены развитию идей И.П.Павлова. В своей первооснове они были посвящены изучению одного из ключевых вопросов в теории условных рефлексов - вопросу о механизме замыкания условной временной связи. В послевоенные годы это было одним из ведущих, намеченных и поставленных И.П.Павловым для разработки перед своими учениками и последователями, основополагающих направлений в физиологии высшей нервной деятельности.

Метод условных рефлексов, позволяющий на основе учета слюноотделения объективно судить о формировании и протекании этих рефлексов, открывал широкие перспективы для выяснения их интимных механизмов деятельности мозга. Перспективным было также сочетание этого метода с электрофизиологическими приемами изучения мозга, и с более широким использованием двигательных реакций животных в условиях свободного поведения. Следуя идейным положениям ближайшего ученика И.П.Павлова - Э.А. Асратяна, олицетворявшего и определявшего приоритеты в разработке условно-рефлекторной теории, большинство ученых, возглавлявших в послевоенные годы крупные лаборатории страны, посвящали свои исследования этой актуальной проблеме. Благодаря их усилиям был собран богатый фактический материал и даны многие концептуальные представления по осуществлению тонких механизмов формирования временной связи. Не без оснований ожидалось, что знание принципов формирования и функционирования единичной временной связи создаст условия для понимания всей сложной системной деятельности мозга и объяснит рабочие схемы поведения. В работах самого Э.А. Асратяна было уделено большое внимание формированию не только прямой, но и обратной условной связи, что уже намечало некоторые пути создания стройной теории по выяснению роли условных рефлексов в организации поведения.

А.С.Дмитриев полагал, что следовые условные рефлексы заслуживают особого внимания и в связи с тем, что их формирование сочетается с анализом животными и человеком временных интервалов (отрезков времени), по истечении которых проявляется сигнальное значение этих рефлексов. Такое сочетание сигнальной сущности условного рефлекса с оценкой времени придавало изучению этих рефлексов большие трудности и в то же время открывало многообещающие перспективы в

раскрытии глубоких механизмов формирования временной связи, возникающей, по И.П.Павлову, «на следах» от действия условного раздражителя.

Поскольку отсчет и оценка времени (временных интервалов) в этих исследованиях выступали на первый план, т.е. являлись необходимым предварительным условием, то такие рефлексy получили название условных рефлексов на время. С одной стороны, их динамика с колебанием интенсивности (носящей, вероятно, в ходе затухания и колебательный характер) составляет суть этих следов, с другой, различные сопутствующие явления, обусловленные работой иных анализаторов в течение акта еды (двигательная активность животного, изменение положения тела в пространстве, изменение деятельности сердечно - сосудистой системы и др..) составляют дополнительные источники будущих следовых процессов, обеспечивающих потенциальную возможность отсчета интервалов времени.

А.С.Дмитриев хорошо видел перспективы, связанные с изучением условных рефлексов на время. Они состояли в том, что появлялась возможность сразу, т.е. одновременно, решать многие вопросы по механизмам осуществления условно-рефлекторного процесса, начиная с изучения тонкого механизма замыкания временной связи, способности формирования ее на следах условного раздражителя и т.д., и кончая сложными механизмами восприятия животным и человеком временных интервалов, что позволило бы, наконец, вплотную подойти и к решению проблемы по оценке времени мозгом человека.

В связи с тем, что методики, используемые А.С.Дмитриевым на животных (пищедобывательные и электрооборонительные), носили по существу инструментальный характер, в результате чего проявлялась активность самого животного, чрезвычайно важным был учет резко выраженных межсигнальных реакций, мало характерных для других условных рефлексов. Динамика проявления этих реакций могла служить, как бы зеркалом, в котором способны получать отражение стадийные процессы формирования временной связи. Одновременно с этим могла получать отражение и динамика внутреннего торможения, всегда сопутствующая процессу формирования временной связи при следовых условных рефлексах.

В итоге, при систематическом экспериментальном изучении условных рефлексов на время создавалась возможность получения многочисленного материала, характеризующего как природу формирования условного рефлекса на время (с выяснением тонких механизмов временной связи), так и характеризующего в широком плане роль фактора времени в деятельности мозга.

Исследования А.С.Дмитриева и ряда сотрудников его кафедры подтвердили предположения И.П.Павлова о том, что условные рефлексы на время формируются на следовых процессах работы анализаторов, и что эти следовые процессы являются основой для отсчета времени. Подкрепляющий фактор, являющийся ведущим в формировании любого условного рефлекса, и в данном случае является также определяющим. Посредством любого закономерного следования его в ходе отсчета времени, животным анализируется и выделяется та степень интенсивности угасающего следа, которая подвергается совпадению с действием подкрепляющего фактора. Сначала, когда этого "выделения" еще нет, проявляется обобщенная, т.е. генерализованная стадия формирования условного рефлекса на время. Постепенно этот процесс идет в сторону упорядоченности с точки зрения приурочивания сигнальной реакции к моменту безусловного подкрепления.

Впечатляет особый творческий подход А.С.Дмитриева в отношении возможности использования математических приемов и способов для оценки разделения указанных стадий на основе анализа межсигнальных реакций. А.С.Дмитриевым был использован, и в дальнейшем усовершенствован метод регрессивного анализа, выявляющий характер изменения межсигнальных реакций в периодах названных стадий. В дальнейшем, совместно с доцентом кафедры Р.Я. Атнагуловым, был создан еще более удобный способ оценки стадий образования условных рефлексов на время. Взаимоотношения между различными слагаемыми, обуславливающими происхождение межсигнальных реакций, были также исследованы различными приемами корреляционного анализа.

Заслуживают особого внимания некоторые важные особенности, выявленные А.С.Дмитриевым, в отношении механизма замыкания временной связи при формировании условных рефлексов на время. Было показано, что на первой стадии выработки рефлексов играет важную роль отрицательная индукция от действия безусловного раздражителя. Сама по себе, очевидно, не имея непосредственного отношения к замыканию временной связи, она, тем не менее, влияет на скорость протекания первой фазы, чем создает благоприятные условия для скорости протекания следующих фаз. Продолжительность начальной стадии образования условного рефлекса на время, зависящая от отрицательной индукции, обуславливается и степенью выраженности последовательного возбуждения (т.е. его иррадиацией).

Изучение сложных форм взаимодействия условных рефлексов на время в лаборатории А.С.Дмитриева проводилось также в исследованиях, посвященных проблеме условно-рефлекторного переключения. До этого применительно к условным рефлексам на время эта проблема вообще не изучалась. Возможность переключения условных рефлексов на время, роль

тонических и физических компонентов, факторов обстановки, участие переключения в программировании поведенческой деятельности - все это являлось предметом изучения сотрудников кафедры (Д.И.Смирнов, А.О.Курмаева). В частности, Д.И.Смирновым было показано, что переключатель, помимо обычных свойственных ему функций (установочной, тонической), может выполнять роль непосредственного "включателя", т.е. запускать соответствующую деятельность.

В исследованиях на голубях, белых крысах, кошках изучались сложные формы условных рефлексов на относительную длительность интервалов времени (известные по И.П.Павлову как рефлексы на отношение), что фактически уже затрагивало изучение способности животных к оценке и даже элементарному обобщению времени (Р.Л.Атнагулов, Р.Я. Бушмакина, Н.Д. Костенко). В одном из очень показательных вариантов опытов переключением выступало время пребывания животных в закрытой камере. При коротком пребывании в камере, они получали подкрепление в одной кормушке, при более длительном - в другой. Следовательно, анализ времени пребывания в кормушке давал животному некоторый оценочный результат, служащий направляющим сигналом к той или иной кормушке.

Особо важной проблемой, которую на кафедре А.С.Дмитриева удалось во многом решить, явилась совмещенная с изучением условных рефлексов на время проблема восприятия и оценки времени человеком. Для решения этой проблемы использовались разные методы в исследованиях на людях.

В качестве предпосылки к решению этого вопроса ранее были проведены исследования в сравнительно-возрастном плане на животных (кроликах). Было показано, что у взрослых животных, по сравнению с молодыми, лучше выражен переход от первой стадии ко второй, и во второй быстрее и более устойчиво осуществляется формирование недейательной фазы. Образовавшийся условный рефлекс на время тем точнее, чем больше возраст животного. То же касается и выработки дифференцировки, а так же переделки условных рефлексов на время.

Накопленный опыт исследований, включая и методические подходы изучения временных реакций у человека, позволил ставить, и в определенной степени решать, ряд практических задач, и, прежде всего, для оценки функционального состояния человека при различных режимах деятельности, напряженности труда и т.д. В итоге был достигнут высокий и качественно новый уровень в изучении условных рефлексов на время и в расшифровке сложнейших механизмов оценки времени животными и человеком, составивший в физиологии высшей нервной деятельности целую область фундаментальных исследований. Эти

знания, в соединении с новыми направлениями и тенденциями открывают блестящие перспективы к дальнейшему изучению поведенческой деятельности и специфических форм пространственно - временной ориентации человека в природной и социальной среде.

© З.Р. Хисматуллина, С.М. Мочалов, 2015

УДК 612.821

## **ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ МОДИФИКАЦИЮ БЕЛКОВ МОЗЖЕЧКА**

**Лобанов С.А.<sup>2</sup>, Хисматуллина З.Р.<sup>1</sup>, Шишкин И.В.<sup>1</sup>,  
Насырова Е.В.<sup>1</sup>, Азнабаев О.Ф.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа,

<sup>2</sup>Башкирский государственный педагогический университет, Уфа,  
lobanovprof@yandex.ru

Стресс является одним из негативных последствий технического прогресса. Особую важность представляет изучение влияния стресса на организм, в особенности на нервную систему, отвечающую за регуляцию адаптивного поведения [1, 2]. К таким структурам относят мозжечок. Известно, что все процессы, протекающие в нервной системе, связаны с перестройкой компонентов клеточных мембран. Одним из таких проявлений является окислительная модификация биомолекул мембран, которая представляет собой наиболее быстрый путь изменения их физико-химических параметров. Это способствует включению компенсаторных механизмов, проявляющихся на уровне молекулярной организации и приспособлению к изменившимся условиям среды. Все эти изменения, не выходящие за границы физиологической нормы, приводят к повышению жизнеспособности клеток [1, 3, 4, 6].

В работах отечественных и зарубежных исследователей показано, что в основе клеточных и молекулярных механизмов регуляции функциональной активности головного мозга лежат процессы свободнорадикального окисления [3, 5, 8]. Из анализа литературных данных известно, что сведения, относящиеся к процессу свободнорадикального окисления белков крайне малочисленны.

Исследователями показано, что белки нервной ткани участвуют в различных специфических процессах, к которым можно отнести передачу нервного импульса, образование синапсов, участие в процессах обучения и памяти. Учитывая эти данные, становится очевидным влияние

изменения белковых структур в клеточных мембранах. Параллельно с этим, измененные белки, облегчают его протеолитический распад и служат сигналами для изменения метаболизма клетки, что также способствует формированию процессов срочной адаптации клетки к изменившимся условиям [3, 6, 7, 9].

Таким образом, изучение процессов свободнорадикального окисления белков является одним из актуальных вопросов в настоящее время в таких областях как биология, ветеринария и медицина. Известно, что процессы свободнорадикального окисления в организме находятся под строгим контролем антиоксидантной системы. Особенностью метаболизма мозга являются интенсивные аэробные окислительные процессы. В нервной системе существует тонко сбалансированная система «свободнорадикальное окисление – антиоксиданты». В условиях действия факторов стресса для нервной системы повреждающим элементом будет являться не само свободнорадикальное окисление, а нарушение регуляции его антиоксидантной системой. Нервная ткань является наиболее чувствительной к такому дисбалансу в силу своих биохимических и функциональных особенностей.

Целью является выявление особенностей влияния стресса на окислительную модификацию белков мозжечка

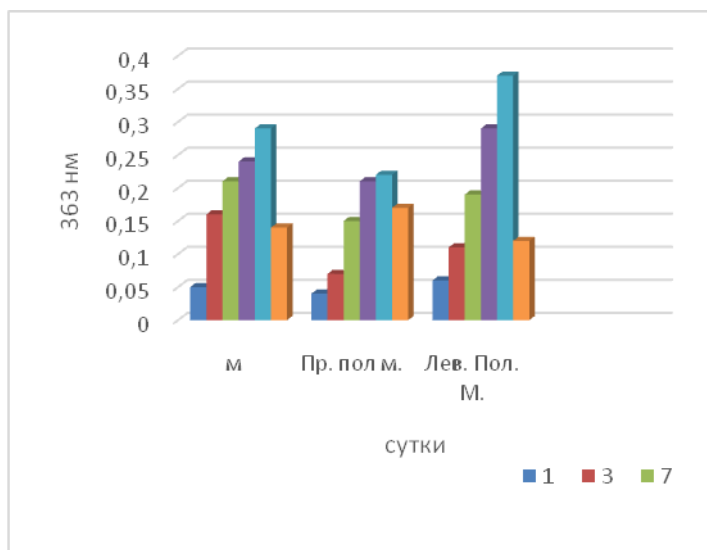
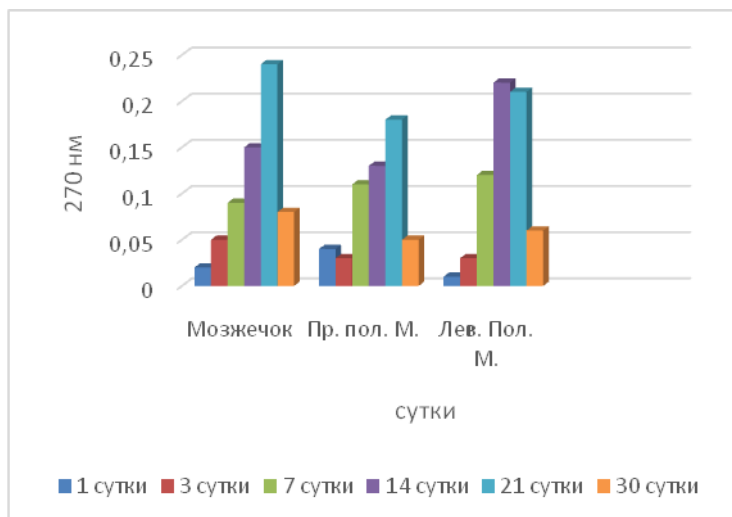
#### **Методы исследований**

Опыты проводили на крысах линии Wistar, которых разделяли на две группы – контрольную и опытную. Опытную группу (n=22) подвергали иммобилизационному стрессу в узких пластиковых пеналах (20x7x6 см) по 8 часов в течение 90 дней. Крысы второй группы (n=20) оставались интактными. Исследования проводились на половозрелых крысах массой тела 195,0-205,0 г.

Окислительная модификация белков исследовалась в мозжечке, правом и левом полушариях мозжечка. Проводилась количественная оценка продуктов окислительной модификации белков, основанная на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков и 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, количество которых определяли спектрофотометрически на приборе СФ-26А. Ткань обрабатывали согласно методу Левина и соавт. [7]. Измеряли экстинкцию на следующих длинах волн: 270 нм – продукты ОМБ, образовавшиеся на стадии инициации свободнорадикального окисления, 363 и 370 нм – карбонильные производные белков, характеризующие дальнейшее окисление белка.

## Основные результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что в ткани мозжечка экспериментальных животных интенсивно протекают процессы свободнорадикального окисления белков.



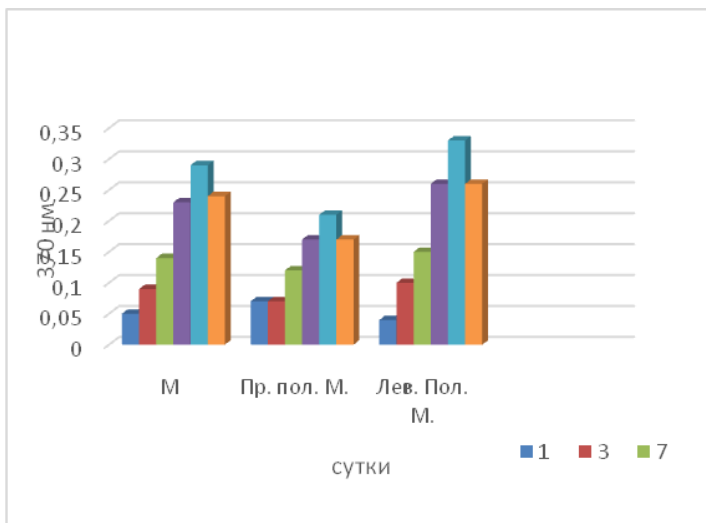


Рис.1 Окислительная модификация белков (Е/мг белка) в мозжечке в контроле (норма) и после стресса (ПС) крыс. (М-мозжечок, пр. пол.м. – правое полушарие мозжечка, лев. пол. м. – левое полушарие мозжечка)

\* -  $P < 0.05$  по сравнению со значениями контроля

В условиях действия экстремальных факторов динамика накопления продуктов окислительной модификации белков в мозжечке, правом и левом его полушариях имеет сходную картину. При этом максимальная интенсивность образования этих продуктов прослеживается к 21 суткам эксперимента и при этом сильнее выражена в мозжечке.

Эти данные проведенного исследования свидетельствуют о том, что система свободнорадикального окисления белков является важной составляющей системы метаболизма и функционального состояния нервной ткани. По мере увеличения длительности действия негативных факторов выявляются сходные изменения в динамике накопления продуктов окислительной модификации белков в исследованных отделах мозжечка.

В большей степени эти изменения были выражены в период с 14 по 21 сутки в левом полушарии мозжечка всего периода наблюдения в условиях действия экстремальных факторов.

В мозжечке крыс, находящихся в обычных условиях, а также и при действии длительной гиподинамии у животных наблюдалось максимальное накопления продуктов спонтанной окислительной модификации белков в период 21 суток. При этом прослеживается, что в

отличие от нормы в мозжечке крыс при гиподинамии интенсивность процессов свободнорадикального окисления белков имеет тенденцию к увеличению не только в самом мозжечке, но и его разных полушариях. В тоже время эти явления были в большей степени выражены в левом полушарии мозжечка, что скорее всего отражает два существенных момента, в первом случае - активацию свободнорадикального окисления, во втором случае – истощение антиоксидантной системы.

На основании проведенных исследований и полученных данных было установлено, что система свободнорадикального окисления белков является одним из компонентов метаболизма белков нервной системы. Процессы свободнорадикального окисления белков имеют существенное значение в структурной перестройке и функциональной активности клеток нервной системы. Эти изменения прослеживаются в структурах ответственных за регуляцию адаптивного поведения.

## **ВЫВОДЫ**

В мозжечке, правом и левом полушариях мозжечка у крыс, находившихся в обычных условиях наибольший уровень спонтанной окислительной модификации белка наблюдался к 21 суткам. Действие длительной гиподинамии приводило к тому, что наибольший уровень индуцированной окислительной модификации белка также возрастал к этому времени, но имел больший уровень.

## **Список литературы**

1. Герасимова И.А. Влияние пренатального стресса на перекисное окисление липидов в некоторых отделах головного мозга самцов и самок взрослых крыс / И.А. Герасимова, М.А. Флеров, А.В. Вьюшина // Нейрохимия. 2005. - Т. 22. - № 4. - С.273-278.
2. Емельёва Т.Ф. Структурно-функциональные особенности мозжечка при стрессе: автореф. дисс. . канд. биолог, наук / Т.Ф. Емельёва. — Уфа: 2005. 22 с. Библиогр.: 5 назв.
3. Зенков, Н. К. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты / Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е.Б. -М.: МАИК, 2001. -343 с.
4. Казимирко, В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко. – Киев: Морион, 2004. – 160 с.
5. Лобанов С.А. Морфофункциональные изменения митохондрий при стрессе / С.А. Лобанов, А.В. Данилов, Е.В. Данилов, С.К. Асаева, Г.Ф. Арсланова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – № 12. –т. 144. – С. 699-

6. Horn, F. Biochemie des Menschen / F.Horn, M. Isabelle, N. Schneider. – Stuttgart: Thieme. 2005.

7. Levin R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A. and Climent I. Determination car-bonyl content in oxidatively modified proteins //Methods Enzym. 1990.- 186:464-478.

8. Loffler, G. Biochemie and Pathobiochemie / G. Loffler, P.E. Petrides– Berlin: Springer, 2003.

9. Shaikh Z.A., Vu T.T. and Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants //Toxicol. Appl. Pharmacol. -1999. -154(3):256-263.

© С.А. Лобанов, 2015.

УДК 612.826.1, 612.843.637

## **ДИНАМИЧЕСКИЕ КАРТЫ РЕЦЕПТИВНЫХ ПОЛЕЙ ОРИЕНТАЦИОННО-ИЗБИРАТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ НАРУЖНОГО КОЛЕНЧАТОГО ТЕЛА**

**Якимова Е.Г.**

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
yakimova\_eg@mail.ru

Дорсальное наружное коленчатое тело (НКТд) – главный подкорковый центр, осуществляющий переработку зрительной информации. Это не просто релейная станция, переключающая зрительные сигналы на пути от сетчатки к зрительной коре. В НКТд осуществляется ряд важных операций. В исследованиях нейронных механизмов предметного зрения показано, что в НКТд существуют нейроны, способные оценивать такие параметры зрительных объектов, как яркость, контраст, размер, направление движения, определенные цвета светового спектра [3, 5]. Экспериментально показано, что нейроны НКТд избирательны к ориентации тестовых стимулов [2, 4, 6], а также чувствительны к величине и ориентации вектора градиента яркости [6, 7]. Описанные свойства во многом обусловлены структурно-функциональной организацией рецептивных полей (РП) нейронов НКТд. Анализ формы РП клеток НКТд позволил выявить асимметрию поля [8], а также вытянутость поля [1, 8], эти характеристики РП, возможно, обеспечивают свойство ориентационной чувствительности к полосе и градиенту яркости.

Размеры РП, а также их функциональная организация, зависят от уровня адаптации зрительной системы, интенсивности стимулов, времени их предъявления. Они закономерно меняются в ходе действия стимула. Процессы изменения функциональной организации РП в зависимости от тех или иных условий получили название перестройки, в процессе которой происходит перераспределение соотношения возбуждения и торможения во всем комплексе элементов, образующих РП данного нейрона. В виду того, что РП зрительных нейронов претерпевает пространственно-временную перестройку, представляет интерес исследовать во времени процесс динамики РП. Цель данной работы – исследование пространственно-временных характеристик РП нейронов НКТд кошки методом динамического картирования РП.

### **Материал и методика**

Исследования были проведены под руководством Н.Ф. Подвигина. В опытах использовалась общепринятая нейрофизиологическая методика, позволяющая регистрировать импульсные реакции нейронов НКТд кошки. Установка для проведения электрофизиологических экспериментов позволяла производить зрительную стимуляцию и регистрацию импульсной активности нейронов НКТд в режиме управляемого автоматизированного эксперимента. Опыты ставились на обездвиженных наркотизированных животных (кошки). Импульсную активность нейронов регистрировали вольфрамовыми микроэлектродами. Эксперименты проводились в соответствии с Положением комиссии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН по нормам и правилами гуманного обращения с подопытными животными. Подробное описание условий эксперимента дано в работе [6].

Стимулы предъявляли монокулярно. На экране определяли границы и центр РП регистрируемого нейрона путем матричного экспресс-картирования РП светлым пятном диаметром 0.2-0.5 угл. град. в пределах матрицы 10x10, время предъявления стимула 500 мс. Определяли ретинотопические координаты РП нейрона относительно положения areacentralis.

В ходе опыта компьютерная программа проводила экспресс-анализ регистрируемых данных: построение постстимульных гистограмм импульсных ответов (ПСТГ) ответов и построение карт РП. Более детальная обработка данных производилась после опыта. Проводился анализ данных с использованием программных средств общего назначения, а также прикладных программ для обработки экспериментальных данных (Analyzer – автор С.В. Пронин, Matsurf – автор А.С. Киселев). По сохраненным матрицам постстимульных гистограмм ответов, полученным при экспресс-картировании РП, с

помощью специально разработанных программ строились карты РП (паттерны нейронной активности). Числовые матрицы значений постстимульных гистограмм ответов нейронов методами машинной графики с использованием процедур интерполяции методом минимальной кривизны и сглаживания кубическими сплайнами представляли в виде двумерной совокупности линий равного ответа (изолиний). Выбор значений ответа, по которым строились изолинии, производился по линейному закону (10, 20, ... 90% от максимального значения). Построение динамических карт РП производилось в программе Mathcad, для каждых 2 мс предъявления стимула строился свой двумерный паттерн нейронной активности, затем все паттерны за 500 мс последовательно выстраивались относительно шкалы величины ответа, таким образом получали видеофайл с картиной изменения структуры РП в пространстве и времени.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе исследования зарегистрировали активность 34 нейронов НКТд. РП большинства клеток находились в пределах  $20^\circ$  от areacentralis. 11 клеток находились в пределах  $25-40^\circ$  от areacentralis. Размер РП нейронов возрастал с увеличением эксцентриситета от  $1.9 \times 3.5^\circ$  до  $9.5 \times 11.5^\circ$ . Нейроны проявляли чувствительность к ориентации полосы и градиента яркости, данные результаты описаны в статьях [6, 9].

Были построены карты РП, которые позволили проанализировать пространственные характеристики РП [8]. Большинство нейронов имело типичную для РП НКТд концентрическую форму с центром и периферией, при этом РП были не круглые, а вытянутые, эллиптической формы. Также наблюдались клетки с РП сложной формы. На картах РП наблюдалась асимметрия центральной зоны поля. Данное наблюдение характеризует разную скорость нарастания возбуждательного процесса за счет действия периферического торможения при пространственно-временной перестройке рецептивного поля.

В данной работе проведен анализ динамических карт РП двадцати нейронов НКТд. Динамические карты представляют собой видеоролики, на которых изображено РП в трехмерном представлении (шкалы  $x$ ,  $y$  – пространственные параметры поля, шкала  $z$  – величина ответа нейрона), изменяющееся во времени (временной параметр отражает величина FRAME), рисунок 1. Программное обеспечение позволяло изменять угол отображения трехмерного РП.

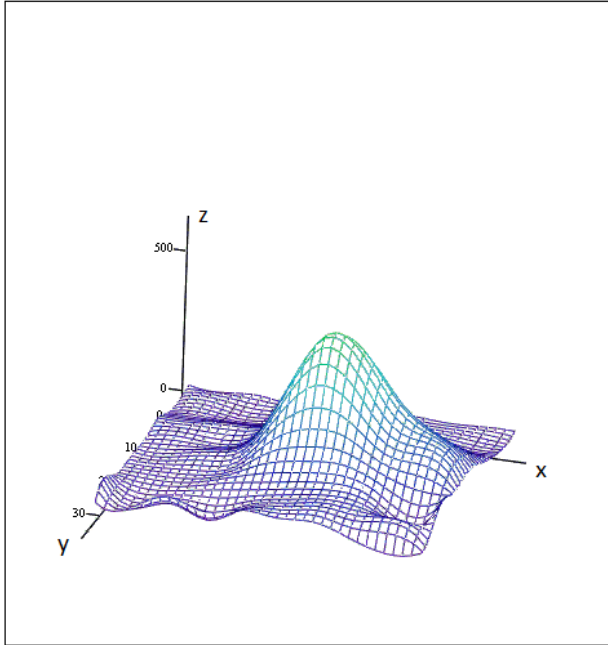


Рисунок 1. Пояснения в тексте.

На полученных картах/видеороликах наблюдаются все характерные фазы изменения РП, которые фиксируются при записи ПСТГ ответов нейронов, – латентный период; начальный фазический разряд (представляет собой резкое увеличение активности нейрона; постоянная составляющая ответа, или тонический компонент (длительностью от 150 до 500 мс), включает в себя уменьшение активности нейрона после первой фазы, вплоть до полного исчезновения ответа, и повторное увеличение активности нейрона, амплитуда ответа во время этой фазы меньше, чем в первой фазе, однако длительность ее гораздо больше.

Средний латентный период, определенный по динамическим картам РП, составил  $40 \pm 4,4$  мс. Показано, что в течение первых 120-150 мс происходит быстрое нарастание ответа в центральной возбуждающей зоне. Дальнейшее угасание ответа, по-видимому, связано с действием периферического торможения. Асимметрия центральной зоны возникает в первые же миллисекунды ответа клетки, и с течением времени усиливается. Результаты, полученные при анализе динамических карт РП

нейронов НКТд, согласуются с данными, полученными при анализе ПСТГ-ответов.

Таким образом, метод динамического картирования РП нейронов является информативным при анализе пространственно-временной перестройки РП, а также позволяет визуализировать динамику рецептивного поля при предъявлении тестовых стимулов.

### Список литературы

1. Suematsu N., Naito T., H. Sato. Relationship between orientation sensitivity and spatiotemporal receptive field structures of neurons in the cat lateral geniculate nucleus // *Neural Networks*. – 2012. – V. 35. – P.10–20.

2. Sun C., Chen X., Huang L., Shou T. Orientation bias of the extraclassical receptive field of the relay cells in the cat's dorsal lateral geniculate nucleus // *Neurosci*. 2004. – V. 125. – № 2. – P. 495-505.

3. *The Visual Neurosciences* /Ed. by L.M. Chalupa and J.S. Werner. MIT Press. 2003. 1808с.

4. Xu X., Ichida J., Shostak Y., Bonds A.B., Casagrande V.A. Are primate lateral geniculate nucleus (LGN) cells really sensitive to orientation or direction? // *Vis. Neurosci*. 2002. – V. 19. – № 1. – P. 97-108.

5. Подвигин Н.Ф. Динамические свойства нейронных структур зрительной системы. Л.: Наука. 1979. 158с.

6. Подвигин Н.Ф., Багаева Т.В., Подвигина Д.Н., Якимова Е.Г., Иванова Л.Е., Солнушкин С.Д. Новое свойство ориентационно-избирательных нейронов наружного коленчатого тела кошки // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2007. Т. 43, № 6, с.487-493.

7. Подвигин Н.Ф., Киселева Н.Б., Новиков Г.И., Чиж А.Н., Левкович Ю.И. Чувствительность рецептивных полей нейронов НКТ кошки к пространственному градиенту яркости // *Сенсорные системы*, 1997б. – Т.11. – №1. – С.69-75..

8. Якимова Е.Г., Чижев А.В. Обработка изображений в рецептивных полях нейронов первых каскадов зрительной системы // *Оптический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015. Т. 82. № 10. С. 27-34.

9. Якимова Е.Г., Чижев А.В. Экспериментальные и модельные исследования ориентационной чувствительности нейронов наружного коленчатого тела // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2013. Т. 99. № 7. С. 841-858.

© Е.Г. Якимова, 2015.

**Секция №1.**  
**АНАТОМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ.**  
**НЕЙРОГЕНЕТИКА**

УДК 612.843.11

**АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МАКУЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ**  
**СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА**

**Мухамадеев Р.А.**

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»  
Минздрава России, г.Уфа, mukhamadeev-gu@yandex.ru

В настоящий момент основным методом исследования анатомических особенностей сетчатки человека *in vivo* является оптическая когерентная томография. Помимо визуализации структуры сетчатки когерентный томограф предоставляет данные о толщине сетчатки в макулярной-парамаккулярной области. Современные спектральные когерентные томографы обладают осевым разрешением в 3-5 мкм, позволяющим в мельчайших деталях анализировать структуру сетчатки, отдельных её слоёв [2]. Одним из наиболее распространённых приборов является оптический когерентный томограф CirrusHD-ОСТ производства компании CarlZeissMeditecInc. (США). Целью нашего исследования было определение нормальных величин толщины сетчатки в макулярной-перимакулярной области, что необходимо для адекватного анализа результатов оптической когерентной томографии высокого разрешения.

**Материалы и методы.** В исследовании приняло участие 75 добровольцев (30 мужчин и 45 женщин) без каких-либо нарушений зрения или жалоб на зрение. Средний возраст –  $22,76 \pm 2,12$  года ( $M \pm SD$ , 19-28 лет). Средняя острота зрения составила  $1,67 \pm 0,27$  (1,1-2,0). Оптическую когерентную томографию выполняли на приборе CirrusHD-ОСТ (CarlZeissMeditec, США). Использовали предустановленный протокол исследования MaculaCube 512x128, в котором выполняются 512 А-сканов в 128 горизонтальных линиях, размещённых в квадрате 6 x 6 мм. Получали показатели толщины сетчатки в пределах сетки EDTRS (окружности диаметром 1, 3 и 6 мм, вложенные друг в друга; окружности 3 и 6 мм разделены на 4 сектора – верхний, назальный, нижний и темпоральный), таким образом получали толщину сетчатки в центре макулы, в четырёх областях макулы, и четырёх секторах перимакулярной области. Кроме того, в использованном протоколе рассчитывается

средняя толщина и объём сетчатки в исследуемой области (квадрат 6 x 6 мм) сетчатки. Распределение полученных данных соответствовало нормальному (по критерию Колмогорова-Смирнова), что позволило нам использовать корреляционный анализ по Пирсону [1]. Исследование было проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации по этическим принципам проведения научных медицинских исследований с участием человека (2000 г.).

**Результаты и обсуждение.** Для центра макулы (в пределах 1 мм) толщина сетчатки составила  $249,41 \pm 15,50$  мкм (220-284 мкм). Макула (в пределах от 1 до 3 мм): верхний сектор –  $324,16 \pm 11,72$  мкм (296-347 мкм), назальный –  $323,03 \pm 11,90$  мкм (296-348 мкм), нижний –  $320,31 \pm 10,78$  мкм (293-339 мкм), темпоральный –  $310,41 \pm 13,57$  мкм (265-344 мкм). Для перимакулярной области (в пределах 3-6 мм): верхний сектор –  $279,79 \pm 10,97$  мкм (250-305 мкм), назальный –  $295,49 \pm 10,97$  мкм (273-319 мкм), нижний –  $269,20 \pm 9,86$  мкм (248-295 мкм), темпоральный –  $263,99 \pm 10,24$  мкм (242-287 мкм). Средний уровень толщины сетчатки в пределах квадрата 6 x 6 мм составил  $281,66 \pm 9,34$  мкм (259-298 мкм), средний объём сетчатки в пределах исследованной области –  $10,14 \pm 0,34$  мм<sup>3</sup> (9,3-10,7 мм<sup>3</sup>). Коэффициент вариации для толщины сетчатки в центре макулы был на уровне 6,95%, для секторов макулярной и парамакулярной окружностей находился в пределах 3,34-4,62%. Все показатели толщины сетчатки достаточно жёстко коррелировали друг с другом –  $r=0,27-0,91$  (коэффициент корреляции Пирсона,  $p=0,05- <<0,0001$ ). Также высокий уровень корреляции с секторальными показателями толщины сетчатки наблюдали для интегральных характеристик –  $r=0,6-0,89$  (коэффициент корреляции Пирсона,  $p=0,05- <<0,0001$ ).

Результаты, полученные нами, оказались сопоставимы с данными других исследователей. Тем не менее, толщина сетчатки в центре макулы, показанная в исследованиях Liu T. с соавт., Solé González L. с соавт., была выше (см. таблицу 1). Однако, по средней толщине сетчатки и объёму сетчатки в макулярной области наблюдали сопоставимые величины и статистически значимых различий не выявили [4, 5]. Известно, что показатели толщины сетчатки в макуле по результатам оптической когерентной томографии обладают высокой повторяемостью [3]. Можно предполагать, что более тонкая сетчатка в центре макулы, полученная в нашем исследовании, является особенностью выборки. На достаточную устойчивость значения толщины сетчатки в норме может косвенно указывать тот факт, что по средней толщине всей макулы, которая рассчитывается из многих локальных показателей, не было выявлено статически достоверных различий.

Таблица 1

Показатели толщины сетчатки в различных выборках.

	Наше исследование (n=75)	LiuT. с соавт. (2011) (n=192)	Solé GonzálezL. с соавт. (2013) (n=100)
Толщина сетчатки в центре макулы, мкм	249,41±15,50	262.4±22.8	261.31±17.67
Средняя толщина сетчатки, мкм	281,66±9,34	281.3±14.5	280.33±10.34
Средний объём сетчатки, мм <sup>3</sup>	10,14±0,34	10.1±0.6	10.09±0.37

**Заключение.** Таким образом, нами были получены нормальные показатели толщины сетчатки в соответствии со стандартным протоколом исследования, используемым в оптическом когерентном томографе высокого разрешения CirrusHD-OCT. Эти показатели могут использоваться в виде справочных величин (для лиц соответствующего возраста) для оценки уменьшения толщины сетчатки в результате различных дегенеративных процессов, либо для определения степени увеличения толщины сетчатки при её отёках. Тем не менее, в качестве нормативных данных необходимо использовать средние расчётные показатели толщины сетчатки в макулярной-перимакулярной области, поскольку эти значения соответствуют величинам, полученным в других исследованиях. Значение толщины сетчатки в центре макулы больше зависит от особенностей конкретной выборки.

### Список литературы

1. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа. Практикум по статистическим методам и исследованию операций с использованием пакетов STATISTICA и EXCEL. М.: ФОРУМ: ИНФРА-М, 2010. 464 с.
2. Свириной А.В., Кийко Ю.И., Обруч Б.В., Богомолов А.В. Спектральная оптическая когерентная томография: принципы и возможности метода // Клиническая офтальмология. – 2009. – Т. 10. – № 2. – С. 50-52.

3. Garcia-Martin E, Pinilla I, Idoipe M, Fuertes I, Pueyo V. Intra and interoperator reproducibility of retinal nerve fibre and macular thickness measurements using Cirrus Fourier-domain OCT // Acta Ophthalmol. – 2011;. – V. 89. – P. e23-e29.

4. Liu T, Hu A Y, Kaines A, Yu F, Schwartz S D, Hubschman J P. A pilot study of normative data for macular thickness and volume measurements using cirrus high-definition optical coherence tomography // Retina. – 2011. – V. 31. – № 9. – P. 1944-1950.

5. Solé González L, Abreu González R, Alonso Plasencia M, Abreu Reyes P. Normal macular thickness and volume using spectral domain optical coherence tomography in a reference population // Arch Soc Esp Oftalmol. – 2013. – V. 88. № 9. – P. 352-358.

© P.A. Мухамедеев, 2015

УДК 612.843.11

## **ЛОКАЛИЗАЦИЯ CART-ПЕПТИДА В РЕПРОДУКТИВНЫХ ЦЕНТРАХ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА**

**Хисматуллина З.Р.**

Башкирский государственный университет, Уфа, hismatullinazr@mail.ru

CART-пептид (cocaineandamphetamineregulatedtranscript/peptide) экспрессируется нейронами различных отделов мозга, что обуславливает его участие в регуляции многих функций организма. Экспериментальными исследованиями установлена вовлеченность миндалевидного комплекса (МК) мозга в регуляцию секреции гонадотропинов. Несмотря на наличие большого количества экспериментальных работ, посвященных вопросу участия МК в обеспечении нейроэндокринных взаимодействий, роль выявленных на его территории зон полового диморфизма в регуляции репродуктивных процессов, остается не выясненной. В первую очередь, это касается переднего кортикального ядра и передней амигдаларной области. Понимание структурных основ и механизмов функционирования репродуктивных центров МК способно сформировать теоретический базис для разработки научно-обоснованных профилактических и лечебных мероприятий.

Известно, что половые стероиды являются универсальными регуляторами деятельности различных систем и тканей организма, обладая способностью влиять на экспрессию генов. Активизирующий эффект половых стероидов реализуется как гуморальным, так и нервно-

проводниковым путем, поэтому проводя исследование его репродуктивных центров представлялось важным оценить иммунореактивность нейронов в передней амигдаллярной области и переднем кортикальном ядре МК на разных стадиях полового цикла.

Иммуноцитохимическое выявление CART-пептида проводили на криостатных срезах головного мозга половозрелых самок крыс линии Вистар, которые были умерщвлены на стадиях эструса и метэструса эстрального цикла. После перфузии головной мозг обрабатывали 1М фосфатным буфером (PB, pH=7,4) и 4% раствором параформальдегида на 0,1 М PB на свободно плавающих фронтальных срезах одновременно для двух групп животных. После удаления эндогенной пероксидазы и выдерживания в блокировочном растворе, который содержал 3% бычий сывороточный альбумин (BSA; Sigma, США) и 1% козий альбумин (GSA, Sigma, США), срезы инкубировали в растворе первичных антител, содержащих поликлональные rabbit-anti-CART (55-102) антитела (H-003-62, PhoenixPharm., Incorp, Belmont, CA, США) при +4 С<sup>0</sup> в течение 48 часов. Потом срезы промывали и в течение двух часов инкубировали во вторичных goat-anti-rabbit антителах, конъюгированных с авидиновым комплексом (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Inc., США). После промывания срезов, их инкубировали со стрептавидин-пероксидазой (ABC-kit 689321, ICN Biomedicals Ins., США). Перед заключением под стекло, срезы промывали и инкубировали с раствором 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорида (DAB, Sigma, США) на фосфатно-солевом буфере. Контрольные срезы обрабатывали в указанной выше последовательности без использования первичных антител. Измерение оптической плотности проводили в программе «ФОТО-М»

CART (cocaine-amphetamine-regulated transcript) пептид выявлен иммуноцитохимической реакцией как в нейронах изучаемых нами репродуктивных центров, так и в составе поверхностных слоев переднего кортикального ядра, медиального ядра и передней амигдаллярной области.

В передней амигдаллярной области иммунореактивные нейроны имеют крупные и средние размеры. При этом выраженная иммунореактивность имеет место в крупных нейронах, обладающих угловатой формой, интенсивность осадка в средних нейронах, тела которых обладают округло-овальной формой, ниже. Нейроны средних размеров распределены по всей территории, занимаемой передней амигдаллярной областью и образуют сеть. В переднем кортикальном ядре определяются среднего размера нейроны, с угловатой формой тел и умеренной экспрессией CART-пептида, Они встречаются чаще в составе глубокой зоны ядра, а также в медиальной части поверхностно-клеточной зоны. В медиальном ядре нейроны имеют средние размеры, форма тел

иммунореактивных нейронов различная - от округло-овальных до полигональных, среди них встречаются и веретенообразные.

На роstralном уровне переднего отдела на препаратах с иммунореактивными структурами выделяется полоску хорошо прокрашенных волокон, берущих начало на границе с супраоптическим ядром гипоталамуса. Волокна полоски строго ориентированы и заканчиваются на границе с ядром латерального обонятельного тракта. На каудальном уровне переднего отдела МК полоска иммунореактивных волокон становится плотнее и шире. Подходя вплотную к переднему кортикальному ядру, волокна расщепляются.

В передней амигдалярной области при изучении экспрессии CART-пептида на стадии эструс крупные иммунопозитивные нейроны хорошо выделяются среди нейронов средних размеров своей выраженной иммунореактивностью. Они имеют тела полигональной и веретеновидной формы. Тела нейронов медиальной части поверхностной клеточной зоны имеют округло-овальную форму, средние размеры и обладают умеренной иммунореактивностью на стадии эструс. В латеральной части поверхностной клеточной зоны переднего кортикального ядра иммунореактивные нейроны дисперсно расположены на всей территории. Форма тел и размеры различаются, часть из них идентична иммунореактивным нейронам медиальной части этого слоя, другая обладает более крупными размерами и разнообразна по форме. В глубокой клеточной зоне переднего кортикального ядра отчетливо определяются единичные крупные нейроны с полигональной формой тела и умеренной экспрессией CART-пептида на срезах, взятых на стадии эструса.

На препаратах с иммунореактивными структурами репродуктивных центров переднего отдела на стадии эструс отчетливо выделяется полоска CART-позитивных волокон в составе поверхностного слоя передней амигдалярной области и переднего кортикального ядра. Она берет начало на границе с супраоптическим ядром и продолжается на базальную поверхность мозга.

В передней амигдалярной области на стадии метэструс количество иммунореактивных нейронов снижается, уменьшается и интенсивность их окраски за счет снижения содержания иммунореактивного осадка. В основном этот белок выявляется в нейронах средних размеров, и они характеризуются умеренной иммунореактивностью. В поверхностной клеточной зоне переднего кортикального ядра, иммунореактивные нейроны имеют средние и мелкие размеры, обладающие низкой иммунореактивностью. Интенсивность выявления иммунореактивного осадка в описанной выше волокнистой связке повышается.

С целью определения уровня иммунореактивности нейронов и волокон проведено измерение оптической плотности нейронов на стадиях

эструс и метаэструс. Они показали, что, что средняя оптическая плотность в передней амигдаллярной области на стадии эструс равна  $3,4 \pm 0,02$  у.е., а на стадии метаэструса снижается более чем в два раза ( $p < 0,01$ ). Во всех зонах переднего кортикального ядра также наблюдается значимое снижение экспрессии CART-пептида на стадии метаэструс. В медиальной части поверхностно-клеточной зоны этого ядра снижение уровня иммунореактивности аналогично нейронам передней амигдаллярной области, т.е. почти в два раза (эструс-  $3,23 \pm 0,02$ , в метаэструсе-  $1,82 \pm 0,04$ ). В отличие от нейронов переднего кортикального ядра и передней амигдаллярной области уровень иммуреактивности в волокнистой связке значимо больше на стадии метэструса ( $p < 0,05$ ).

Изучение иммуноцитохимических препаратов, содержащих CART-позитивные нейроны в передней амигдаллярной области и переднем кортикальном ядре, позволило отметить определенные особенности, предопределенные уровнями циркулирующих половых стероидов.

© *З.Р. Хисматуллина, 2015*

УДК: 613.645:612.82

## **ЭФФЕКТЫ ЦИРКАДИАННОЙ СИСТЕМЫ В ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА**

**Сергеева М.С., Пятин В.Ф., Коровина Е.С., Романчук Н.П.**  
Самарский государственный медицинский университет, Самара,  
marsgrg@yandex.ru

Циркадианная система человека контролируется врожденными «часовыми» генами и внешним циклическим колебаниям освещенности, которые воспринимаются специфическими фоторецепторными меланопсин-содержащими ганглиозными клетками сетчатки [1, 6, 7]. Исследованиями показано, что максимальная чувствительность ретинальных фоторецепторных ганглиозных клеток находится в спектре 480 нм. Сигналы от циркадианных фоторецепторов преимущественно передаются в супрахиазматические ядра (СХЯ) гипоталамуса. Клетки СХЯ является центром циркадианной системы человека, они управляют ритмами эндокринных, физиологических и поведенческих параметров в периоде примерно 24 часа. Каждодневный цикл свет/темнота настраивает внутренние часы, синхронизируя физиологию и поведение. В исследованиях регуляции циркадианных ритмов используются спектры света, не соответствующие максимальной чувствительности

фоторецепторов циркадианной системы, и не всегда учитывается естественная суточная динамика солнечной активности, являющейся регулятором циркадианных часов у человека [9, 10, 11].

Цель настоящей работы – исследовать динамику ритмов ЭЭГ при воздействии на сетчатку глаз голубым светом в спектре максимальной чувствительности фоторецепторов циркадианной системы 480 нм в дневное время.

### **Материал и методы исследования**

В исследовании приняло участие 8 студентов-добровольцев Самарского государственного медицинского университета в возрасте 18–20 лет. ЭЭГ регистрировалась монополярно с помощью 128-канальной системы записи ЭЭГ (BP-010302 BrainAmp Standart 128). Протокол исследования: запись фоновой ЭЭГ в течение 1 мин (I этап); запись ЭЭГ в течение 2 мин в период воздействия на сетчатку глаза световым потоком с максимумом огибающей в области 480 нм (II этап); запись ЭЭГ в течение 1 мин после светового воздействия на сетчатку глаза (III этап). На всех трех этапах испытуемые находились с открытыми глазами в звукоизолированной комнате в состоянии покоя сидя в ЭЭГ-кресле (Neurobotics, Россия). Естественная освещенность комнаты на уровне глаз испытуемых равнялась в среднем 135 Лк, а яркость – 400 кД/м<sup>2</sup>. Измерение освещенности и яркости проводили с использованием прибора ТКА-ПМК (02), зарегистрированного в реестре средств измерений 24248-09 (Россия). Электронный девайс для адекватной стимуляции меланопсин-содержащих ганглиозных клеток сетчатки представляет собой прибор, излучающий световой поток в диапазоне видимого спектра света с максимумом огибающей в области 480 нм [4, 5]. Диапазоны регулируемой освещенности и яркости светового потока электронного девайса составляют: min – 140 Лк/145 кД/м<sup>2</sup>; max – 1650 Лк/875 кД/м<sup>2</sup>.

При обработке ЭЭГ с помощью MatLab разделялась на отдельные частотные диапазоны: дельта (0,3-3,9 Гц), тета1 (4,0-5,9 Гц), тета2 (6,0-7,6 Гц), альфа1 (7,7-9,2 Гц), альфа2 (9,3-10,5 Гц), альфа3 (10,6-12,9 Гц), бета1 (13,0-19,9 Гц), бета2 (20,0-35,0 Гц), гамма (36,0-170,0 Гц). Каждый частотный диапазон обрабатывался с помощью IBM SPSS Statistics 22. Достоверность измерений оценивалась параметрическими (t-тест Стьюдента для зависимых и независимых выборок) и непараметрическими (t-тест Вилкоксона для зависимых выборок и критерий Манна–Уитни для независимых выборок) методами. Статистически значимыми изменения средних величин считались при  $p < 0,001$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В течение 2-минутной стимуляции рецепторного отдела циркадианной системы (II этап исследования) десинхронизация

преобладала в бета2- (у 71,4% испытуемых) и гамма- (у всех испытуемых) частотных диапазонах ЭЭГ, синхронизация - у 71,4% испытуемых - в тета2- и альфа1- ритмах ЭЭГ.

На III этапе нашего исследования по сравнению с фоновой ЭЭГ превалировала синхронизация у 85,7% испытуемых в тета1-, тета2-, альфа1-, альфа2-, альфа3-, бета2- диапазонах ЭЭГ. В гамма-диапазоне на III этапе десинхронизация сохранилась у 57,1% испытуемых (у 42,9% - проявилась синхронизация). В дельта- диапазоне ЭЭГ на II и III этапах исследования у испытуемых десинхронизация и синхронизация были представлены в равной степени.

Альфа-активность - специфический маркер бодрствования, обратно коррелирующий с уровнем мелатонина в плазме крови [9]. По литературным данным коротковолновые световые экспозиции в середине дня, не соответствующие спектру и интенсивности циркадианных фоторецепторов, не вызывали изменение альфа-ритма (460 нм,  $2,8 \times 10^{13}$  фотонов/см<sup>2</sup>/с, продолжительностью 6,5 ч) или вызванная десинхронизация в альфа (8-12 Гц), альфа - тета (5-9 Гц) и тета (4-8 Гц) диапазонах ЭЭГ (max, = 470 нм при 40 Лк, продолжительность 48 мин) была статистически недостоверной [9,10]. Анализ ЭЭГ от четырех Ag-AgCl электродов, размещенных на Fz, Cz, Pz и Oz, после 30-минутного воздействия узкополосного источника света (max, = 470 нм при 40 лк) в ранние утренние часы после пробуждения выявил уменьшение мощности только в альфа-диапазоне ЭЭГ [11]. В других исследованиях при дневной световой экспозиции в течение 60 мин полихроматического света, обогащенного на 33% и 66% синим светом (451 нм, 40 Лк), отмечается уменьшение мощности в низко- (8-10 Гц) и высокочастотном (10-12 Гц) альфа-диапазоне ЭЭГ. При этом модуляция высокочастотного альфа-ритма не зависела от времени освещения.

В нашей работе при воздействии света длиной волны 480 нм, кроме альфа-ритма, отмечалась синхронизация и в тета2-диапазоне ЭЭГ. Отличие литературных данных от приведенных в исследовании, по нашему мнению, заключаются в том, что фотостимуляция сетчатки производилась длинами волн вне диапазона максимальной фоточувствительности рецепторов циркадианной системы. Так, световая экспозиция 460 нм в дневное время уменьшала мощность в диапазоне тета / низкочастотный альфа (7,5-8,5 Гц). Сравнение между дневным и ночным воздействием 460 нм ( $2,8 \times 10^{13}$  фотонов/см<sup>2</sup>/с) продемонстрировало большее значение мощности в дельта диапазоне (0,5-1,0 Гц) и меньшее значение мощности в альфа-ритме ЭЭГ (8,5-11,5 Гц) при дневной экспозиции по сравнению с ночной [9]. В исследованиях, проводимых в дневное время в условиях частичного лишения сна (при увеличении сонливости и чувствительности биологической системы к

свету), воздействие коротковолнового света вызывало десинхронизацию в тета-диапазоне ЭЭГ.

Гамма ритм вовлечен в процессы научения и памяти, внимания, восприятия, формирования и восприятия эмоций [8].

Бета- ритм ЭЭГ регистрируется у человека в состоянии бодрствования, является нейрофизиологическим коррелятом мышления, произвольного внимания. В литературе нам не встретились данные о влиянии голубого света в спектре максимальной чувствительности фоторецепторов циркадианной системы в дневное время на гамма- и бета- диапазоны ЭЭГ. В нашей работе под воздействием света с максимумом огибающей в области 480 нм у всех испытуемых отмечалась десинхронизация гамма-ритма ЭЭГ. На III этапе в гамма-диапазоне десинхронизация сохранилась у 57,1% испытуемых (у 42,9% - проявилась синхронизация). Выявленная нами на II этапе исследования десинхронизация в бета2-диапазоне сменилась на синхронизацию после коротковолновой световой экспозиции 480 нм.

Таким образом, в течение 2-минутной световой экспозиции с максимумом огибающей в области 480 нм в дневное время суток нами получен ЭЭГ ответ в виде синхронизации в низко- и среднечастотных (тета2-, альфа1) и десинхронизации в высокочастотных (бета2 и гамма) диапазонах, после коротковолновой световой экспозиции ЭЭГ ответ проявился в виде синхронизации в низко- (тета1, тета2), средне- (альфа1, альфа2, альфа3) и высокочастотных (бета2) диапазонах.

### **Заключение**

Нейрофизиологический ответ по ритмам ЭЭГ при восприятии испытуемыми коротковолнового электромагнитного излучения проявился уже на первой минуте воздействия. В отличие от других авторов, в нашем исследовании на сетчатку глаза в период дневного бодрствования подавался в течение 2 минут голубой свет в спектре максимальной чувствительности фоторецепторов циркадианной системы. Феномен десинхронизации бета-2- и гамма- диапазонов ЭЭГ и последующей синхронизации бета2 ритма ЭЭГ в этих экспериментальных условиях описан нами впервые. Ранее нами было показано, что при аналогичной световой экспозиции у испытуемых возникают психоэмоциональные (увеличение субъективной оценки самочувствия, активности, настроения) и когнитивные (увеличение значения коэффициента точности) ответы [2, 3]. Мы предполагаем, что циркадианные часы человека контролируют когнитивные и психоэмоциональные функции мозга при участии бета-2- и гамма- квантования.

### Список литературы

1. Пятин В.Ф., Сергеева М.С., Широлапов И.В. Моргание как механизм контроля освещенности сетчатки и функции ее фоточувствительных ганглиозных клеток // Биомедицинская радиоэлектроника. – № 4, 2014. Материалы X Международного междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии» и научной школы «Достижения нейронаук в начале XXI века» – С. 67-68.

2. Сергеева М.С., Пятин В.Ф., Коровина Е.С. Контроль управления функциональным состоянием организма человека циркадианной системой в ранние утренние часы // Биомедицинская радиоэлектроника. – № 4, 2015. Материалы XI Международного междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии» и научной школы «Достижения нейронаук в начале XXI века» – С 72-74.

3. Способ нормализации циркадианнных ритмов человека: пат. № 2533965 Рос. Федерации от 27.11.2014.

4. Устройство для воздействия на циркадианнные часы человека: пат. №124148 Рос. Федерация от 20.01.2013.

5. Устройство для воздействия на биоритмы человека: пат. №128494 Рос. Федерации от 27.05.2013.

6. Berson D.M., Dunn F.A., Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock // Science. – 2002. Vol. 295. № 5557. – P. 1070-1073.

7. Erren T.C., Reiter R.J. A generalized theory of carcinogenesis due to chronodisruption. // Neuroendocrin Lett – 2008. Vol. 29(6). – P. 815-821.

8. Headley, D. B., Weinberger, N. M. Fear conditioning enhances gamma oscillations and their entrainment of neurons representing the conditioned stimulus.// J. Neurosci. – 2013. Vol. 33 5705–5717. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4915-12.2013.

9. Rahman S.A., Flynn-Evans E.E., Aeschbach D., Brainard G.C., Czeisler C.A., Lockley S.W. Diurnal spectral sensitivity of the acute alerting effects of light // Sleep. – 2014. Vol. 37. № 2. – P. 271-281

10. Sahin L., Figueiro M.G. Alerting effects of short-wavelength (blue) and longwavelength (red) lights in the afternoon // Physiol. Behav. –2013. Vol.116 –117. P.1–7.

11.Okamoto Y., Rea M.S., Figueiro M.G. Temporal dynamics of EEG activity during short- and long-wavelength light exposures in the early morning // BMC Research Notes. – 2014. Vol. 7:113. DOI: 10,1186 / 1756-0500-7-113. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/113>.

© М.С. Сергеева, 2015.

УДК 611.813.14.018: 599.323.4

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ САМЦОВ КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij С РАЗЛИЧИЯМИ ЭКСПРЕССИИ КОРОТКОЙ ИЗОФОРМЫ РЕЦЕПТОРА ДОФАМИНА ВТОРОГО ТИПА (D<sub>2</sub>S) В ТЕСТЕ «ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ»**

**Галиева Л.Ф.**

Башкирский Государственный Университет, Уфа,

galieva-liliya@yandex.ru

Научный руководитель: доц., д.м.н. Ахмадеев А.В.

**Введение.** Крысы линии WAG/Rij являются инбредной линией с генетически детерминированной абсансной эпилепсией. Они широко используются в качестве адекватной модели для изучения механизмов генерализованной абсансной эпилепсии человека (Coenenetal, 2003). Известно, что у этих крыс одним из патогенетических механизмов эпилептической активности является гиподисфункция дофаминергической системы мозга (Kuznetsovaetal, 2000). Крысы линии WAG/Rij с разными генотипами по локусу TAG 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD<sub>2</sub>) имеют различия в экспрессии короткой изоформы дофаминового рецептора второго типа (D<sub>2</sub>S) (Zhangetal., 2007). Известно, что активация D<sub>2</sub>S нарушает синтез и выделение дофамина, ограничивая эти процессы, и приводит к снижению двигательной активности, в то время как активация длинной изоформы (D<sub>2</sub>L) повышает локомоторную активность (Beaulieu, Gainetdinov, 2011). Влияние половых стероидов на экспрессию изоформ этого рецептора не изучено.

**Целью работы** явилась сравнительная характеристика двигательной активности самцов двух субпопуляций крыс линии WAG/Rij, гомозиготных (A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub> и A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub>) по локусу TAG 1A DRD<sub>2</sub> в тесте «Круглое открытое поле».

**Материал и методы исследования.** В работе использовано 30 половозрелых самцов: 17 крыс с генотипом  $A_1/A_1$  (9 - контроль, 8 - орхидэктомированных) и 13 с генотипом  $A_2/A_2$  (6 - контроль, 7 - орхидэктомированных). Крысы содержались в стандартных условиях вивария в открытых проволочных клетках, где они могли свободно передвигаться, при естественном освещении. В помещении поддерживали постоянную комнатную температуру ( $20^{\circ}$ - $22^{\circ}$ C) и уровень влажности. Еду и питье животные получали *ad libitum*. В каждой клетке находилось не более пяти крыс.

Регистрацию поведения в «Круглом открытом поле» проводили до проведения орхидэктомии и через 9 дней после операции, которую проводили по общепризнанной методике (Кабак, 1968). Круглое открытое поле представляло собой арену 1,5 м в диаметре с высотой стенок 0,8 м, дно которой было расчерчено на сегменты. В открытом поле выделяли 3 зоны: центральную, промежуточную (6 сегментов), периферическую (12 сегментов). Освещение производилось 2 лампами, мощностью по 60 Вт, которые располагались на высоте 1,5 м от дна камеры над центральными сегментами поля. Все процедуры связанные с тестированием в открытом поле проводились с 14.00 до 18.00.

Крыс помещали в центр открытого поля и оценивали двигательную активность в течение пяти минут. Двигательную активность определяли путем подсчета числа пересеченных животным сегментов. Сегмент считался пересеченным, если крыса переступала через линию передними и задними лапами. Общая двигательная активность вычислялась путем суммирования числа пересеченных квадратов в центре, в середине поля и по его периферии. Стандартный режим регистрации соблюдался нами в течение всех 5 дней тестирования. После тестирования каждого животного поле тщательно обрабатывали спиртовым раствором и промывали водой.

**Полученные результаты и их обсуждение.** Анализ двигательной активности крыс со сниженной экспрессией  $D_2S$  (генотип  $A1A1$ ) показывает, что после гонадэктомии она значительно снижается в периферических зонах открытого поля (ОП, таблица № 1), что приводит к снижению общего показателя двигательной активности. При этом двигательная активность в центральных и промежуточных зонах ОП сохраняется без статистически значимых изменений.

Таблица № 1

Показатели двигательной активности крыс с генотипом А1А1 до и после орхидэктомии ( $M \pm m$ ).

Показатель	До	Т,р	После
Общая двигательная активность	111,60 ± 3,46	<u>2,48</u> , <0,05	78,48 ± 12,89
Центральная зона	5,64 ± 2,31	1,16, p>0,05	2,88 ± 0,56
Промежуточная зона	14,16 ± 1,49	1,15, p>0,05	11,48 ± 1,80
Периферическая зона	91,80 ± 3,49	<u>2,33</u> , p<0,05	64,24 ± 11,29

Данные о динамике изменений двигательной активности у крыс с генотипом А2А2 до и после орхидэктомии приведены в таблице № 2.

Таблица № 2

Показатели двигательной активности крыс с генотипом А2А2 до и после орхидэктомии ( $M \pm m$ ).

Показатель	До	Т,р	После
Общая двигательная активность	73,36 ± 9,42	<u>2,50</u> , <0,05	46,68 ± 4,84
Центральная зона	3,84 ± 0,32	<u>2,44</u> , <0,05	2,52 ± 0,44
Промежуточная зона	14,12 ± 2,29	1,95, >0,05	8,52 ± 1,74
Периферическая зона	52,56 ± 5,75	<u>2,51</u> , <0,05	35,64 ± 3,50

У крыс с генотипом А2А2, у которых на основании ранее проведенных исследований (Леушкина, 2014) предполагается повышенная экспрессия короткой изоформы рецептора, после орхидэктомии двигательная активность снижается более значительно (на 36% по сравнению с 30% у крыс с генотипом А1А1). При этом после орхидэктомии значительно уменьшается двигательная активность не только на периферии ОП, но и в его центральных зонах. Этот факт может свидетельствовать о том, что уровень тревожности у крыс этой группы на фоне дефицита тестостерона повышается.

### **Заключение.**

Полученные результаты показывают, что:

1. У крыс с разными генотипами (A1A1 и A2A2) дефицит тестостерона, созданный экспериментально орхидэктомией, приводит к снижению двигательной активности, выявляя роль тестостерона (и вероятно, его метаболитов) в функционировании D2;

2. Выраженность снижения двигательной активности у изученных двух групп крыс позволяет предполагать, что генетически предопределенные (генотипом локуса TAG 1A DRD2) различия в экспрессии короткой изоформы D2 предопределяют эффект влияния тестостерона на двигательную активность крыс;

3. У крыс с разными генотипами (A1A1 и A2A2) после орхидэктомии выявлены особенности перемещений по разным зонам ОП, позволяющие предполагать повышение уровня тревожности у крыс с генотипом A2A2, вероятно, связанные с изменением экспрессии эстрогенного рецептора бета, который, как известно, принимает участие в формировании тревожности и страха (Krezel et al., 2001).

### **Список литературы**

1. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. 2-е изд. М.: Изд-во МГУ. – 1968. – 275 с.

2. Леушкина Н.Ф. Особенности двигательной активности и исследовательской деятельности крыс, имеющих различия в экспрессии изоформ D2-рецептора / Н.Ф. Леушкина, А.В. Ахмадеев // Фундаментальные исследования. – 2014. - №9 (часть 11). – С. 2465-2468.

3. Beaulieu, J. M., Gainetdinov, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol.* – 2011. – Rev.63. – P. 182–217. doi: 10.1124/pr.110.002642.

4. Coenen A.M.L., van Luijtelaar E.L.J.M. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behavior Genetics.* – 2003. – V.33 (6). – P. 635–655.

5. Krezel W., Dupont S., Krust A., Chambon P., Chapman P.F. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – V.98, N. 21. – P.12278-12282.

6. Kuznetsova G. D., Coenen A.M.L., van Luijtelaar E.L.M. Mixed forms of epilepsy in a sub-population of WAG/Rij rats. In: *The Wag/Rij rat model of absence epilepsy. The Nijmegen . Moscow research.* – 2000. – Nijmegen. NICI. – 141 p.

7. Zhang Y., Bertolino A., Fazio L., Blasi G., Rampino A., Romano R., Mei-Ling Lee T., Tao Xiao, Papp A., Wang D., Sadee W. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Journal The Proceedings of the*

УДК 576.3

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ  
ПАРАМЕТРОВ В ЯДРАХ ПЕРЕДНЕГО ОТДЕЛА  
МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА С УЧЕТОМ  
ФАКТОРА ПОЛА**

**Гарипова И.Р., Хисматуллина З.Р.**

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия  
e-mail:owl55580@mail.ru

Согласно концепции о половой детерминации SRY-гена (sex-determining region of the Y chromosome), через прямое действие тестостерона на нервные клетки мозг плода развивается по мужскому типу, либо по женскому – при отсутствии данного гормона, иными словами, гендерная принадлежность программируется в структурах головного мозга во время внутриутробного развития [1;4]. Половой диморфизм в структуре человеческого мозга на основании данных магнитно-резонансной томографии (МРТ) указывает на морфологические, когнитивные и поведенческие различия между мужчинами и женщинами [5; 6]. Кроме общих различий в объеме мозга, существует разница и в конкретных его областях. Участки мозга, в которых детально представлены различия по фактору пола представлены, в частности, гипоталамусом, базальными ганглиями, гиппокампом и миндалевидным комплексом (амигдалой) [2; 3]. Двусторонние связи миндалевидного комплекса мозга (МК) с преоптической областью и гипоталамусом обеспечивают его участие в процессах полового созревания и регуляции деятельности гонад [7], что позволяет рассматривать МК в качестве звена репродуктивной системы организма. На территории МК существует два нейроэндокринных центра, расположенных в его переднем и заднем отделах и способных регулировать секрецию гонадотропинов и половое поведение. В переднем отделе МК нейроэндокринный центр представлен передней амигдаларной областью (ААА), передним кортикальным (СОа) и центральным (СЕ) ядрами.

**Целью** данной работы являлся анализ корреляции фактора пола и морфометрических показателей передней амигдаллярной области, переднего кортикального и центрального ядер МК на примере мозга крыс линии WAG/Rij.

### **Материалы и методы**

Исследование выполнено на половозрелых самцах (n=25) и самках (n=28) крыс WAG/Rij с массой тела 300-330 г. Все животные содержались в виварии кафедры Физиологии человека и зоологии при свободном доступе к пище и воде и световым днем в 14 часов. Материал для исследования брали путем декапитации наркотизированных эфиром животных и окрашивали крезиловым фиолетовым. Основными параметрами при изучении данных срезов являлись удельная площадь, а также соотношение нейронов и клеток глии передней амигдаллярной области, переднего кортикального и центрального ядер на роstralном и каудальном уровнях переднего отдела МК мозга крыс. Определение площади проводили в программе Universal Desktop Ruler (AVPSoft, USA) в мм<sup>2</sup>, с дальнейшим вычислением удельной площади структур. Подсчет нейронов и клеток глии в ядрах переднего отдела МК проводили с помощью световой микроскопии.

Статистическую обработку и анализ данных проводили в программном пакете «Statistica 5.0» (StatsoftInc., USA) на основании данных удельной площади и количества клеток в исследуемых областях МК. Значимость различий между самцами и самками определялась критерием Стьюдента. За достоверные принимались различия при  $p \leq 0,05$ .

### **Результаты исследований**

При сравнении полученных данных в исследуемых ядрах стало очевидно: значения удельной площади в переднем кортикальном ядре у самцов крыс выше, чем у самок и на роstralном (самцы  $9,95 \pm 0,34$ ; самки  $9,06 \pm 0,32$ ), и на каудальном (самцы  $15,28 \pm 0,43$ ; самки  $14,77 \pm 0,23$ ) уровнях (табл.1).

Удельная площадь передней амигдаллярной области самцов ( $7,42 \pm 0,60$ ) меньше, чем у самок крыс ( $8,12 \pm 0,32$ ). В центральном ядре удельная площадь у самок крыс также больше, по сравнению с самцами как на роstralном (самцы  $4,11 \pm 0,32$ ; самки  $4,22 \pm 0,12$ ), так и на каудальном уровнях (самцы  $6,20 \pm 0,33$ ; самки  $6,45 \pm 0,55$ ). Полученные данные несомненно говорят о влиянии фактора пола на морфометрические показатели ядер переднего отдела МК.

Таблица 1

Удельная площадь ядер переднего отдела МК крыс WAG/Rij (%%)

Область МК		Самцы	Самки	p
Ростральный уровень	COa	9,95±0,34	9,06±0,32	≤0,01
	AAA	7,42±0,60	8,12±0,32	≤0,05
	CE	4,11±0,32	4,22±0,12	≥0,05
Кaudальный уровень	COa	15,28±0,43	14,77±0,23	≤0,05
	CE	6,20±0,33	6,45±0,55	≥0,05

Анализируя влияние гендерной принадлежности на количество нейронов и клеток глии, учитывались и параметры их количественного соотношения. Количество нейронов в густоклеточной зоне переднего кортикального ядра у самцов крыс оказалось достоверно больше, чем у самок (15,72±0,18 и 13,62±0,15 соответственно). Количественные показатели в передней амигдаларной области отражают также достоверно значимо большее количество нейронов (самцы 11,22±0,22; самки 11,10±0,12) и клеток глии (самцы 20,82±0,25; самки 20,04±0,16), в том числе, и сателлитной (самцы 3,28±0,34; самки 2,04±0,13) у самцов крыс. В центральном ядре переднего отдела МК распределение клеток аналогично и говорит о большем количестве нейронов (11,54±0,34), клеток глии (21,18±0,25) и сателлитной глии (2,66±0,37) у самцов крыс, по сравнению с самками (нейроны 11,11±0,14, клетки глии 20,86±0,15, сателлитная глия 2,30±0,17, нейроно – глиальный индекс 2,10±0,02) (табл.2).

Таблица 2

Нейроно-глиальное соотношение ядер переднего отдела МК

Ядро	Клетки	Самцы	Самки	p
COa (густоклеточ)	Нейроны	15,72±0,18	13,62±0,15	≤0,01
	Клетки глии	20,34±0,21	20,86±0,18	≥0,05
	Сателлитная глия	3,60±0,33	2,26±0,19	≤0,05
	Нейроно-глиальный индекс	1,55±0,04	1,71±0,02	≤0,05
AAA	Нейроны	11,22±0,22	11,10±0,12	≥0,05
	Клетки глии	20,82±0,25	20,04±0,16	≥0,05
	Сателлитная глия	3,28±0,34	2,04±0,13	≤0,05
	Нейроно-глиальный индекс	2,19±0,06	2,00±0,01	≤0,01
CE	Нейроны	11,54±0,34	11,11±0,14	≥0,05
	Клетки глии	21,18±0,25	20,86±0,15	≥0,05
	Сателлитная глия	2,66±0,37	2,30±0,17	≥0,05
	Нейроно-глиальный индекс	2,57±0,40	2,10±0,02	≥0,05

### **Обсуждение результатов**

Полученные результаты по удельным площадям изученных структур МК количественного соотношения нейронов и клеток глии свидетельствуют о влиянии фактора пола на структуру передней амигдаларной области, переднего кортикального и центрального ядер самцов и самок крыс. Удельная площадь СОа на роstralном и каудальном уровнях самцов крыс достоверно больше, по сравнению с самками, тогда как в ААА и СЕ удельная площадь больше у самок.

Расчет нейрно-глиального индекса в исследуемых ядрах переднего отдела МК мозга крыс линии WAG/Rij также выявил различия: количество нейронов и клеток глии в передней амигдаларной области, переднем кортикальном и центральном ядрах больше у самцов крыс по сравнению с самками.

Таким образом, нами выявлены различия по удельным площадям и нейроглиальным соотношениям в структурах МК мозга, относящихся к репродуктивным центрам амигдалы с учетом факторы пола.

### **Список литературы.**

1. Акмаев И. Г., Калимуллина Л. Б. Миндалевидный комплекс: функциональная морфология и нейроэндокринология. – М.: Наука, 1993. – 270 с.
2. Häfner H. Gender differences in schizophrenia. Psychoneuroendocrinology. 2003;28 2:17–54.
3. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Archives of General Psychiatry. 2005;62(6):593–602.
4. Savic I, Garcia-Falgueras A., Swaab D. F. Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation. Prog. Brain. Res. 2010; 186:41-62.
5. Wallentin M. Putative sex differences in verbal abilities and language cortex: a critical review. Brain Lang. 2009;108:175–183.
6. Whittle S, Yucel M, Yap MB, Allen NB. Sex differences in the neural correlates of emotion: Evidence from neuroimaging. Biol Psychol. 2011;87:319–333.
7. Yokosuka M., Okamura H., Hayashi. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor – alpha immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon and the amygdala in the rat. // J. Comp. Neurol. 1997. Vol. 389. - № 3. P. 81 – 93.

*©И.Р. Гарипова, 2015*

## **ЗАКОНОМЕРНОСТИ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ РЕТРОСПЛЕНИЯЛЬНОЙ КОРЫ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ НАВЫКОВ**

**Полякова З.А.<sup>1</sup>, Сварник О.Е.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (Государственный университет),

<sup>1,2</sup>НИЦ «Курчатовский институт» НБИКС-центр,  
Москва, polyakovaza@gmail.com

### **Введение**

В последнее время в литературе обращается внимание на то, что формирование нового поведения происходит не с «чистого листа», и что такое формирование необходимым образом затрагивает уже существующий, ранее приобретенный опыт (McKenzie, Eichenbaum, 2011). Таким образом, можно говорить о том, что реактивация ранее приобретенного опыта может являться необходимым условием процесса обучения, не зависимо от того, проявляется ли такая реактивация в поведении как таковом. Реактивация предыдущего опыта, таким образом, может лежать в основе механизма детекции новизны.

Известно, что гиппокамп играет важную роль в механизме выявления новизны, основанном на сопоставлении прошлого и настоящего опыта (Kumaran, Maguire, 2007). Было неоднократно продемонстрировано в исследованиях с визуализацией мозга человека, что в ходе воспроизведения недавних воспоминаний активность структур гиппокампа увеличивается, а активность областей коры головного мозга уменьшается по сравнению с ситуацией воспоминания давних событий (e.g. Smith, Squire, 2009; Furman et al., 2012; Preston, Eichenbaum, 2013). Аналогичные данные были получены в экспериментах с животными (e.g. Bontempi et al., 1999). В то же время, существуют данные свидетельствующие о том, что области коры головного мозга и гиппокамп коактивированы в процессе формирования памяти (e.g. D'Esposito et al., 2000; Lesburgueres et al., 2011; Tse et al., 2011).

В то же время было показано, что активация ретросплениальной коры также связана с детекцией рассогласования (Reagh et al., 2014). Кроме того, известно, что ретросплениальная кора играет ключевую роль в пространственной ориентации, контекстуальной и эпизодической памяти (Miller et al., 2014). Ретросплениальная кора, взаимодействуя с гиппокампом, задействована в процессах приобретения и консолидации долговременной памяти (Morris, 2006). Можно предположить, что

активность нейронов ретроспленальной коры модулируется в ходе ситуации рассогласования при освоении новых навыков. Ранее было показано, что в ретроспленальной коре обнаруживается большая доля нейронов, специализированных относительно пищевого инструментального поведения (Svarnik et al., 2005; Svarnik et al., 2013). Для установления вклада специфичных для данного поведения нейронов ретроспленальной коры крыс в процесс приобретения нового навыка, мы анализировали нейронную активность в процессах последовательных формирований новых инструментальных навыков.

### **Материалы и методы**

Все проведенные исследования проходили одобрение Локального этического комитета по вопросам биомедицинских исследований Национального исследовательского центра "Курчатовский институт". Были приняты меры по сведению к минимуму числа используемых животных.

В исследовании использовались крысы (самки 6-9 месяцев) Long-Evans. В домашних клетках вивария был установлен 12-часовой световой цикл. Крысы были размещены попарно в клетках до начала обучения и в индивидуальных клетках во время проведения эксперимента. С момента начала обучения животные находились на пищевой депривации: масса поддерживалась на уровне 85% от первоначального веса. Вода находилась в свободном доступе.

Обучение проводилось в клетке инструментального поведения (MedAssociates, USA), оборудованной двумя педалями и кормушкой, расположенной на противоположной от педалей стенке. Клетка была оснащена видеокамерой (Plexon, USA), закрепленной на верхней панели.

Обучение было начато после реабилитационного периода через одну неделю после операции. Каждую крысу по отдельности переносили из ее домашней клетки в экспериментальную комнату, где была расположена камера инструментального обучения. По окончании каждой сессии крыс возвращали в домашние клетки. Для каждого животного до начала обучения проводилась одна сессия привыкания к инструментальной клетке. В ходе этой сессии пищевые таблетки (45 mg, Dustless Precision Pellets, TSE System, Germany) находились в кормушке в свободном доступе. Длительность каждой сессии составляла 30 мин. Обучение крыс происходило поэтапно (экспериментатором подкреплялось поведение, соответствующее данному этапу, с помощью пульта дистанционного управления системы подачи пищевых таблеток) с конечной целью – нажатие на педаль для получения пищевой награды (рис. 1). Таким образом, регистрация нейронной активности производилась как в успешных, подкрепляемых актах, так и в неуспешных.

Видеорегистрация поведения животного проводилась в течение каждой сессии с начала обучения при помощи программного пакета CinePlex (Plexon, США). Анализ данных проводился с использованием CinePlex Editor (Plexon, USA). При оценке поведения животного в ходе каждой сессии мы выделяли начало и конец следующих поведенческих актов: подход к педалям, нажатие на правую/левую педаль, подход к кормушке, захват пищевой таблетки, стойки, груминг.

Имплантация микроэлектродов проводилась под общей анестезией до начала обучения. В качестве общего анестетика при проведении эксперимента мы использовали золетил 100 (50 мг/1 кг), разведенный в NaCl 0,9% (0,2 мл) с рометаром 2% (0,45 мл/1 кг). В ходе операции по имплантации электродов осуществлялось поддержание постоянной температуры тела ( $37^{\circ}\text{C} \div 38^{\circ}\text{C}$ ) наркотизированного животного. Винт из нержавеющей стали, который служил дополнительной опорой при закреплении базы с электродами, вкручивался в череп. Далее производилось отверстие диаметром 1,5 мм с помощью бормашины и удалялась твердая оболочка мозга. Трепанационное отверстие заполнялось вазелином. База с микродрайвером устанавливалась в области ретроспленальной коры (P 4,5; L 1,0) и фиксировалась зубным цементирующим раствором (Stoetling) (рис. 2А,Б).

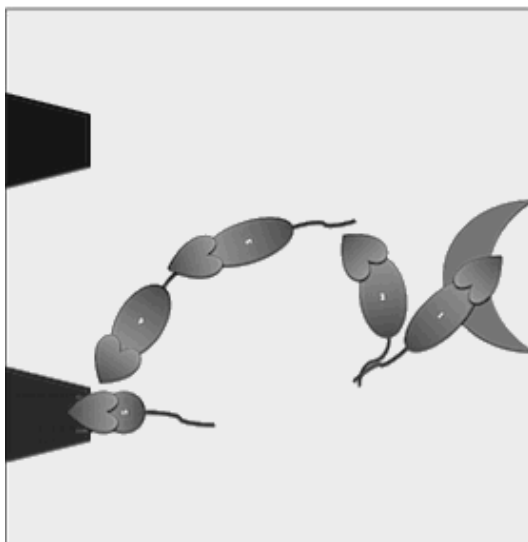


Рис. 1. Этапы обучения в инструментальной клетке: 1 - нахождение рядом с кормушкой; 2 - отворот от кормушки; 3 - выход в середину клетки; 4 - подход к левой педали; 5 - нажатие на левую педаль.

Крысам были хронически имплантированы 16 платино-иридиевых электродов ( $d=15$  мкм), закрепленных в единый микродрайвер (Korav, Hungary), позволяющий варьировать глубину их введения. Было осуществлено общее заземление для системы электродов и электрический сигнал дифференцированно фильтровался для получения активности единичных нейронов ( $154 \text{ Hz} \div 8.8 \text{ kHz}$ ). Амплифицированный сигнал с каждого электрода оцифровывался ( $40 \text{ kHz}$ ) и обрабатывался с помощью многоканальной установки MAP (Plexon, USA). Единичные нейроны (рис. 2B) выделялись с использованием программного пакета Offline Sorter (Plexon, USA) в процессе визуализации комбинаций паттернов потенциалов действия на основании их свойств (метод главных компонент). Правильность сортировки единичных нейронов верифицировалась при построении гистограмм распределения межспайковых интервалов, которые при верном разделении не содержали последовательных потенциалов действия в течение рефрактерного периода 2 мс. Времена потенциалов действия единичных нейронов и выделенных поведенческих актов импортировались для дальнейшего анализа в программу NeuroExplorer (Plexon, USA).

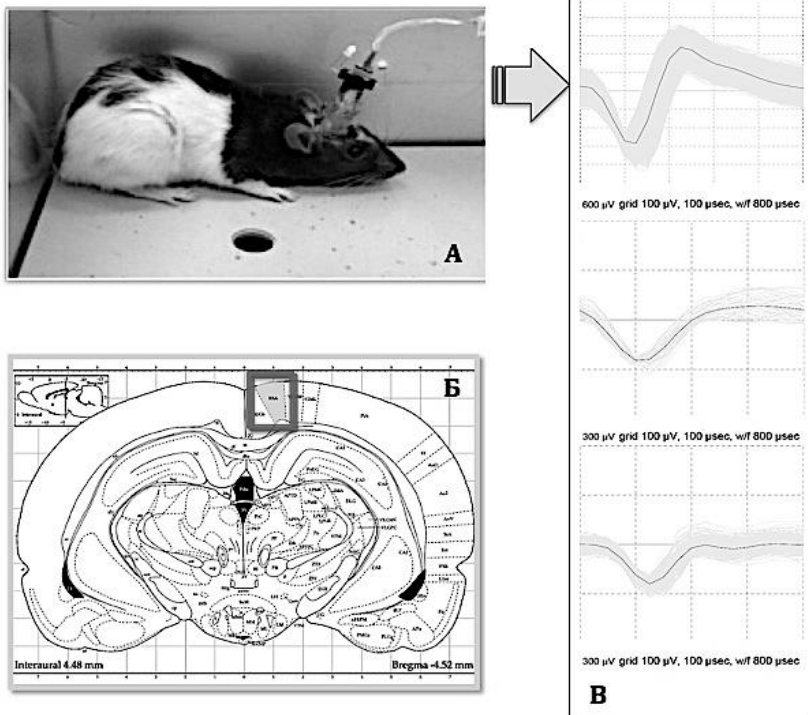


Рис. 2. Хроническая регистрация импульсной нейронной активности у свободноподвижных крыс в пищедобывательном поведении. (А) Крыса с хронически имплантированными электродами. (Б) Ретросплениальная кора (RSA) головного мозга крысы (P 4,5; L1,0) – область хронической имплантации электродов. (В) Характерные формы потенциалов действия нейронов.

Анализ нейронной активности в поведенческих актах был основан на интервальных гистограммах (с нулем между двумя референтными точками и ценой деления 50 мс), построенных относительно выделенных событий в клетке инструментального обучения. Нейрон классифицировался нами как специфичный, если было зарегистрировано превышение его активности в одном из выделенных актов более чем на 50% относительно средней частоты данного нейрона на всем протяжении периода его регистрации. Статистический анализ проводили в программе Statistica 7.0. Различие считалось достоверным при  $P \leq 0,05$ , т.е. в тех случаях, когда вероятность различия составляла больше 95%.

## Результаты

### *Анализ нейронной активности при реализации нового пищедобывательного навыка - подход к левой педали*

В анализ вошли дни, в которые крысы ( $n=4$ ) выполняли подходы к левой педали и находились на стадии перехода на новый этап обучения – нажатие на левую педаль для получения пищи. В этом периоде обучения экспериментатором частично (30%÷40%) подкреплялись правильно выполненные подходы к левой педали с целью мотивации крысы к поиску успешного поведения.

Сравнительный анализ частоты нейронной активности был проведен в ходе выполнения животными действий с подкреплением и без подкрепления. Действие с подкреплением – движение от левой педали к кормушке с наградой. Действия без подкрепления включают в себя проверку кормушки без пищи при движении от левой педали и проверку кормушки без пищи с произвольного места экспериментальной клетки (рис. 3).

При реализации пищедобывательного поведения, заключающегося в подходе к левой педали, было зарегистрировано 43 нейрона, у 81% из которых выявлены специфические активации. Обнаружено 45% нейронов, демонстрирующих различия нейронной активности в ранее классифицированных действиях (рис. 3) с достоверным повышением активности в актах движения от левой педали к кормушке с наградой при сопоставлении со случаями движения к кормушке без награды, а так же достоверное повышение активности при движении от левой педали к кормушке без награды в сравнении с проверкой кормушки с произвольного места (рис. 4). Из этих нейронов два активировались только в случае движения к кормушке с наградой. В вышеописанную группу вошли нейроны специфически активные относительно пищедобывательных актов в инструментальной клетке (рис. 5) и нейроны без сформированной специфичности (рис. 6,7), которые характеризовались наличием таких же закономерностей, но не удовлетворявшие критерию специфичности. Так же были обнаружены две группы нейронов, составляющие по 12% от общего числа зарегистрированных нейронов: с достоверным повышением в акте III (рис. 3,8), в данную группу вошли нейроны без сформированной специфичности; с пониженной активностью в акте II (рис. 3,9) - группе, в которой наблюдались как нейроны без сформированной специфичности, так и специфически активные относительно кормушки (рис. 10). Были обнаружены также три неспецифических нейрона с повышенной активностью в акте II (рис. 3), и один - активный в случаях без награды. Группа нейронов составляющая 19% не проявляла специфических

активаций, для нее было характерно отсутствие различий в частоте нейронной активности в трех обозначенных актах. Таким образом, было установлено, что наличие или отсутствие награды модулирует изменения нейронной активности и ее специфичности.

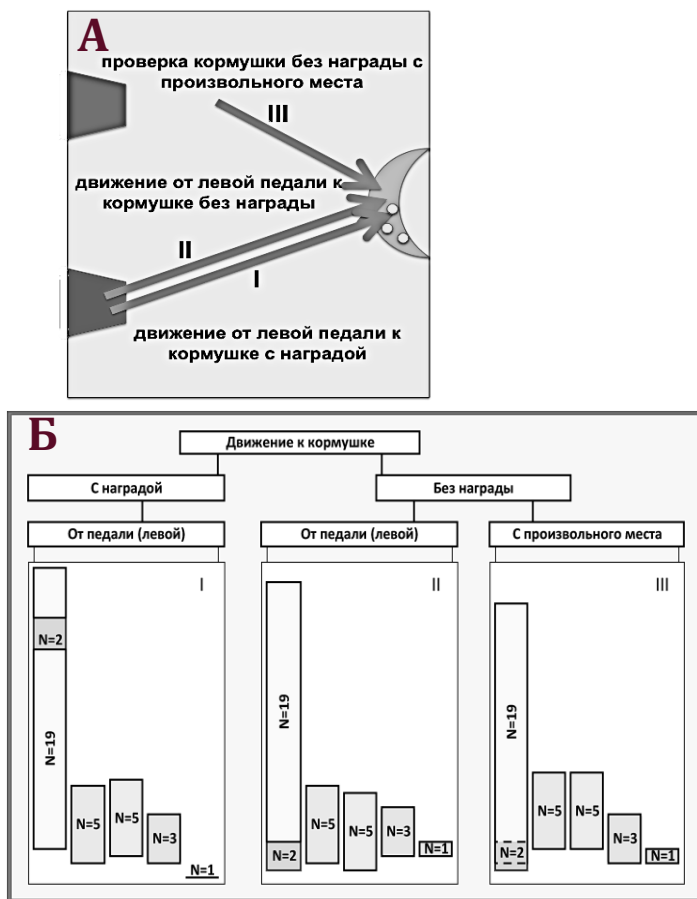


Рис. 3. Классификация подходов к кормушке (А) и распределение специфических нейронов в группы относительно трех случаев подходов к кормушке (Б): I. движение от левой педали к кормушке с наградой; II. движение от левой педали к кормушке без награды; III. движение с произвольного места к кормушке без награды. N – обозначение количества нейронов. N=2 – частный случай в группе. Распределение по высоте столбцов эквивалентно увеличению частоты нейронной

активности относительно средней частоты нейронной активности по каждому нейрону.

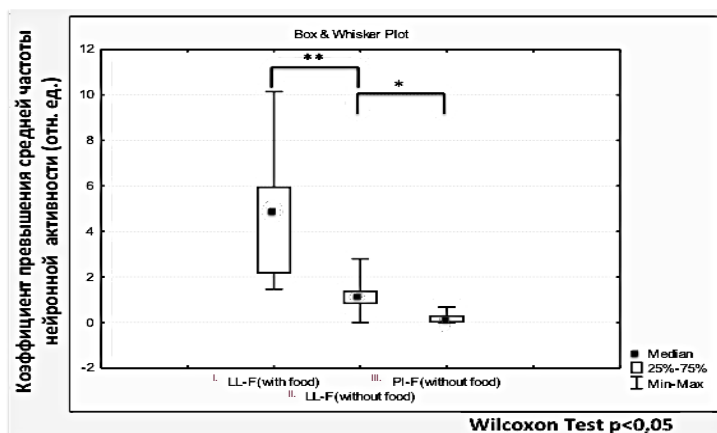


Рис. 4. Группа нейронов с повышенной активностью в случае движения от левой педали (N=21)

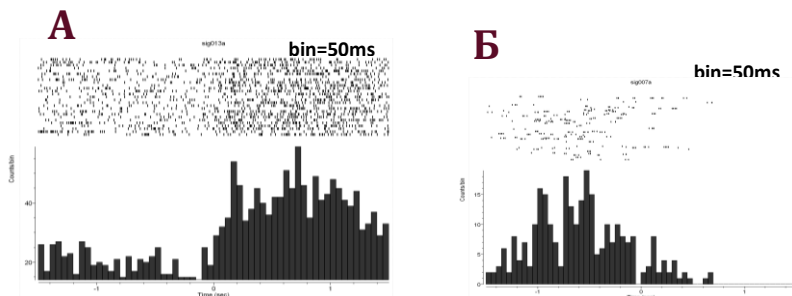


Рис. 5. Нейроны специфически активные относительно: кормушки (А); левой педали (Б). 0-начало действия.

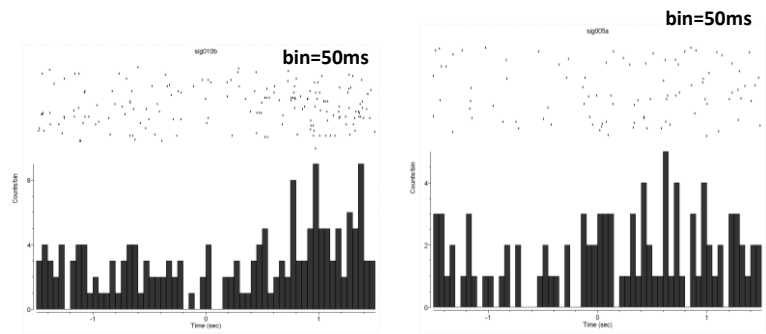


Рис. 6. Пример активности нейронов без сформированной специфичности



Рис. 7. Представленность нейронов в группе - повышенная активность в случае движения от левой педали

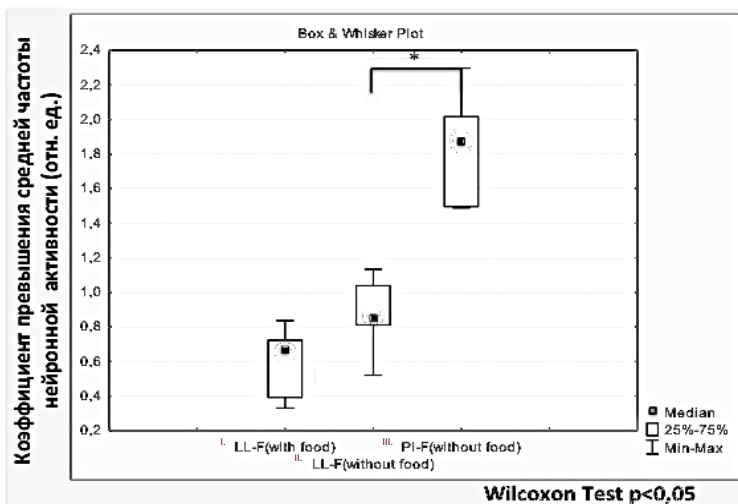


Рис. 8. Группа нейронов с повышенной активностью в случае проверок кормушки без награды (N=5)

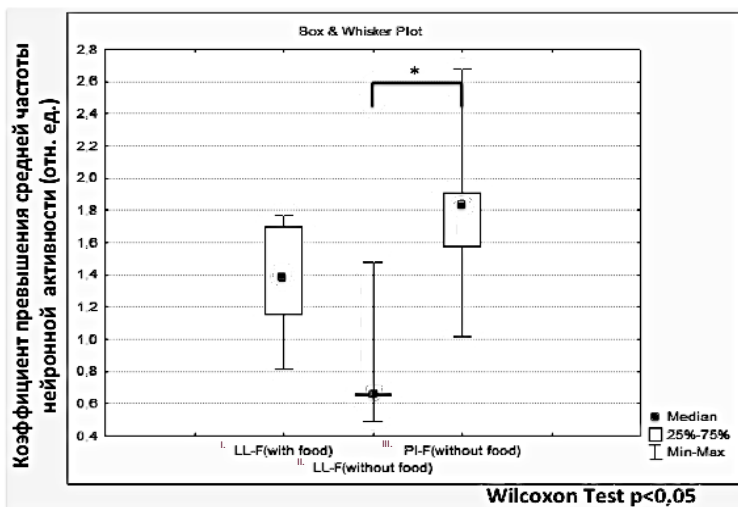


Рис. 9. Группа нейронов демонстрирующая снижение активности в случае движения от левой педали к кормушке без награды (N=5)

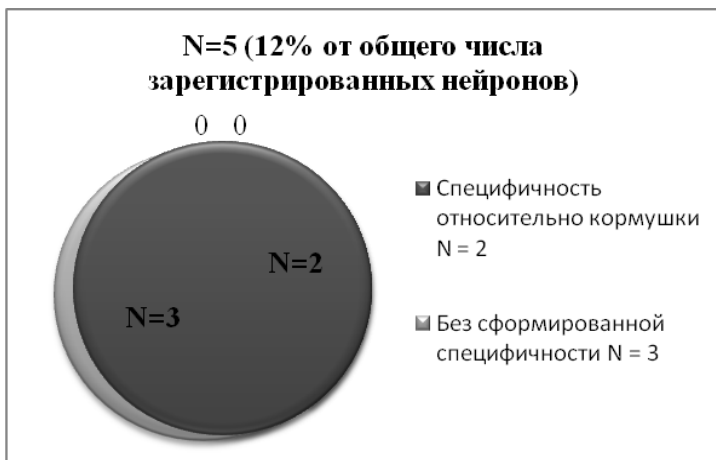


Рис.10. Представленность нейронов в группе – снижение активности в случае движения от левой педали к кормушке без награды

*Анализ нейронной активности при формировании и реализации нового пищеводобывательного навыка – нажатие на левую педаль*

В анализ вошел весь период регистрации последней экспериментальной сессии, в которой крыса (n=1) научилась нажимать на левую педаль для получения пищевой таблетки, а также предваряющие это обучение сессии в открытом поле без корма и с кормом, т.е. в пищевом поведении. Все сессии проводились друг за другом в течение одного дня в следующей последовательности: 1) в открытом поле без корма, 2) в открытом поле при пищевом поведении, 3) в клетке с педалями и кормушкой при инструментальном пищевом обучении.

Всего одновременно было зарегистрировано 13 нейронов на 6 каналах. Были определены семь нейронов проявлявших свою активность во всех трех сессиях; два – только в одной из сессий. Установлено, что четыре нейрона активировались только в сессиях с предъявлением корма.

Процент нейронов, демонстрирующих повышение активности в поведенческих актах, связанных с пищевым навыком в инструментальной клетке, оказался равен 54%. Большая часть этих нейронов, связанных с пищевым поведением в инструментальной клетке, как оказалось, имела более высокую общую частоту активности в течение всего поведения в открытом поле до появления пищи (первая сессия регистрации в последний день), чем после появления пищи (или чем общая активность во время сессии инструментального обучения). Согласно этим данным можно сделать вывод о том, что специализированные относительно

пищевого поведения нейроны в ситуации рассогласования имеют более высокую частоту активации, чем в пищевом поведении без рассогласования (табл. 1).

Был проведен сравнительный анализ активности нейрона относительно актов пищевого поведения и груминга (рис. 11; табл. 2). Эти результаты подтверждают наличие повышенной нейронной активности в актах связанных с пищевым поведением.

Обозначение нейрона	Открытое поле	Открытое поле с едой	Инструментальное поле
	Средняя частота		
006a	0,291471	0,302764	0,183141
010d	0,191538	0,119775	0,107831

Табл. 1. Сопоставление общей активности нейронов, которые специфически специализированы в ситуации рассогласования в 3-х сессиях: в открытом поле, в открытом поле с едой и в инструментальной клетке. Средняя частота (Counts/Bin); Bin=0,025ms.

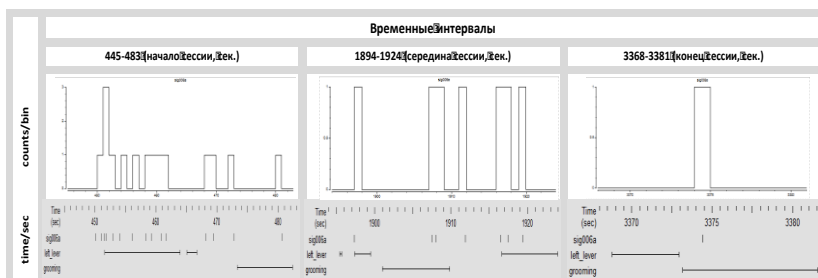


Рис. 11. Сравнительный анализ динамики активности нейрона 006a в сменяющих друг друга действиях - подход с нажатием на левую педаль и груминг, в трех этапах сессии (начало, середина, конец). Bin=1s; x-Time(sec); y-Counts/Bin.

Было установлено, что ни у одного из зарегистрированных нейронов «пищевого поведения» не наблюдалось 100% вовлечения в тот «свой» поведенческий акт, в котором наблюдалась его специфическая активация (табл. 3). Здесь и далее под «своим» актом мы подразумеваем акт, в котором у соответствующего нейрона присутствуют специфические активации. Так же мы не наблюдали активаций «кормушечных» нейронов во всех случаях выполнения подходов к кормушке, хотя это поведение было многократно повторяемо на протяжении 15 сессий (табл. 3А). Было

обнаружено, что процент активаций в «своём» акте снижался почти в два раза во второй части инструментальной сессии (по сравнению с первой частью) у части нейронов, однако для большей части нейронов с течением хода формирования навыка было характерно отсутствие изменений вовлеченности в «свой» акт (рис. 12; рис. 11).

Нейрон 006а	Инструментальная клетка		
	Начало сессии	Середина сессии	Конец сессии
	Средняя частота		
Груминг	0,100	0,111	0,111
Подход к кормушке	0,233	0,110	0,098
Подход к левой педали	0,426	0,174	0,061

Табл. 2. Средняя частота активности нейрона в инструментальной клетке в трех периодах сессии (начало, середина, конец) относительно актов не пищевого (груминг) и пищедобывательного (подход к кормушке, подход к левой педали) поведения. Средняя частота (Counts/Bin); Bin=0,025ms.

<b>А</b>				
Обозначение нейрона	% активаций в периоде, секунды			
	0-1000	1001-2000	2001-3000	3001-4090
3а	50	68	39	46
5а	73	77	91	77
10b	44	66	52	38
10с	34	41	48	15
10d	45	55	65	46
10е	35	57	35	38

<b>Б</b>				
Обозначение нейрона	% активаций в периоде, секунды			
	0-1000	1001-2000	2001-3000	3001-4090
5а	68	64	63	67
6а	79	78	63	67
10d	68	53	37	67

Табл. 3. Вовлеченность специализированных нейронов в поведенческие акты: (А) акт, связанный с кормушкой; (Б) акт, связанный с левой pedalью.

Таким образом, было установлено, что в ситуации рассогласования (сессия без пищи в открытом поле или начало нового обучения в инструментальной клетке) общая активность нейронов повышается, что может являться отражением увеличения variability активности нейронов для последующего их отбора и вхождения в новые группы, специфически связанные с данным поведением. Стабилизация поведения с течением сессии инструментального обучения сопровождалась снижением процента случаев активации у части нейронов. Увеличения процента случаев активации нейронов в «своих» актах с течением обучения не наблюдалось.

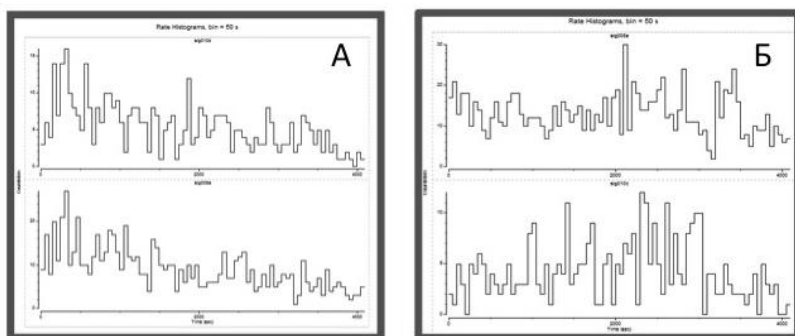


Рис. 12. Активность нейронов в сессии, проходящей в инструментальной клетке: (А) нейроны снижающие среднюю частоту активности с течением сессии; (Б) нейроны с переменной частотой активности на протяжении сессии. Bin=50s; x – Time (sec); y – Counts/Bin.

*Анализ поведения и выявление поведенческих закономерностей при формировании и реализации нового пищедобывательного навыка у крыс*

В поведенческий анализ вошли две группы крыс (рис. 13): одна из которых была обучена нажатию только на левую педаль (n=4), другая - после обучения на левую педаль и закрепления приобретенного навыка, была переучена нажатию на правую педаль (n=7).

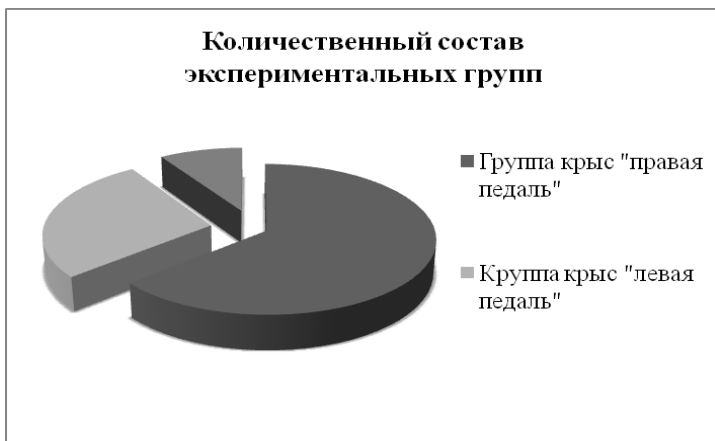


Рис. 13. Группы экспериментальных животных.

При переучивании на правую педаль число нажатий на эту эффективную педаль росло с течением сессии (рис. 14), что отражало процесс обучения. При этом наблюдалось достоверное увеличение числа нажатий на педаль при сопоставлении периодов 5-10 и 10-15 мин. (Вилкоксон,  $Z=2,04$ ;  $p=0,04$ ).

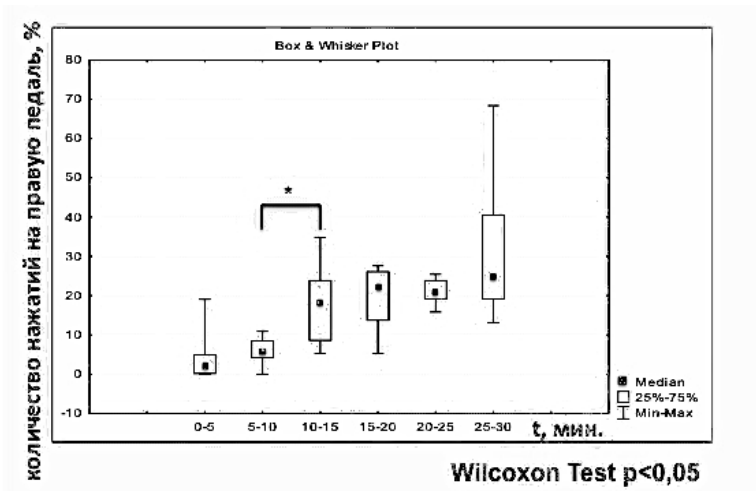


Рис. 14. Процесс переобучения нажатию на правую педаль, сопровождающийся увеличением количества нажатий на эффективную педаль.

Также было установлено, что при переучивании животные продолжали нажимать на неэффективную педаль (левую), причем достоверных отличий в числе таких нажатий не наблюдалось при сопоставлении этапов 0-5, 5-10, 10-15 мин (рис. 15). В последнем периоде сессии 25-30 мин. нажатия на левую педаль также присутствуют. Эти факты подтверждают реактивацию приобретенного прошлого опыта.

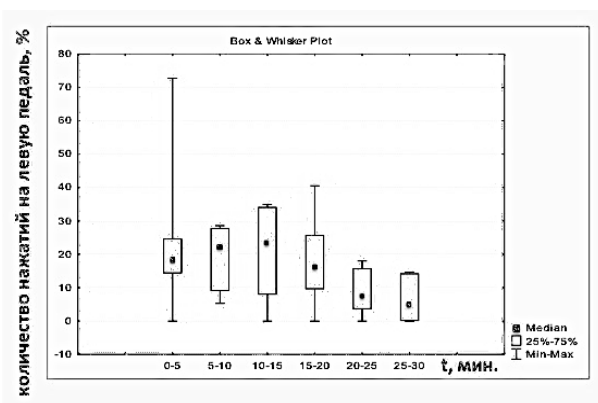


Рис. 15. Реактивация прошлого опыта. Ошибочные нажатия на неэффективную педаль при переобучении.

При сопоставлении усредненных данных, можно выделить период 10-15 мин., который соответствует некоему переломному моменту в ходе сессии. Начиная с этого этапа, крысы все чаще нажимают на правую педаль, и одновременно с этим начинается уменьшение количества ошибочных нажатий.

Анализ распределения числа подходов к кормушке при переучивании нажатия на правую педаль показал достоверное увеличение числа подходов в период 5-10 мин. по сравнению с периодом 0-5 мин. и 10-15 мин. (Вилкоксон,  $Z=2,267$ ;  $p=0,023$ ). Данная тенденция наблюдается и по-отдельности для каждого животного, без исключения (рис. 16). Такое характерное увеличение проверок кормушки максимально связано с реактивацией прошлого опыта.

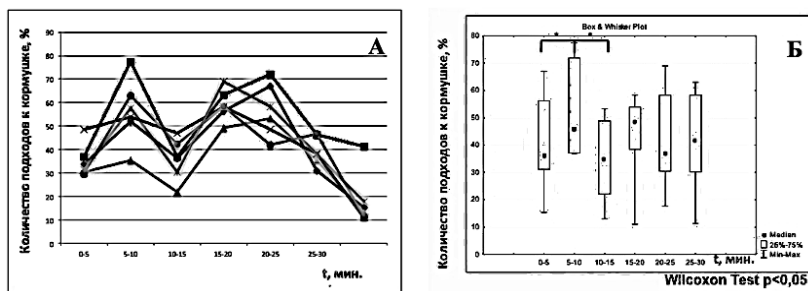


Рис. 16. Распределение числа подходов к кормушке при переобучении нажатия на правую педаль: (А) для каждого животного в отдельности; (Б) статистически усредненные данные по всем животным.

Аналогичная зависимость в распределении числа подходов к кормушке в течение сессии наблюдалась и при обучении животных нажатия на левую педаль.

*Общие закономерности в поведении и нейронной активности при формировании и реализации нового пищедобывательного навыка у крыс*

На завершающем этапе нашего исследования была предпринята попытка охарактеризовать этапы формирования пищевого навыка и сопоставить изменения поведения с развитием нейронной активности.

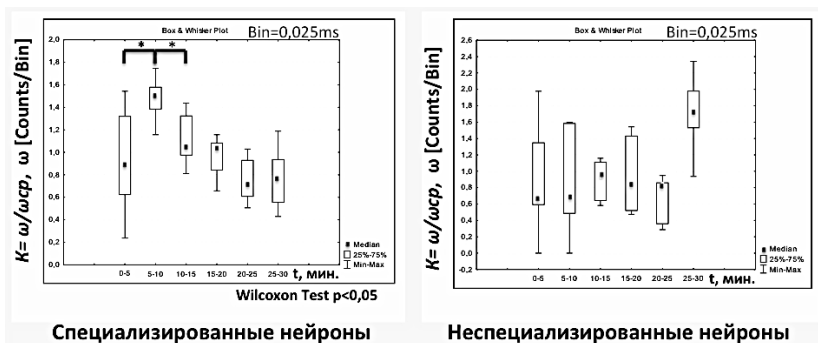


Рис. 17. Распределение частоты нейронной активности в ходе сессии формирования нового пищедобывательного инструментального навыка.

Согласно анализу поведения период с 5 по 10 минуту характеризуется максимальной выраженностью демонстрации животными ранее сформированного поведения. И именно этот период характеризуется достоверным (Вилкоксон,  $Z=2,041$ ;  $p=0,041$ ) увеличением частоты нейронной активности (по сравнению с предыдущим и последующим периодом), причем только у нейронов «пищевого поведения» (рис. 17).

### Выводы/обсуждение

Таким образом, в данных экспериментах было установлено следующее. Формирование нового поведения сопровождается реактивацией прошлого опыта, что выражается в выполнении актов ранее эффективного поведения. Периоды максимальной реактивации прошлого опыта коррелируют с максимальным увеличением частоты активности нейронов, специфических по отношению к пищевому поведению. Активность нейронов пищевого поведения модулируется наличием/отсутствием пищевого подкрепления.

В разнообразных видах поведения у разных животных было неоднократно продемонстрировано существование специфической активации нейронов, т.е. активаций, характерных только для определенных поведенческих актов. В настоящее время обнаружены нейроны, специализированные относительно самых разнообразных поведенческих актов: актов использования определенных слов (Heit et al., 1988) и восприятия определенных персонажей (Quian Quiroga et al., 2005; Gelbard-Sagiv et al., 2008) у людей, актов "социального контакта" с определенными особями в стаде у обезьян (Perrett et al., 1996), актов инструментального поведения у кроликов (Александров и др., 1997),

актов ухода за новорожденными ягнятам у овец (Kendrick et al., 1992), актов реализации концепта «гнезда» (Lin., 2007) и т.д. Известно, что выполнение пищедобывательного инструментального навыка у крыс обеспечивается активностью нейронов, специализированных относительно актов данного поведения, таких, например, как, нейроны подхода к педали, нейроны нажатия на педаль, нейроны подхода к кормушки, нейроны захвата пищи и др. (Gavrilov et al., 2002). Однако, гораздо меньше известно, каким образом формируется такая специфическая активация.

При проведении регистрации нейронной активности на этапе автоматизированного поведения обнаруживается, что процент нейронов вовлекаемых в выполнение выученных актов составляет в среднем пятьдесят процентов от числа зарегистрированных нейронов (Tyler et al., 2012; Ward et al., 2012). В ходе нашего исследования установлено, что при формировании нового пищедобывательного навыка задействован больший процент нейронов изменяющих частоту активаций. Данная закономерность появления большой группы нейронов связанных с вырабатываемым поведением на каждом этапе обучения была выявлена ранее в лимбической коре кроликов (Горкин, 1987). Также было показано, что при формировании нового поведения наблюдается увеличение числа нейронов, активность которых повышается в результате подкрепления в инструментальном обучении (Yu et al., 2012).

В современной литературе неоднократно показано, что специфический нейрон дает спайки с высокой частотой и надежностью. В автоматизированном поведении можно говорить о существовании специализации нейрона, которая проявляется в 100% случаев выполнения того или иного поведенческого акта. В то же время при непосредственном формировании новых актов, чередующихся с выполнением неэффективного, ранее выученного поведения и пробами нового, наблюдается изменение нейронной активности по времени ее активации и частоте (Yu et al., 2012; Arduin et al., 2013; McKenzie et al., 2013). Можно предположить, что развитие специфических активаций происходит постепенно и начинается с увеличения частоты и вариабельности активности. Схожие данные об увеличении частоты нейронной активности на начальных этапах обучения были опубликованы рядом исследователей (Churchland et al., 2006; An et al., 2012; Ladenbauer et al., 2014).

В нашем эксперименте было продемонстрировано, что в ситуации рассогласования (сессия без пищи в открытом поле или начало нового обучения в инструментальной клетке) общая активность нейронов повышается, что может являться отражением увеличения вариабельности активности нейронов для последующего их отбора и вхождения в новые

группы/сети, специфически связанные с данным поведением. А стабилизация поведения с течением сессии инструментального обучения сопровождается снижением процента случаев активации у части нейронов. В работах одних авторов было неоднократно продемонстрировано что, ситуация рассогласования сопровождается большим проявлением, более быстрым потенцированием по сравнению с начальными условиями (An et al., 2012). Другие констатируют факт повышенной вариабельности частоты активаций нейронов в начале выполнения целенаправленных действий и ее дальнейшим снижением, даже в случаях незначительного изменения средней частоты (Churchland et al., 2006; Pruszynski, Johansson, 2014).

Таким образом можно сделать вывод, что прежде чем нейронная активность выйдет на новый качественный уровень – нейронную специфичность, сопровождающуюся некоторыми характерными свойствами, объективно возникает ситуация необходимости разрешения внутреннего противоречия нейронной сети, в качестве которой и выступает ситуация рассогласования. Данная ситуация разрешения возникшего внутреннего противоречия характеризуется поиском выхода из нее посредством расшатывания, перестройки, перегруппировки системы, что влечет за собой качественные изменения характеристик ее отдельных элементов.

Нами выявлено, что определяющим фактором при формировании специфичности является наличие/отсутствие награды. Можно предположить, что неоднократное успешное повторение навыка сопровождается переходом специфической активности в нейронную специализацию.

### **Список литературы**

1. Александров Ю.И., Греченко Т.Н., Гаврилов В.В., Горкин А.Г., Шевченко Д.Г., Гринченко Ю.В., Александров И.О., Максимова Н.Е., Безденежных Б.Н., Бодунов М.В. Закономерности формирования и реализации индивидуального опыта // Журн. высш. нерв. деят. 1997. Т. 47. №2. С. 243–260.
2. Горкин А.Г. Поведенческая специализация корковых нейронов на разных стадиях обучения. В кн.: ЭЭГ и нейрональная активность в психофизиологических исследованиях. М., Наука. 1987. С. 104-115.
3. An B., Hong I., Choi S. Long-term neural correlates of reversible fear learning in the lateral amygdala // The Journal of Neuroscience. 2012. Vol. 32(47). P. 16845–16856.
4. Arduin P.J., Frégnac Y., Shulz D.E., Ego-Stengel V. “Master” neurons induced by operant conditioning in rat motor cortex during a brain-

machine interface task // *The Journal of Neuroscience*. 2013. Vol. 33(19). P. 8308–8320.

5. Bontempi B., Laurent-Demir C., Destrade C., Jaffard R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage // *Nature*. 1999. Vol. 400(6745). P. 671–675.

6. Churchland M.M., Yu B.Y., Ryu S.I., Santhanam G., Shenoy K.V. Neural variability in premotor cortex provides a signature of motor preparation // *The Journal of Neuroscience*. 2006. Vol. 26(14). P. 3697–3712.

7. D'Esposito M., Postle B.R., Rypma B. Prefrontal cortical contributions to working memory: evidence from event-related fMRI studies // *Exp Brain Res*. 2000. Vol. 133(1). P. 3–11.

8. Furman O., Mendelsohn A., Dudai Y. The episodic engram transformed: Time reduces retrieval-related brain activity but correlates it with memory accuracy // *Learn Mem*. 2012. Vol. 19(12). P. 575–587. doi: 10.1101/lm.025965.112

9. Gavrilov V., Grinchenko Y.V., Alexandrov Y.I. Do neurons in homologous cortical areas of rabbits and rats have similar behavioral specialization? // *FENS Abstr*. 2002. Vol. 1. P. A040.8

10. Gelbard-Sagiv H., Mukamel R., Harel M., Malach R., Fried I. Internally generated reactivation of single neurons in human hippocampus during free recall // *Science*. 2008. Vol. 322. №5898. P. 96–101.

11. Heit E., Billman D. Observational learning from internal feedback: a simulation of an adaptive learning method // *Cognitive Science*. 1988. Vol. 12(4). P. 587–625.

12. Kendrick K.M., Levy F., Keverne E.B. Changes in the sensory processing of olfactory signals induced by birth in sheep // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 833–836.

13. Kumaran D., Maguire E.A. Match mismatch processes underlie human hippocampal responses to associative novelty // *J Neurosci*. 2007. Vol. 27(32). P. 8517–8524.

14. Ladenbauer J., Augustin M., Obermayer K. How adaptation currents change threshold, gain, and variability of neuronal spiking // *Journal of Neurophysiology*. 2014. Vol. 111(5). P. 939–953. doi: 10.1152/jn.00586.2013

15. Lesburguères E., Gobbo O.L., Alaux-Cantin S., Hambucken A., Trifilieff P., Bontempi B. Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory // *Science*. 2011. Vol. 331(6019). P. 924–928. doi: 10.1126/science.1196164

16. Lin L., Chen G., Kuang H., Wang D., Tsien J.Z. Neural encoding of the concept of nest in the mouse brain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104. P. 6066–6071.

17. McKenzie., Robinson N.T.M., Herrera L., Churchill J.C., Eichenbaum H. Learning causes reorganization of neuronal firing patterns to represent related experiences within a hippocampal schema // *The Journal of Neuroscience.* 2013. Vol. 33(25). 10243–10256.

18. McKenzie S., Eichenbaum H. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? // *Neuron.* 2011. Vol. 71(2). P. 224-233. doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.037

19. Miller A.M.P., Vedder L.C., Matthew L., Smith D.M. Cues, context, and long-term memory: the role of the retrosplenial cortex in spatial cognition // *Front Hum Neurosci.* 2014. Vol. 8. P. 1-15. doi: 10.3389/fnhum.2014.00586

20. Morris R.G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas // *Eur J Neurosci.* 2006. Vol. 23(11). P. 2829-2846.

21. Perrett D.I., Oram M.W., Lorincz E., Emery N.E., Baker C. Monitoring social signals arising from the face: studies of brain cells and behaviour // 8th world congress of IOP. 1996. P. 201.

22. Preston A.R., Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory // *Curr Biol.* 2013. Vol. 23(17). P. R764-R773. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.041

23. Pruszynski J.A., Johansson R.S. Edge-orientation processing in first-order tactile neurons // *Nature Neuroscience.* 2014. Vol. 17. P. 1404-1409. doi: 10.1038/nn.3804

24. Quiroga R.Q., Reddy L., Kreiman G., Koch C., Fried I. Invariant visual representation by single neurons in the human brain // *Nature.* 2005. Vol. 435. №7045. P. 1102-1107.

25. Reagh Z.M., Watabe J., Ly M., Murray E., Yassa M.A. Dissociated signals in human dentate gyrus and CA3 predict different facets of recognition memory // *J Neurosci.* 2014. Vol. 34(40). P. 13301-13313. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2779-14.2014

26. Smith C.N., Squire L.R. Medial temporal lobe activity during retrieval of semantic memory is related to the age of the memory // *J Neurosci.* 2009. Vol. 29(4). P. 930-938. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4545-08.2009

27. Svarnik O.E., Alexandrov Y.I., Gavrillov V.V., Grinchenko Y.V., Anokhin K.V. Fos expression and task-related neuronal activity in rat cerebral cortex after instrumental learning // *Neuroscience.* 2005. Vol. 136(1). P. 33-42.

28. Svarnik O.E., Bulava A.I., Alexandrov Y.I. Expression of c-Fos in the rat retrosplenial cortex during instrumental re-learning of appetitive bar-pressing depends on the number of stages of previous training // *Front Behav Neurosci.* 2013 Vol. 7. P. 78. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00078

29. Tse D., Takeuchi T., Kakeyama M., Kajii Y., Okuno H., Tohyama C., Bito H., Morris R.G. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex // *Science.* 2011. Vol. 333(6044). P. 891-895. doi: 10.1126/science.1205274

30. Tyler A.L., Mahoney J.M., Richard G.R., Holmes G.L., Pierre-Pascal Lenck-Santini, Scott R.C. Functional network changes in hippocampal CA1 after status epilepticus predict spatial memory deficits in rats *neurobiology of disease* // *The Journal of Neuroscience.* 2012. Vol. 32(33). P. 11365–11376.

31. Ward R.L., Flores L.C., Disterhoft J.F. Infragranular barrel cortex activity is enhanced with learning // *J Neurophysiol.* 2012. №108. P.1278-1287

32. Yu C., Fan D., Lopez A., Yin H.H. Dynamic changes in single unit activity and gamma oscillations in a thalamocortical circuit during rapid instrumental learning // *PLoS One.* 2012. Vol. 7(11). P. 10. doi: 10.1371/journal.pone.0050578.

© З.А. Полякова, О.Е. Сварник, 2015

УДК 57.024

## **АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА НЕЙРЕКСИНОВ С УРОВНЕМ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ТРЕВОЖНОСТИ**

**Канзафарова Р.Ф.<sup>1</sup>, Казанцева А.В.<sup>2</sup>, Романова А.Р.<sup>1</sup>,  
Башкатов С.А.<sup>1</sup>, Галяутдинова С.И.<sup>1</sup>, Хуснутдинова Э.К.<sup>1,2</sup>.**  
<sup>1</sup>ФГБОУПО «Башкирский государственный университет», Россия, Уфа;  
*e-mail: kanzafarova.renata@yandex.ru;*

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Россия, Уфа.  
Научный руководитель: проф., д.б.н. Хуснутдинова Э.К.

Математика является важнейшим элементом современного общества. Компетентность в математике обеспечивает более высокий доход, чем логическое мышление или количество лет, проведенных в школе, и открывает множество карьерных возможностей не только в

технических сферах, но также в бизнесе и социальных науках. Однако многие люди намеренно избегают выбора специальностей, связанных с математикой. Это отчасти может быть объяснено математической тревожностью (МТ), выражающейся в чувстве сильного беспокойства и неловкости, связанными со сложностями в манипулировании с числами, которые встречаются как в академических, так и в бытовых ситуациях. Такой негативный опыт, связанный с математикой, может привести к избеганию уроков математики и нежеланию выбирать высшее образование, включающее математические курсы (Maloneyetal., 2012). Проявление МТ впервые становится заметным в младшем школьном возрасте и развивается до 9–10 класса (Hembree, 1990). Согласно литературным данным, высокая МТ встречается у 4% студентов высшей школы, а около 85% студентов отмечают у себя умеренные ее проявления (Chin, 2009). Взрослые с высокой МТ демонстрируют меньшие способности к вычислениям, сравнению чисел и мысленному вращению 3D-объектов (Maloney, 2012). Еще больший процент населения (15-20%) имеет проблемы с обработкой числовой информации (Gross-Tsuretal., 2009). Факторы, лежащие в основе индивидуальной предрасположенности к развитию МТ, – комплексные, включающие социальные, генетические, персональные и когнитивные (Eysencketal.,1992).

Рассмотрение математической тревожности как психологического конструкта, имеющего когнитивно-аффективную природу, ставит вопрос о том, какие когнитивные системы подвержены негативным следствиям тревожности. Принято считать, что МТ оказывает негативное влияние на математические способности посредством изменения количества свободных ресурсов, такой системы как рабочей памяти (РП). Вклад РП в различные типы математических заданий составляет от 23% (дроби) до 31% (арифметические операции в уме, понимание чисел и числовые последовательности) (Nygoosetal., 2012).

Способность нейрональных связей изменяться, называется синаптической пластичностью (СП) и считается одним из механизмов памяти. СП приводит к формированию новых синаптических контактов, и ведет к изменению адгезии между пре- и пост- синаптическими нейронами. Белки кодируемые генами нейрексина 1 (*NRXN1*) и контактин-ассоциированного белка (*CNTNAP2*), вовлечены в регуляцию СП (Kandeletal., 2000). Контактин-ассоциированно-подобный белок-2 относится к семейству нейрексина - группе трансмембранных белков, обеспечивающих взаимодействие нервных клеток, их дифференцировку в коре головного мозга и экспрессию в ионных каналах, участвуя в стабилизации аксональной проводимости и поддержании потенциалов действия (Vabnicketal., 1999). Нейрексин 1 представляет собой молекулу

клеточной адгезии и является важнейшим модулятором таких нейрональных процессов как созревание и дифференцировка нейронов, а также СП (Zhangetal., 2010).

Цель данной работы заключается в оценке роли полиморфных вариантов генов *NRXN1* (*rs4971648*, *rs1045881*) и *CNTNAP2* (*rs2710102*, *rs2530310*) в формировании МТ на основе анализа как основного эффекта генов, так и межгенных и ген-средовых взаимодействий.

В исследовании приняли участие 520 психически здоровых индивидов (русских, татар, башкир, удмуртов) – студентов ВУЗов г. Уфы (ср.возраст:  $20,3 \pm 3,87$  года), не имевших по результатам опроса наследственной отягощенности по психическим заболеваниям, прошедшие оценку уровня МТ с помощью опросника MARS-E (Math Anxiety Rating Scale). ДНК выделена из периферической крови человека с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили с помощью ПЦР-ПДРФ. Статистический анализ включал линейный регрессионный анализ и гаплотипический анализ и был осуществлен с использованием программы Plinkv.1.07.

В результате линейного регрессионного и гаплотипического анализа не было выявлено ассоциации как отдельных полиморфных локусов гена *CNTNAP2*, так и гаплотипов с уровнем МТ. Однако, дальнейший анализ ген-средовых взаимодействий позволил установить, что порядок рождения индивида и общее число детей в семье оказывает модулирующий эффект на выявление ассоциации между аллелем *rs2530310\*A* в гене *CNTNAP2* и показателями по шкале МТ. В частности, лица с порядком рождения 2 ( $P = 0,021$ ) и/или воспитанные в семье с тремя и более детьми ( $P = 0,012$ ) при наличии у них аллеля *rs2530310\*A* демонстрировали сниженный уровень математической тревожности. Ранее исследования, включавшие изучение роли гена *CNTNAP2* в развитии когнитивных нарушений, продемонстрировали ассоциацию аллеля *CNTNAP2 \*C* другого полиморфного локуса *rs2710102* в гене *CNTNAP2* с риском развития специфического расстройства развития речи и аутизма (Vernes et al., 2008) и гаплотипа *C\*G\*A\*G* (на основе локусов *rs2710102*, *rs759178*, *rs17236239*, *rs2538976*) с более низким уровнем развития речи у детей в возрасте 2 года (Whitehouse et al., 2011). В результате линейного регрессионного анализа не было выявлено ассоциации отдельных полиморфных локусов *rs1045881* и *rs4971648* в гене *NRXN1* с уровнем математической тревожности.

Полученные данные свидетельствуют об участии гена контактин-ассоциированно-подобного белка-2 с МТ.

*Данная работа поддержана грантами РГНФ (13-06-00583а и 15-16-02007 а (p)).*

## Список литературы

1. Chin S. Mathematics anxiety in secondary students in England // *Dyslexia*. 2009. V. 15. № 1. P. 61–68.
2. Eysenck M.W., Calvo M.G. Anxiety and performance: The processing efficiency theory // *Cognition and Emotion*. 1992. V. 6. № 6. P. 409–434.
3. Gross-Tsur V., Manor O., Shalev R.S. Developmental dyscalculia: Prevalence and demographic features // *Dev. Med. Child Neurol*. 1996; V. 38. № 1. P.25–33.
4. Hembree R. The nature, effects, and relief of mathematics anxiety // *J. Res. Mathemat. Educat*. 1990. V. 21. № 1. P. 33–46.
5. Kandel E.R., Schwartz H. J., Thomas M. Principles of Neural Science Fourth Edition. USA: McGraw\_Hill, 2000. P. 324.
6. Maloney E.A., Beilock S.L. Math anxiety: who has it, why it develops, and how to guard against it // *Trends Cogn. Sci*. 2012. V. 16. № 8. P. 404–406.
7. Maloney E.A., Waechter S., Risko E.F., et al. Reducing the sex difference in math anxiety: The role of spatial processing ability // *Learning and Individual Differences*. – 2012. – Vol. 22. – P. 380–384.
8. Nyroos M., Wiklund-Hörnqvist C. The association between working memory and educational attainment as measured in different mathematical subtopics in the Swedish national assessment: primary education // *Educational Psychology: An International Journal of Experimental Educational Psychology*. – 2012. – Vol. 32(2). – P. 239–256.
9. Vabnick I., Trimmer J.S., Schwarz T.L., et al. Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns // *J. Neurosci*. – 1999. – Vol. 19(2). – P. 747–58.
10. Vernes S.C. , Newbury D.F., Abrahams B.S., et al. A functional genetic link between distinct developmental language disorders // *N. Engl. J. Med*. 2008. V. 359. № 22. P. 2337–45.
11. Whitehouse A.J., Bishop D.V. et al. CNTNAP2 variants affect early language development in the general population // *Genes Brain Behav*. 2011. V. 10 № 4. P. 451–6.
12. Zhang J.P., Burdick K.E., Lencz T. Meta\_analysis of genetic variation in DTNBP1 and general cognitive ability // *Biol. Psychiatry*. 2010. V. 68. № 12. P. 1126–1133.

©*Р.Ф.Канзафарова*, 2015

## **НОВАЯ МУТАЦИЯ В ГЕНЕ СПАСТИНА (SPG4) – ПРИЧИНА НАСЛЕДСТВЕННОЙ СПАСТИЧЕСКОЙ ПАРАПЛЕГИИ У ПАЦИЕНТОВ ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН**

**Ахметгалеева А.Ф.<sup>1</sup>, Хидиятова И.М.<sup>1</sup>, Идрисова Р.Ф.<sup>2</sup>,  
Сайфуллина Е.В.<sup>2</sup>, Магжанов Р.В.<sup>2</sup>, Хуснутдинова Э.К.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,  
Уфа, e-mail: biologaliya@mail.ru

<sup>2</sup> Башкирский государственный медицинский университет, кафедра неврологии с курсами нейрохирургии и медицинской генетики, Уфа  
Научный руководитель: дбн проф. Хидиятова И.М.

Наследственные спастические параплегии (НСП) – группа нейродегенеративных болезней с преимущественным поражением пирамидного тракта [6]. Ведущим клиническим признаком этих заболеваний является спастичность мышц нижних конечностей [8]. В зависимости от того, является ли этот симптом единственным или сочетается с другими неврологическими или экстраневральными симптомами, выделяют неосложнённые или осложнённые формы заболевания [6].

Существует более 50 генетических вариантов НСП. По современной номенклатуре, генные локусы и соответствующие формы НСП обозначают аббревиатурой SPG (от англ. Spastik Paraplegia Gene), с порядковыми номерами в хронологической последовательности [6].

Распространенность НСП составляет 1,27–12,1 на 100000 населения [6]. Распространенность в РФ - 1,46-7,21 на 100000, в Республике Башкортостан – 3,5 на 100000 [1].

Наиболее частой аутосомно-доминантной формой заболевания в популяциях Европы является НСП, связанная с мутациями в гене спастина (SPG4). Мутации в этом гене ответственны за 45 % случаев аутосомно-доминантной (АД) НСП, 12-18% спорадических случаев заболевания. Ген, кодирующий белок спастин, локализован в хромосомной области 2p22.3, имеет размер 6.71 kb, состоит из 17 экзонов.

Кодируемый геном белок спастин является представителем семейства AAA – белков, АТФаз особого класса с множественными видами клеточной активности. Главной функцией спастина является обеспечение динамики микротрубочек цитоскелета. Нарушение этого процесса приводит к развитию SPG4 формы НСП. Спастин, состоит из 616 аминокислот, включает несколько функционально различающихся

доменов. Для распада микротрубочек необходимы MTBD и АТФазный домены [11].

SPG4 определяется как «неосложненная НСП», но в последнее время появляются данные о ее клиническом разнообразии: у пациентов встречаются когнитивные нарушения [7], эпилепсия [12], атаксия [14]. Возраст начала заболевания сильно варьирует от раннего детства до 61 года [7].

На настоящий момент в гене *SPG 4* идентифицировано более 300 мутаций [7]. Частых мутаций в гене SPG4 не описано, некоторые мутации являются уникальными.

Целью настоящей работы являлся анализ гена *SPG4* у больных с аутосомно-доминантной формой НСП из Республики Башкортостан и анализ клинических особенностей заболевания у пациентов с выявленными мутациями.

### **Материал и методы**

Клинико – генеалогическое и молекулярно-генетическое исследование проведено в 10 неродственных семьях с НСП, в которых установлен семейный характер заболевания. Контрольная выборка состояла из здоровых жителей РБ различной этнической принадлежности: русской (50 чел.), татарской (50 чел.), башкирской (50 чел.). У всех обследуемых лиц кровь для ДНК была получена с их информированного согласия.

Анализ нуклеотидной последовательности гена *SPG4* проведен методом анализа конформационного полиморфизма однонитевой ДНК (SSCP) и последующим секвенированием на автоматическом анализаторе ABIPRISM 310 (AppliedBiosystems). Амплификация экзонов проводилась с использованием олигонуклеотидных праймеров, описанных Lindseyetal. [9]. Для анализа функциональной значимости выявленных изменений использовали программы <http://www.mutationtaster.org/> [16], а также Humansplicingfinder [5].

### **Результаты и обсуждение**

В первом экзоне гена SPG4 выявлена ранее неописанная мутация в семье татарской этнической принадлежности. Эта мутация - делеция 29 нуклеотидов – является мутацией сдвига рамки считывания и приводит к образованию стоп кодона с.321del29 (p.Val108SerfsX17). В группе контрольных лиц татарской этнической принадлежности (50 чел.) указанная мутация не обнаружена.



по разборке микротрубочек. Происходит выпадение всех важных доменов спасина. Такой белок, как правило, не имеет наиболее важного АТФазного домена, из-за чего и следуют дальнейшие нарушения в его функционировании. Различные крупные делеции, инсерции, составляют немалую долю всех мутаций гена SPG4 - 18% [2], 16% - во французской популяции [4], в австралийской популяции доходят до 25% [15]. Доля делеций в числе мутаций значительно меньше оказалась в Португалии – 7% [10]. Отличилась эстонская популяция, где не обнаружили крупные хромосомные перестройки [3], что, по мнению авторов, является ее уникальностью.

Большинство исследователей считают, что клинический эффект вследствие мутаций в гене спасина *SPG4* появляется из-за уменьшения количества белка (гаплонедостаточность) [7,11] и потери функции спасина [13]. Именно этот механизм справедлив и в случае данной мутации.

### **Заключение**

Из литературных источников следует, что мутации в гене SPG4 разнообразны и в большинстве случаев уникальны, это представляет сложность при проведении генетического консультирования в семьях больных в различных регионах. В семье с АД НСП из Республики Башкортостан, где выявлена новая мутация в гене SPG4, в дальнейшем возможно проведение пресимптоматической и пренатальной диагностики.

### **Список литературы**

1. Магжанов Р. В. Эпидемиологическая характеристика наследственных спастических параплегий в Республике Башкортостан // Мед. Генетика. – 2013. - №7. – С. 12-16
2. Beetz C, Nygren AO, Schickel J et al. High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia // Neurology. - 2006. - 67(11). - P. 1926-30
3. Braschinsky M., Tamm R., Beetz C. et al. Unique spectrum of SPAST variants in Estonian HSP patients: presence of benign missense changes but lack of exonic rearrangements // BMC Neurology. - 2010. - 10:17
4. Depienne C., Fedirko E., Forlani S., Cazeneuve C. Exon deletions of SPG4 are a frequent cause of hereditary spastic paraplegia // J. Med. Genet. - 2007. - 44. - P. 281–284.
5. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acid Research. – 2009.

6. Fink J. K. Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms // *Acta Neuropathol.* - 2013.

7. Fonknechten N., Mavel D., Byrne B. et al. Spectrum of SPG 4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia // *Human molecular genetics.* - 2000. - Vol. 9 NO. 4. - P. 637-644

8. Hazan J., Fonknechten N., Mavel D. et al. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia // *Nature genetics.* - 1999. - Vol. 23. - P.296-303

9. Lindsey J C, Lusher M E, McDermott C J et al. Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis // *Med Genet.* -2000. - 37. - P. 759–765

10.Loureiro J.L., Brandão E, Ruano L. et al. Autosomal Dominant Spastic Paraplegias: A Review of 89 Families Resulting From a Portuguese Survey // *Jama Neurol.* - 2013. - Vol 70 (NO. 4). - P. 481-487

11.Lumb J. H. Connell J. W., Allison R., Reid E. The AAA ATPase spastin links microtubule severing to membrane modelling // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012. - 1823. - P. 192–197.

12.Mead S H, Proukakis C, Wood N et al. A large family with hereditary spastic paraparesis due to a frame shift mutation of the spastin (SPG4) gene: association with multiple sclerosis in two affected siblings and epilepsy in other affected family members // *Neurol Neurosurg Psychiatry.* - 2001. - 71. - P. 788–791

13.Namekawa M., Takiyama Y., Sakoe K. et al. A large Japanese SPG4 family with a novel insertion mutation of the SPG4 gene: a clinical and genetic study // *Journal of the Neurological Sciences.* - 2001. - 185. - P. 63–68

14.Nielsen J. E., Johnsen B., Koefoed P. et al. Hereditary spastic paraplegia with cerebellar ataxia: a complex phenotype associated with a new SPG4 gene mutation // *European Journal of Neurology.* - 2004. - 11. - P. 817–824

15.Vandebona H., Kerr N. P., Liang C. Sue C. M. SPAST mutations in Australian patients with hereditary spastic paraplegia // *Internal Medicine Journal.* - 2012. - P. 1342-1346

16. <http://www.mutationtaster.org>.

© А.Ф. Ахметгалеева, 2015.

## **МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ГЛАЗОСПЕЦИФИЧНЫХ СЛОЕВ НКТД ПРИ ДЕПРИВАЦИОННОЙ АМБЛИОПИИ**

**Шкорбатова П.Ю., Якимова Е.Г., Алексеенко С.В.**  
ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,  
polinavet@yandex.ru

Депривационная (обскурационная) амблиопия – снижение остроты зрения одного глаза, которое развивается вследствие отсутствия структурированной стимуляции этого глаза (помутнение роговицы или хрусталика (катаракта), птоз) в раннем возрасте [2, 8]. В это время, называемое «критическим периодом развития», зрительная система характеризуется высокой пластичностью нервных связей [4]. На пике критического периода развития (4-5 постнатальные недели) значительные изменения функциональных свойств нейронов и нейронных связей [9] в зрительной коре под воздействием монокулярной депривации могут произойти в течении одного-двух дней. В дорсальном ядре наружного коленчатого тела (НКТд) начальные изменения цитоскелета нейронов наблюдаются уже через 4 дня монокулярной депривации [5]. Представляет интерес оценить, как такие изменения отражаются на общей функциональной активности нейронов НКТд.

Известно, что функциональная активность нейронов коррелирует с метаболической активностью митохондриального фермента дыхательной цепи цитохромоксидазы (ЦО) [6]. Гистохимическим методом выявления ЦО продемонстрировано снижение активности клеток НКТд кошки при монокулярной энуклеации и депривации, блокаде активности клеток сетчатки [12, 13]. Этот метод использовался и для выявления различий в активности глазодоминантных доменов в коре человека и обезьян с депривационной, анизотропической и дисбинокулярной амблиопией [3, 7, 11, 14]. Однако работ по количественной оценке метаболической, и соответственно, функциональной активности клеток в глазоспецифичных слоях НКТд не проводилось.

Целью настоящего исследования было оценить различия функциональной активности нейронов в глазоспецифичных слоях НКТд в процессе развития депривационной амблиопии.

### **Материал и методика**

Исследование выполнено на животных двух возрастных групп: 1 месяц (4 монокулярно депривированные и 4 интактные котенка) и 5 месяцев (три монокулярно депривированные и четыре интактные кошки).

Операции по формированию монокулярной депривации (сшивание век) выполняли на 8-14-й постнатальные дни, затем животных выращивали в нормальной световой среде. Работа проведена с соблюдением основных биоэтических правил обращения с экспериментальными животными.

Полученные после перфузионной фиксации головного мозга срезы НКТд обоих полушарий обрабатывали гистохимическим методом Вонг-Райли [12] для выявления ЦО. На обработанных таким образом срезах мозга зоны с высокой ЦО-активностью имеют более темную окраску, т.е. более высокую оптическую плотность (ОП). Оптическую плотность измеряли на изображениях окрашенных срезов НКТд при помощи программы Морфо Слайс, разработанной в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН [1], определяли ОП в слоях А и А1, иннервируемых из разных глаз. Для сравнения ОП выбирали участки со сходными зрительными координатами проекций: 0-1, 5, 10 и 20 угловых градусов вдоль проекции горизонтального меридиана поля зрения [10]. По результатам измерений вычисляли коэффициент, характеризующий контраст между ОП в слое А и слое А1:

$$K = (d_A - d_{A1}) / (d_A + d_{A1}),$$

где  $d_A$  – оптическая плотность в слое А, который иннервируется из контралатерального глаза,  $d_{A1}$  – оптическая плотность в слое А1, который иннервируется из ипсилатерального глаза. Статистическую оценку результатов проводили с помощью программы StatisticaSixSigma. Достоверность различий между 2-мя независимыми выборками данных оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При визуальной оценке интенсивности окраски у интактной кошки не выявляется различий в интенсивности окраски слоев А и А1, тогда как у монокулярно депривированной кошки в возрасте 5 месяцев слои, иннервируемые из депривированного глаза (слой А в правом полушарии и слой А1 в левом полушарии), заметно светлее, чем слои, иннервируемые из интактного глаза. (Рис 1 фото). У интактных и монокулярно депривированных котят в возрасте 1 месяц подобных различий не наблюдается.

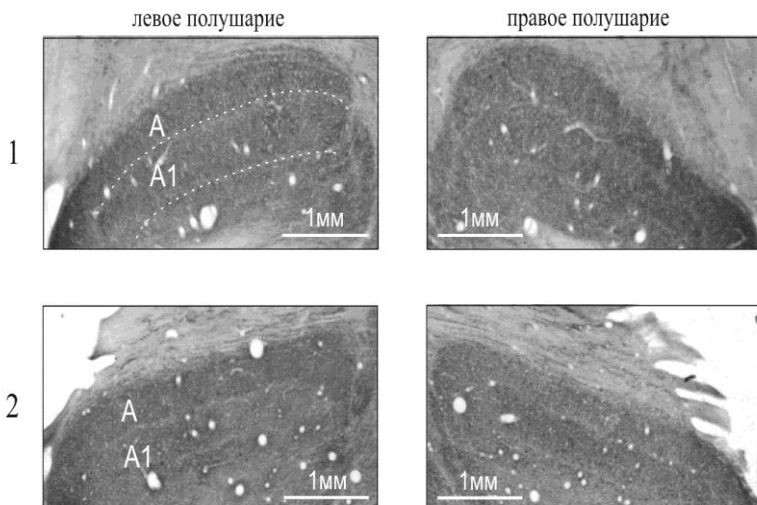


Рис. 1. Микрофотографии фронтальных срезов НКТд интактной кошки (1) и кошки, депривированной на левый глаз (2).

В НКТд монокулярно депривированной кошки, представленном на рис. 1.2 контраст между слоями А и А1 при вычислении его по формуле  $K = (d_A - d_{A1}) / (d_A + d_{A1})$  имеет положительные значения в полушарии, ипсилатеральном депривированному глазу (левом), так как ОП в слое А больше, чем в слое А1. В противоположном полушарии (правом) контраст имеет отрицательные значения, так как ОП в слое А (иннервирующемся из депривированного глаза) относительно меньше. Таким образом, межполушарные различия в знаке контраста К свидетельствуют об относительно большей ОП в слоях НКТд, связанных с одним из глаз, тогда как модуль значения К характеризует степень выраженности различий функциональной активности нейронов в слоях НКТд.

При проведении количественной оценки различий между ОП в слоях А и А1 было обнаружено, что у интактных кошек значения контраста не различаются в правом и левом полушариях, что свидетельствует о равнозначной активности нейронов в слоях, получающих входы из правого и левого глаз. Значения контраста у животных в возрасте 5-ти месяцев и 1-го месяца не различаются.

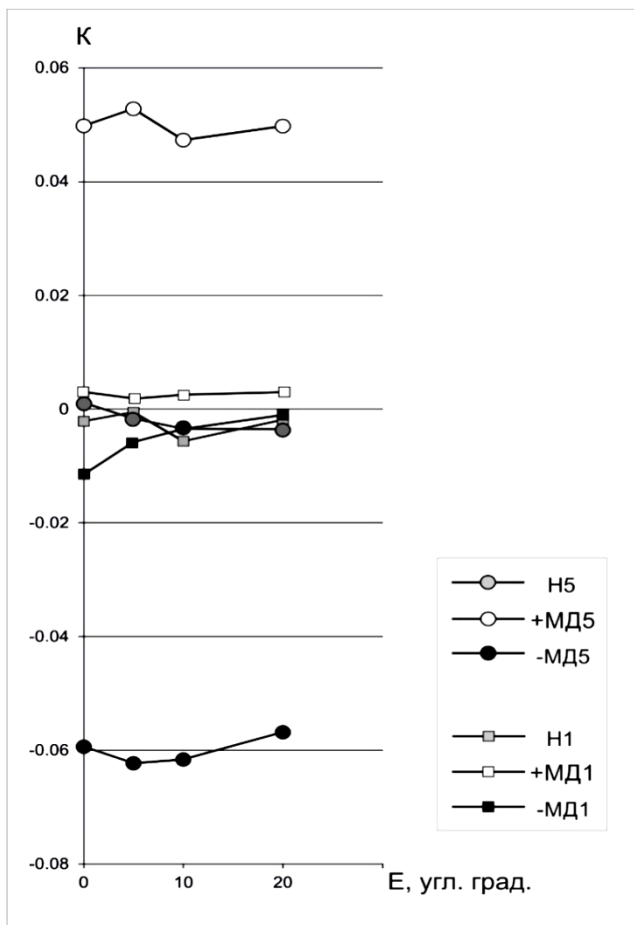


Рис. 2. Зависимость контраста К между оптической плотностью в слое А и слое А1 НКТд от эксцентриситета Е вдоль горизонтального меридиана поля зрения у интактных кошек месячного (Н1) и пятимесячного (Н5) возраста (средние суммарные по обоим полушариям значения К), у монокулярно депривированных кошек месячного и пятимесячного возраста в полушарии, ипсилатеральном депривированному глазу (+МД1 и +МД5 соответственно), и в полушарии, контралатеральном депривированному глазу (-МД1 и -МД5).

У монокулярно депривированных кошек в возрасте 5-ти месяцев обнаружены достоверные отличия контраста ОП в обоих полушариях по

сравнению интактными кошками того же возраста в пределах всей проекции поля зрения (рис.2). Модуль К превышает значения, полученные у интактных кошек, в несколько раз, что свидетельствует о значительных различиях в активности нейронов интактного и депривированного глаза. При этом, в разных полушариях значения К противоположны по знаку и достоверно различаются, что указывает на относительно меньшую ЦО-активность в слоях НКТд обоих полушарий, которые иннервируются из депривированного глаза.

У монокулярно депривированных котят в возрасте 1 месяц модуль значений контраста К сопоставим с модулями значений К у интактных кошек, что говорит о небольших различиях в активности нейронов в разных слоях НКТд. Однако достоверные изменения относительно нормы были выявлены в отдельных участках НКТд обоих полушарий: в полушарии, ипсилатеральном депривированному глазу, - в области проекции 10 угл. град. поля зрения, в полушарии, контралатеральном депривированному глазу, - в области проекции центральной части поля зрения (0-1 угл. град.).

Проведенное исследование свидетельствует о том, что в критическом периоде после депривации глаза развиваются изменения активности нейронов глазоспецифичных слоев НКТд обоих полушарий. Причинами таких изменений при монокулярной депривации могут быть 1) ослабленная световая стимуляция сетчатки депривированного глаза; 2) тормозные взаимодействия между нейронами слоев НКТд, получающих входы из разных глаз; 3) ограничение ветвления аксонных терминалей нейронов НКТд депривированного глаза в первичной зрительной коре в результате бинокулярной конкуренции; 4) подавление активности нейронов депривированного глаза со стороны более высокоорганизованных полей коры. Для выявления особенностей динамики развития изменений в НКТд разных полушарий на протяжении всего критического периода необходимы дальнейшие исследования.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 14-04-31655.*

### **Список литературы**

1. Алексеенко С.В., Шкорбатова П.Ю., Топорова С.Н. Солнушкин С.Д. Влияние косоглазия и монокулярной депривации на структуру межполушарных связей в проекционных зрительных полях кошки // Сенсорные системы. – 2012. – Т. 26. – № 2. – С. 106-116.
2. Хватова К.В., Слышалова Н.Н., Вакурина А.Е. Амблиопия: зрительные функции, патогенез и принципы лечения // В кн. Зрительные

функции и их коррекция у детей. / Под ред. Аветисова С.Э., Кащенко Т.П., Шамшиновой А.М. – М.: Медицина. – 2005. – С.202-220.

3. Crawford M.L., Harwerth R.S. Ocular dominance column width and contrast sensitivity in monkeys reared with strabismus or anisometropia // Invest Ophthalmological Vision Science. –2004. – V. 45. – № 9.– P.3036-3042.

4. Daw N.W. Visual development. – New York: Springer. – 2006. –268 p.

5. Duffy K.R., Slusar J.E. Monocular deprivation provokes alteration of the neuronal cytoskeleton in developing cat lateral geniculate nucleus // Visual Neuroscience. – 2009. –V. 26. – P.319–328.

6. Hevner R.F., Wong-Riley M.T. Regulation of cytochrome oxidase protein levels by functional activity in the macaque monkey visual system // Journal of Neuroscience. –1990.– V. 10. – № 4. – P.1331-1340.

7. Horton J.C., Hocking D.R. Effect of early monocular enucleation upon ocular dominance columns and cytochrome oxidase activity in monkey and human visual cortex // Visual Neuroscience. – 1998. – V. 15. – № 2. – P.289-303.

8. Mitchell D.E., MacKinnon S. The present and potential impact of research on animal model for clinical treatment of stimulus deprivation amblyopia // Clinical Experimental Optometry. – 2002. – V. 85. – № 1. – P.5-18.

9. Olson C.R., Freeman R. D. Profile of the sensitive period for monocular deprivation in kittens // Experimental Brain Research. – 1980. – V. 39. – P.17-21.

10. Sanderson K.J. The projection of the visual field to the lateral geniculate and medial lateral nuclei in the cat // Journal of Computation Neurology. – 1971. – V. 143. – № 1. – P.101-117.

11. Tychsen L., Burkhalter A. Nasotemporal asymmetries in V1: ocular dominance columns of infant, adult, and strabismic macaque monkeys // Journal of Computation Neurology. –1997. –V. 388 – № 1. – P.32-46.

12. Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry // Brain Research. – 1979. – V. 171. – № 1. – P.11-28.

13. Wong-Riley M, Riley D.A. The effect of impulse blockade on cytochrome oxidase activity in the cat visual system // Brain Research. – 1983. – V. 261. – № 2. – P.185-193.

14. Wong A.M., Burkhalter A., Tychsen L. Suppression of metabolic activity caused by infantile strabismus and strabismic amblyopia in striate visual cortex of macaque monkeys // J AAPOS. – 2005. – V. 9. – № 1. – P.37-47.

© П.Ю. Шкорбатова, Е.Г. Якимова, С.В. Алексеенко, 2015.

## **РОЛЬ ОРИЕНТАЦИОННО-ИЗБИРАТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В ВОСПРИЯТИИ ДВОЙСТВЕННЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ**

**Подвигина Д.Н., Якимова Е.Г.**

ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург  
daria-da@yandex.ru

Информация об объектах окружающего мира, получаемая с помощью зрительной системы, основывается на двухмерных изображениях – паттернах распределения света и тени, проецируемых на слой рецепторов на сетчатке. Тем не менее, мы воспринимаем трехмерность и глубину пространства. Это возможно благодаря ряду признаков, среди которых важную роль играют монокулярные признаки глубины, такие как, например, затенение. Затенение является одним из наиболее надежных монокулярных признаков глубины, причем способность интерпретировать затенение как пространственный признак развивается на ранних этапах онтогенеза как у людей, так и у животных [1].

Как правило, если трехмерный объект освещен светом от единственного источника, взаимное расположение затененных и освещенных участков подчиняется определенным общим закономерностям. Так, круг, яркость которого изменяется от черного к белому по градиенту снизу вверх (то есть затененный снизу), будет восприниматься как сфера, поскольку наша зрительная система при интерпретации паттерна светотени на поверхности объекта руководствуется допущением о том, что свет падает сверху. Однако при изменении направления освещения такая однозначная трактовка становится затруднительной, и если градиентный круг расположен так, что вектор градиента направлен по горизонтали, он может восприниматься и как сфера, и как вогнутая полусфера, то есть обнаруживает характеристики двойственного изображения.

Двойственные изображения - это изображения, не имеющие однозначной трактовки, в результате чего при их наблюдении происходит реверсия (переключение) восприятия с одного варианта изображения на другой, альтернативный ему. В психофизической части настоящего исследования в качестве стимула мы использовали изображение рядов затененных кругов, где вектор градиента расположен горизонтально (рисунок 1), и круги могут восприниматься попеременно то как выпуклые сферы, то как вогнутые полусферы.

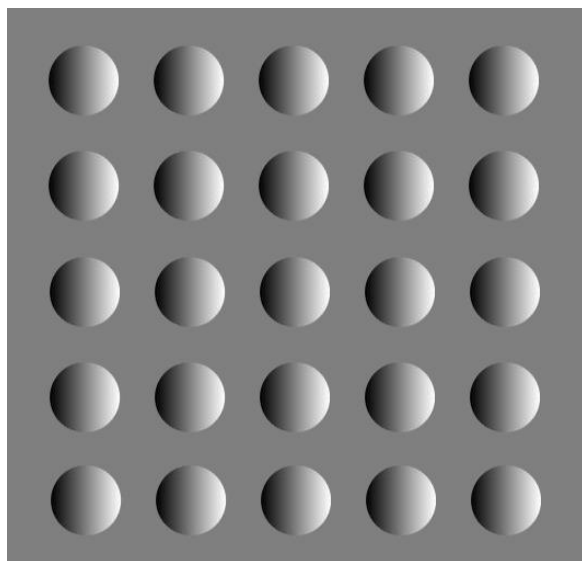


Рисунок 1 – Неоднозначно воспринимаемые затененные круги.

В исследовании добровольно приняли участие 34 здоровых испытуемых в возрасте от 18 до 45 лет с нормальным или откорректированным до нормального зрением, без неврологической симптоматики. Они были поделены на две группы - 18 и 16 человек, - и проходили эксперимент в условиях бинокулярного и монокулярного наблюдения соответственно. Стимул предъявлялся на мониторе компьютера по одной минуте пять раз каждому испытуемому. Задачей испытуемых было отмечать моменты переключения восприятия с одного варианта (перцепта) на другой нажатием одной из двух клавиш.

Для каждого испытуемого рассчитывали частоту нажатия обеих клавиш, то есть частоту переключений (раз в минуту; значение, усредненное по пяти предъявлениям), а также среднее время удержания каждого из двух альтернативных перцептов.

Результаты исследования показали, что из 34 человек четверо не наблюдали двойственность тестового изображения, воспринимая его исключительно как выпуклые сферы. Данный вариант восприятия тестового изображения оказался предпочитаемым для большинства остальных испытуемых вне зависимости от условий наблюдения (рисунок 2). Это обусловлено тем, что зрительная система, при отсутствии освещенности объекта сверху (условия наблюдения, наиболее часто встречающиеся в повседневной жизни), отдает предпочтение

выпуклому варианту изображения, как более привычной форме окружающих нас предметов [2].

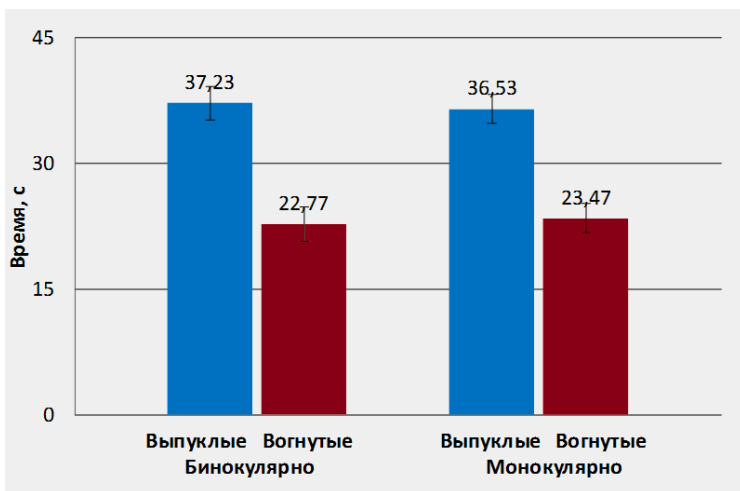


Рисунок 2 - Усредненное время наблюдения каждого перцепта в двух условиях предъявления

На гистограмме указана ошибка среднего. Для обоих условий различия статистически значимы (Wilcoxon single-rank test,  $p < 0,05$ )

Рассчитанная частота переключений составила  $10,3 \pm 3,4$  раз в минуту при биноклярном наблюдении и  $9,1 \pm 3,9$  раз в минуту – при монокулярном. Данные значения не различаются достоверно, то есть механизм двойственного восприятия изображений с таким монокулярным признаком глубины, как затенение, функционирует независимо от условий наблюдения. Интересно отметить, что данное значение частоты переключений сопоставимо с аналогичным значением, полученным для другого двойственного изображения – куба Неккера; по нашим, а также имеющимся в литературе данным [3] это значение составляет 10-14 раз в минуту. Это может говорить об универсальности механизмов двойственного восприятия изображений различных типов.

Ранее в лаборатории в нейрофизиологических исследованиях чувствительности нейронов дорсального ядра наружного коленчатого тела (НКТд) кошки к ориентации градиента яркости было показано, что клетки НКТд чувствительны к ориентации вектора градиента яркости [4]. Результаты этих исследований позволили предложить возможный

нейронный механизм двойственного восприятия изображений подобного типа.

Отдельно были проанализированы ответы нейронов на четыре ориентации вектора градиента яркости:  $0^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  и  $270^\circ$ . Из тридцати клеток больше всего нейронов (11 и 10) оказались чувствительны к горизонтальной ориентации вектора градиента яркости ( $90^\circ$  и  $270^\circ$ , соответственно). Такая ориентация характеризует двойственные изображения затененных кругов, использованные в психофизической части исследования.

Таким образом, вполне вероятно, что наиболее привычным и предпочтительным для зрительной системы является изображение выпуклое и освещенное сверху – в данном случае, изображение кругов, затененных снизу, которые однозначно воспринимаются как выпуклые сферы. Для распознавания такого изображения зрительная система затрачивает минимум усилий, и поэтому в работу включается минимальное число клеток НКТд для обработки информации о таком изображении.

При затенении кругов сбоку возникает «конкуренция» между двумя вариантами интерпретации изображения. Для решения о том, какому из вариантов отдать предпочтение в этой неоднозначной ситуации, требуется больше усилий. Следовательно, больше резервов анализатора задействуется для обработки информации.

Таким образом, нейроны НКТд, чувствительные к ориентации вектора градиента яркости в изображениях объектов с распределением светотени на их поверхностях, по-видимому, принимают участие в процессе распознавания формы таких объектов. При этом принятие решения о наблюдаемой форме на высших уровнях зрительной системы, возможно, основывается на информации о количестве элементов нижележащих уровней системы в частности нервных клеток НКТд, задействованных в процессе обработки зрительной информации, поступающей от изображения.

Выявлено, что чувствительность нейронов НКТд к ориентации вектора градиента яркости в изображениях светотеневых объектов может являться одним из механизмов восприятия формы таких объектов, который и определяет предпочитаемый вариант видения в процессе двойственного восприятия изображений, обладающих монокулярным признаком глубины.

### Список литературы

1. Шиффман Х.Р. Ощущение и восприятие. СПб.: Питер, 2003. 928 с.
2. Ramachandran V.S. Perceiving Shape from Shading // Scientific American. –1988. – V. 259. – № 2.– P.76-83.
3. Kornmeier J., Hein Ch. M., Bach M. Multistable perception: When bottom-up and top-down coincide // Brain and Cognition. – 2009. – V. 69. – P.138-147.
4. Подвигин Н.Ф., Багаева Т.В., Подвигина Д.Н., Якимова Е.Г., Иванова Л.Е., Солнушкин С.Д. Новое свойство ориентационно-избирательных нейронов наружного коленчатого тела кошки // Журнал эволюционной физиологии и биохимии. – 2007. – Т. 43. – № 6. – С.487-493.

©Д.Н. Подвигина, Е.Г. Якимова, 2015

УДК: 616 — 089.843

### АНАЛИЗ ФОРМЫ АСТРОЦИТОВ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ В НОРМЕ И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПАРКИНСОНИЗМА

**Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В., Шелоухова Л.И.**  
ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва,  
neurolab@yandex.ru

Несмотря на значительные успехи в исследовании болезни Паркинсона причины избирательной уязвимости дофаминергических нейронов черной субстанции до конца не выяснены. При этом исследователи, уделяя значительное внимание механизмам гибели нейронов, часто отводят глиальным клеткам лишь вспомогательную роль. Вместе с тем, астроциты – активные игроки в патогенезе паркинсонизма [6], в связи с многообразием и сложностью их реакций при нейродегенеративном процессе.

Астроциты участвуют в медиаторном и энергетическом обмене, обеспечивая поддержку нейронов [12, 7]. Участвуя в регуляции глутаматергической нейротрансмиссии [5, 7], астроциты, по-видимому, оказывают значительное влияние на кортикостриатные проекции [13]. Выявлено, что астроциты образуют сети, формируя контакты между собой и другими клетками ЦНС и способны к передаче сигнала [5]. При этом каждый астроцит «контролирует» определенную область – астроцитарный домен [3].

В литературе подчеркивается неоднозначная роль астроглии при нейродегенерации. С одной стороны – она выполняет защитные функции, например, выделяя нейротрофные факторы, или контролируя содержание внеклеточного глутамата [5, 7]. В то же время, астроциты вырабатывают провоспалительные цитокины, опосредующие активацию микроглии, могут препятствовать восстановлению контактов между нейронами [7, 10]. На моделях паркинсонизма выявлено участие астроцитов в транспорте и биотрансформации нейротоксинов [1], предполагается их участие в образовании токсичных продуктов окисления дофамина, приводящих к продукции АФК.

Активация астроцитов, как универсальная реакция на повреждение нервной ткани, проявляется их гипертрофией и усиленной пролиферацией. Вместе с тем, астроглиоз, по-видимому, не является единообразной неспецифической реакцией, а его характер зависит от задействованных сигнальных путей [15]. Глиоз приводит к изменению доменной организации, вплоть до ее полного нарушения [7]. Наиболее выраженные молекулярные и морфологические различия [7, 8] наблюдаются при сравнении глиального рубца (тяжелый анизоморфный глиоз по Sofroniew) и диффузного изоморфного глиоза, часто имеющего транзиторный характер. При этом, морфологические и нейрохимические изменения реактивных астроцитов отражают функциональную роль активации глии – меняется форма дерева отростков глиальной клетки [14], в связи с ремоделированием цитоскелета увеличивается экспрессия глиофибрилярного белка (GFAP) и белка S100, участвующего в сборке промежуточных филаментов [7], меняется экспрессия и локализация в клетке глутаминсинтетазы [2, 14].

Таким образом, астроциты участвуют как в нейродегенерации, так и в компенсаторных изменениях, в том числе и при паркинсонизме [6]. Вместе с тем, экспериментальные иммуноморфологические исследования реактивных изменений астроцитов преимущественно выполнены на культуре клеток или на моделях инсульта и нейротравмы, а морфологическим изменениям астроцитов при экспериментальной дисфункции nigrostriatной системы уделяется незначительное внимание.

В связи с изложенным выше, цель нашего исследования состояла в количественной морфологической оценке астроцитарной популяции структур nigrostriatной системы в норме и при экспериментальном паркинсонизме.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали крыс Вистар, самцов, и воспроизводили следующие экспериментальные модели паркинсонизма: стереотаксическое одностороннее интранигральное введение 6-

гидроксидофамина (6-OHDA) (n=6, однократно в дозе 6 мкг), внутривентрикулярное введение параквата (n = 6, 10 мг/кг, ежедневно, на протяжении 4-х недель), ротенона (n = 6, 2,5 мг/кг, ежедневно, на протяжении 4-х недель) и хлорида марганца (n = 8, животные получали раствор на протяжении 3-х месяцев с питьевой водой). Подробнее использованные модели описаны в ряде источников [4, 11]. Мозг фиксировали в 4% формалине. Иммуногистохимическое окрашивание проводили на сериях фронтальных парафиновых срезов толщиной 7 мкм, использовали антитела к тирозингидроксилазе (ферменту синтеза дофамина), кислом глиофибрилярному белку (GFAP), глутаминсинтетазе (GS) и аквапорину-4 (AQP4). Исследовали ретикулярную и компактную части черной субстанции и дорсальную область стриатума (на уровне головки хвостатого ядра).

Количественную оценку отростков астроцитов выполняли на микроскопе LeicaDMLB, используя объектив 40x, на срезах окрашенных иммунопероксидазным методом для выявления GFAP, выбирая клетки с различным ядром. Используя графический планшет обводили контур астроцита и при помощи созданной нами процедуры в системе морфометрического анализа LeicaQwin определяли ряд морфометрических параметров: длину и число отростков клетки и точек их ветвлений, вытянутость клетки (отношение длинной и короткой осей фигуры), и площадь занимаемую отростками астроцита (convexhull – наименьший выпуклый многоугольник, описывающий фигуру). Статистическую обработку данных проводили в программе IBMSPSS 20. В каждой группе исследовали до трехсот клеток, случайным образом выбранных на 20-25 полях зрения, для классификации астроцитов, методом главных компонент (PCA) из полученного набора данных выделили два фактора, объясняющие 85% дисперсии. Первая компонента была связана с формой астроцитов, а вторая – с их размерами. Подробнее использование метода PCA в морфологических исследованиях описано в работе Soltz [9]. На основании значений полученных факторов проводили иерархический кластерный анализ, методом внутригрупповых связей, используя евклидову метрику. Сравнение групповых средних проводили используя дисперсионный анализ с апостериорным тестом FisherLSD.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Морфология астроцитов низростриатной системы интактных животных*

Использованный подход к анализу формы и классификации астроцитов позволил выявить в черной субстанции и дорсальном стриатуме интактных животных три морфологических типа GFAP-позитивных астроцитов, отличавшихся характером ветвления и

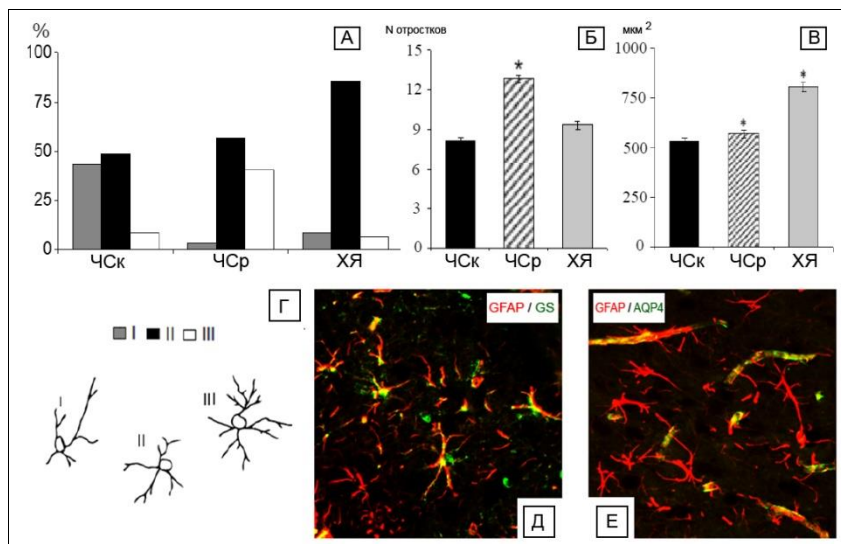
формой дерева отростков (Рис. 1). Наибольшее число отростков, в среднем, обнаруживали у астроцитов ретикулярной части черной субстанции, при этом, наибольшую площадь, занимаемую отростками (размеры доменов) имели астроциты стриатума. Соотношение выделенных типов астроцитов в исследованных структурах было различным (Рис. 1) – наиболее однородным астроцитарным составом характеризовался стриатум, тогда как астроциты ретикулярной (ЧСр) и компактной частей черной субстанции (ЧСк) были более гетерогенны. При этом, популяции астроцитов ЧСк и ЧСр значительно отличались между собой – в ретикулярной части они были представлены ветвистыми формами, а в компактной – преимущественно маловетвистыми и вытянутыми.

Исследование локализации глутаминсинтетазы (GS) и аквапорина (AQP4) также выявило неоднородность распределения этих маркерных белков астроцитов в исследуемых структурах. Экспрессия GS в астроцитах хвостатого ядра (Рис.1) была выше, а локализация фермента обнаруживалась на всем протяжении отростков астроглии. Астроциты черной субстанции имели более низкий уровень экспрессии GS, кроме того, наблюдали также клетки без GS-позитивных отростков, только с окрашенным ободком цитоплазмы вокруг ядра. Следует отметить, что и в стриатуме отмечали наличие GS-позитивных клеток не имеющих отростков. Исследование колокализации GFAP и GS показало, что глутаминсинтетаза обнаруживается не только в GFAP-позитивных астроцитах, но и в популяциях других глиальных клеток – вероятно, олигодендроглии или других типах глиальных клеток. Аквапорин выявлялся по ходу сосудистого русла (Рис.1), что связано с его преимущественной локализацией на мембране концевых ножек астроцитов, что позволило выявить особенности васкуляризации исследуемых структур – наименее плотной была сосудистая сеть в ЧСк, что может иметь значение в патогенезе паркинсонизма сосудистого типа.

Хотя локализация исследованных маркерных белков глии была сходной, обращает на себя внимание сниженная экспрессия глутаминсинтетазы, уменьшенное количество отростков астроцитов и особенности васкуляризации в компактной части черной субстанции, что, может быть связано с повышенной чувствительностью дофаминергических нейронов ЧСк к действию повреждающих факторов.

Очевидно, что выявленные особенности астроцитов связаны с характером распределения нейронов – наиболее густоклеточная структура – ЧСк, имеет менее разветвленные астроциты, а наиболее разреженная (ЧСр) – более разветвленные. Характер ветвления отростков астроцитов и локализации GS, по-видимому, зависит от плотности синаптических контактов и медиаторной специфичности нейронов в

исследуемой структуре. Так, стриатум, принимающий мощный глутаматергический кортикостриатный вход характеризуется высокой экспрессией глутаминсинтетазы и интенсивно ветвящимися отростками астроцитов.



**Рис. 1 Морфологические особенности астроцитов черной субстанции и хвостатого ядра у интактных крыс**

**А** – Соотношение трех типов астроцитов (цветовые обозначения соответствуют типам представленным на рисунке 1Г) в компактной (ЧСк), ретикулярной (ЧСр) частях черной субстанции и в стриатуме (ХЯ). (тест  $\chi^2$  выявил значимые различия между структурами)

**Б, В** – Средние значения числа отростков (Б) и площади, занимаемой отростками (В) астроцитов черной субстанции и хвостатого ядра (\* - значимые отличия от ЧСк, ANOVA Fisher LSD).

**Г** – Репрезентативные зарисовки контуров трех типов астроцитов, выделенных методом кластерного анализа, цветовые обозначения соответствуют Рис. 1А.

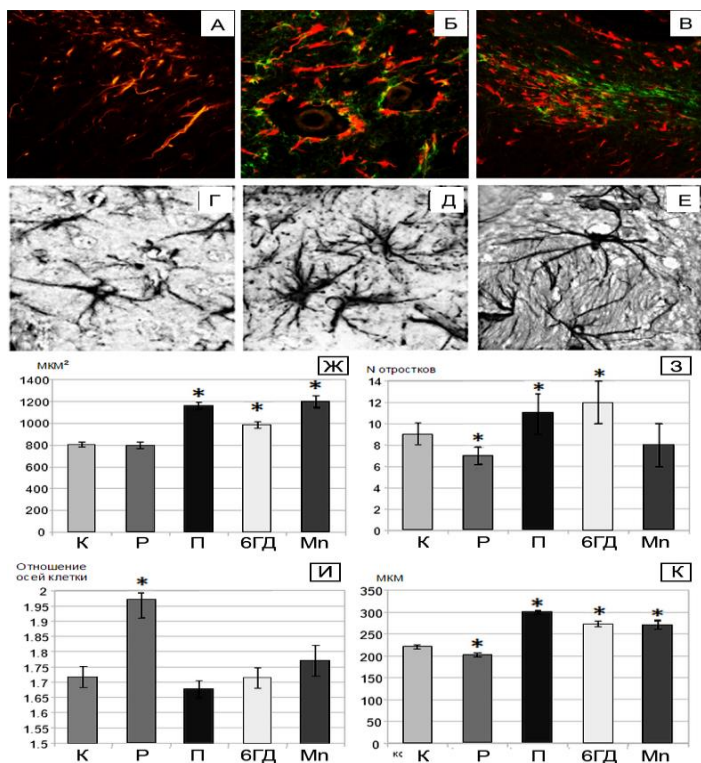
**Д, Е** – совместное выявление в стриатуме глиофибрилярного белка GFAP, глутаминсинтетазы (Д) и аквапорина-4 (Е).

Флуорохромы FITC (GS, AQP4), Cy3 (GFAP), увеличение объектива 40х.

*Реактивные изменения астроцитов приэкспериментальном паркинсонизме*

Наиболеевыраженные нейродегенеративные изменения (по результатам окрашивания на тирозингидроксилазу) обнаруживали под действием 6-OHDA. При этом, снижение экспрессии фермента в хвостатом ядре, связанное с повреждением нигростриатных окончаний, отмечали во всех экспериментальных группах, за исключением воздействия  $MnCl_2$ , что свидетельствует о большей уязвимости системы синтеза медиатора в отростках дофаминовых нейронов, чем в их телах. В черной субстанции, на стороне введения 6-OHDA, по сравнению с другими токсинами, изменения астроцитов также проявлялись наиболее ярко, что связано с формированием рубца в области гибели дофаминовых нейронов. Рубец был сформирован вытянутыми (поляризованными) гипертрофированными астроцитами, с отростками направленными к области повреждения и с увеличенной экспрессией GFAP. Экспрессия аквапорина в области рубца была повышена и наблюдалось его перераспределение по мембране астроцитов – окрашивание обнаруживалось не только в концевых ножках астроглии. Дегенерация нейронов в ЧСк, таким образом приводила к резкому нарушению глиальной организации черной субстанции. Принимая во внимание связи стриатума с черной субстанцией, интерес представляет анализ изменений астроцитов хвостатого ядра в условиях дисфункции дофаминергической системы. Полученные результаты демонстрируют гетерогенность реакции астроцитов при использовании разных моделей паркинсонизма. Изменения под действием 6-OHDA и параквата были сходными, и отражали повышенное ветвление отростков астроцитов (увеличение их числа) и увеличение площади астроцитарных доменов, без изменения их формы, что может быть связано с компенсаторным увеличением контактов астроцитов с синаптическими структурами. Ротенон приводил к нарушению доменной структуры в стриатуме и более резким изменениям, сходным с описанными выше при формировании глиального рубца — значимому снижению количества отростков и поляризации астроцитов. Следует отметить, что резкие изменения астроглии при введении ротенона, в свою очередь, могут служить причиной гибели нейронов стриатума, наблюдаемой на этой модели. Хлорид марганца, в свою очередь, вызывал отличные от других токсикантов и менее выраженные изменения формы астроцитов – что отражалось в удлинении отростков, без увеличения числа их ветвлений. Эксперимент с  $MnCl_2$  показал, что реакция астроцитов на этой модели предшествует нейродегенеративным изменениям. Обнаруженное повышенное ветвление отростков астроцитов, вероятно, отражает компенсаторное усиление контроля астроцитов над синаптическими структурами, что согласуется с

данными литературы [13]. Поляризация глиальных клеток и снижение числа их тонких дистальных отростков, наоборот, свидетельствует о нарушении контактов астроглии с нейронами и перестройке структуры ткани, а при образовании рубца – об изоляции области повреждения.



**Рис. 2** Изменения астроцитов при экспериментальном паркинсонизме А, Б, В – изменения экспрессии и локализации GFAP и AQP4 в черной субстанции под действием 6-ОНДА. А – поляризация астроцитов в области рубца. Б (40х), В (10х) – усиление экспрессии и перераспределение AQP4, периваскулярный отек. Г, Д, Е –Изменения GFAP-позитивных астроцитов стриатума. Ротенон - Г, паракват - Д и MnCl<sub>2</sub> - Е (ув. 100х). Ж, З, И, К – изменения морфометрических показателей астроглии: площади занимаемой отростками астроцитов (Ж), числа отростков (З), формы клетки (И), длины отростков (К). Обозначения: К – контроль, Р – ротенон, П – паракват, бГД – 6-ОНДА, Mn – хлорид марганца. (\* - значимые отличия от контроля, ANOVA/FisherLSD)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о морфологическом разнообразии астроцитов nigростриатной системы, тесно связанном с особенностями нейрональных популяций – плотностью нейронов в исследованных структурах nigростриатной системы и их медиаторной специфичностью. Наш эксперимент позволил выявить и количественно охарактеризовать три типа глиоза при моделировании паркинсонизма. Сходные изменения в литературе классифицируются как астроглиоз слабой выраженности (что наблюдали при воздействии хлорида марганца), выраженный изоморфный глиоз в хвостатом ядре (выявленный под действием параквата и 6-ОНДА) и анизоморфный глиоз тяжелой степени, наблюдавшийся в хвостатом ядре и в черной субстанции под действием 6-ОНДА и ротенона. В целом, реакция глии при дисфункции дофаминергической системы, отражает как непосредственно ответ на повреждение ткани, так и реакцию астроцитов на изменения медиаторного баланса в базальных ядрах. Выявленные особенности изменений астроцитов, по-видимому, связаны с различными молекулярными мишенями исследованных токсинов, а так же, с характером компенсаторной реакции. Однако остается неясным – являются ли выявленные изменения последовательными стадиями процесса активации глии (выраженными в разной степени), или отражают специфические изменения, характеризующие функционально различные реактивные изменения астроцитов.

Таким образом, проведенное исследование позволило продемонстрировать эффективность количественного морфометрического анализа для выявления гетерогенности астроцитарной популяции в структурах nigростриатной системы, а так же выявить различия глиального ответа при разных экспериментальных подходах к моделированию паркинсонизма.

*Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-31922*

### Список литературы

1. Di Monte D.A., Royland J.E., Irwin I., Langston J.W. Astrocytes as the site for bioactivation of neurotoxins // Neurotoxicology. – 1996.– Vol.17(3-4).– P. 697-703.
2. Huyghe D., Nakamura Y., Terunuma M., Faideau M., Haydon P., Pangalos M.N., Moss S.J. Glutamine synthetase stability and subcellular distribution in astrocytes are regulated by  $\gamma$ -aminobutyric type B receptors // J Biol. Chem.– 2014.–Vol.289(42) .– P.28808-15.
3. Ogata K., Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes

- in the mouse hippocampus // *Neuroscience*.–2002.–Vol.113(1) .– P.221-233
4. Olanow C.W. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease // *Annals of the New York Academy of Sciences*.–2004.–Vol.1012.– P.209-223.
  5. Perea G., Navarrete M. and Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information // *Trends in Neurosciences*.–2009.– Vol.32 (8) .– P.421-431.
  6. Phatnani H., Maniatis T. Astrocytes in Neurodegenerative Disease // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Vol.7(6). DOI: 10.1101/cshperspect.a020628.
  7. Sofroniew M.V., Vinters H.V. Astrocytes: biology and pathology // *Acta Neuropathol*.–2010.–Vol.119(1).–P.7-35.
  8. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation // *Trends in neurosciences*, 2009.–Vol.32(12) .– P.638–647
  9. Soltz Z., Orzylowska-Sliwinska O., Zaremba M., Orlowski D., Piechota M., Fiedorowicz A., Janeczko K., Oderfeld-Nowak B. Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis // *J Neurosci Methods*.–2005.–Vol. 146(1) .– P.50–60.
  10. Teismann P., Schulz J.B. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation // *Cell Tissue Res* .–2004.–Vol.318.– P.149–161.
  11. Tieu K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.–2011.–Vol.1(1).– DOI: 10.1101/cshperspect.a009316.
  12. Verkhratsky A. and Butt A. *Glial Neurobiology. A Textbook*. UK.: John Wiley & Sons Ltd 2007, 2007.– pp.215.
  13. Villalba R. M., Smith Y. Neuroglial Plasticity at Striatal Glutamatergic Synapses in Parkinson's Disease // *Frontiers in Systems Neuroscience*.–2011.– Vol.5.– P. 1-9.
  14. Wagner D.C., Scheibe J., Glocke I., Weise G., Deten A., Boltze J., Kranz A. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury // *Acta Neurol. Exp. (Wars)* .– 2013.–Vol.73(1) .– P. 79-87.
  15. Wanner I.B., Anderson M.A., Song B., Levine J., Fernandez A., Gray-Thompson Z., Ao Y., Sofroniew M.V. Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury // *The Journal of Neuroscience*.–2013.–Vol.33(31) .–pp.12870-12886.

© Д.Н.Воронков, 2015

## Секция №2. НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

УДК: 616 — 089.843

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ БИОМАТЕРИАЛА АЛЛОПЛАНТ В СУБАРАХНОИДАЛЬНОЕ ПРОСТРАНСТВО МОЗГА КРЫС

**Мусина Л.А.<sup>1</sup>, Шангина О.Р.<sup>1</sup>, Зайтов И.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУ "Всероссийский центр глазной и пластической хирургии"  
Минздрава РФ, <sup>2</sup>Республиканская клиническая больница им. Г.Куватова  
Минздрава РБ, Уфа, morphoplant@mail.ru

Введение. Вследствие того, что для нервной ткани не характерна полноценная регенерация, в нейрохирургии весьма актуальной проблемой является замещение послеоперационных объемных дефектов, появляющихся после удаления новообразований мозга, как доброкачественных, так в отдельных случаях и злокачественных. В тканевом банке ФГБУ "Всероссийский центр глазной и пластической хирургии" выпускается биоматериал Аллоплант для замещения объемных дефектов, который довольно успешно применяется в других областях хирургической практики.

Цель исследования. Оценить влияние биологического материала Аллоплант на структуры головного мозга.

Материал и методы исследования. Опыт проводился на 26 крысах породы Вистар. В опытной группе после трепанации черепа в теменной области субарахноидально вводился диспергированный биоматериал Аллоплант. Контрольной группе животных таким же образом укладывался кусочек нативного аллогенного биоматериала без какой-либо обработки. Животных выводили из опыта на 7, 14, 21 и 30 сутки. Для гистологического исследования иссеченные кусочки мозга фиксировали в 10% забуференном формалине, обезживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы изготавливали на микротоме LeicaRM2145 (Leica, Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином, по методам Ван Гизона, Маллори. Для микроскопического исследования использовали микроскоп AxioImagerZ1 (CarlZeiss, Германия).

**Результаты исследования и их обсуждение.** На 7 сутки после введения биоматериала Аллоплант в супраарахноидальное пространство крысы на гистологических препаратах на границе мягкой мозговой

оболочки и мозгового вещества определялись отдельные кусочки биоматериала. Они были несколько набухшими, гомогенизированными и слабо инфильтрировались полиморфно-ядерными нейтрофильными клетками, в то время как в окружающих тканях вокруг частиц биоматериала выявлялась макрофагально-фибробластическая реакция. Все оболочки мозга и расположенные под ними ткани мозгового вещества были слабо отечны. Между мягкой и паутинной оболочками граница не определялась. Эти слои за счет накопления интерстициальной жидкости и клеточной инфильтрации выглядели несколько утолщенными. Кровеносные сосуды мягкой оболочки были слабо расширены, и в них определялись признаки слабо выраженного стаза элементов крови. Строма мягкой оболочки инфильтрировалась небольшим количеством макрофагов и фибробластических клеток. Вблизи имплантированного биоматериала в молекулярном и в наружном зернистом слое коры мозга отдельные нервные клетки были с признаками дистрофических изменений в цитоплазме.

Через 14 суток нейтрофильная клеточная реакция вокруг частиц биоматериала Аллоплант сменилась смешанной инфильтрацией макрофагами, фибробластами и небольшим количеством лимфоцитов. Сами частицы были гомогенными, по краям инфильтрированы макрофагами, что свидетельствовало об активации их резорбирующей функции. В отдельных участках вблизи кусочков биоматериала сохранялись небольшие скопления эритроцитов, а в сосудах – слабо выраженные признаки стаза крови. Молекулярный слой коры мозга, содержащий редкие перикарионы, а также аксоны и дендриты и наружный зернистый слой были без особых изменений. Структура нейронов более глубоких слоев коры мозга сохранялась.

Морфологическая картина 21-х суток эксперимента отличалась от предыдущего срока исчезновением признаков отека мозговых оболочек, хотя они оставались еще несколько утолщенными. На границе между мозговым веществом и мягкой мозговой оболочкой непосредственно в месте введения диспергированного биоматериала Аллоплант вокруг нерезорбированных частиц биоматериала обнаруживались небольшие инфильтраты из клеток фибробластического ряда и макрофагов. Глубокие слои коры мозга были без видимых изменений.

Спустя месяц после введения в супрааракноидальное пространство аллогенного биоматериала признаки отека оболочек мозга полностью исчезали. Частицы биоматериала в месте введения под мозговыми оболочками не обнаруживались. На их месте формировалась нежная сеть из фуксинофильных тонких новообразованных коллагеновых волокон, похожая на рыхлую соединительную ткань.

В контрольной группе на 7 сутки после введения нативного аллогенного биоматериала под мозговые оболочки крысы выявлялся отек всех оболочек мозга и мозгового вещества. Между мягкой и паутинной оболочками граница не определялась, а сосуды мягкой оболочки были сильно расширены и полнокровны. Выявлялись выраженные признаки геморрагического пропитывания мозговых оболочек, при котором обнаруживались мелкие сливающиеся очаги кровоизлияния. Среди пропитанного кровью мозгового вещества определялись набухшие нервные клетки со светлой цитоплазмой с признаками дистрофических и деструктивных изменений. Вблизи имплантированного материала молекулярный слой коры мозга был интенсивно инфильтрирован сегментоядерными лейкоцитами. В значительном количестве они также обнаруживались в наружном зернистом слое коры мозга.

На 14 сутки эксперимента морфологические признаки геморрагического пропитывания мозговых оболочек по-прежнему сохранялись. Имплантированные пучки коллагеновых волокон местами подвергались некротическим изменениям. Некротизированные участки были интенсивно инфильтрированы не только сегментоядерными нейрофильными клетками, но и лимфоцитами. В зонах кровоизлияния ткань мозга разрушалась, в них обнаруживались сгустки крови. В таких участках наряду с очаговыми изменениями мозгового вещества, проявляющихся в виде отека и деструктивных изменений множества нервных клеток, определялись признаки пролиферативной реакции глиальных клеток и обнаруживались скопления крупных макрофагов, нагруженных липидными каплями - липофаги.

Через 3 недели морфологическая картина особых изменений не претерпевала. Она была аналогична вышеописанной. Большинство пучков коллагеновых волокон имплантированного материала под мозговой оболочкой набухло и выглядело несколько гомогенным. Паутинная и мягкая мозговые оболочки вокруг них были пропитаны кровяными клеточными элементами. Сосуды мягкой мозговой оболочки были расширены и с признаками стаза крови в них. Продолжали выявляться некротизированные участки имплантированного материала, инфильтрированные лимфоцитами и фибробластическими клетками.

Спустя 30 суток после введения нативного биоматериала в супрааракноидальное пространство крыс выраженные признаки отека мозговых оболочек исчезали. Пикринофильные пучки коллагеновых волокон имплантированного биоматериала были несколько гомогенизированы. Признаков интенсивного замещения имплантированного нативного аллогенного биоматериала новообразованными коллагеновыми волокнами не выявлялось. Наряду с редкими заместившимися участками биоматериала определялись

широкие полосы незамещенных участков. В коре мозга непосредственно под имплантированным материалом определялись обширные участки глиоза, замещающего разрушающиеся участки нервной ткани. В более глубоких слоях сосуды были с признаками интенсивной периваскулярной инфильтрации.

**Заключение.** Таким образом, введение нативного аллогенного биоматериала в супраарахноидальное пространство у крыс вызывает выраженную воспалительную реакцию окружающих тканей. Нативный биоматериал замещается не полностью. Окружающая ткань в результате воспаления частично некротизируется и замещается участками пролиферирующих глиальных клеток. В глубоких слоях коры мозга обнаруживаются признаки васкулита, что свидетельствует о переходе процесса воспаления с окружающих имплантат тканей на стенку кровеносных сосудов мозга. Воспалительная реакция тканей коры мозга и мозговых оболочек на введение диспергированного биоматериала Аллоплант в супраарахноидальное пространство крыс относительно слабо выражена. Биоматериал резорбируется макрофагами и замещается небольшим количеством тонких новообразованных коллагеновых волокон. Спустя месяц частицы биоматериала микроскопически не обнаруживаются. Слабо выраженная реакция коры мозга на биоматериал выявляется только в начальные сроки эксперимента. Появление небольшого количества лимфоцитов через две недели можно объяснить нарушением гематоэнцефалического барьера при введении биоматериала. Результаты исследования дают нам возможность предположения возможности применения аллогенного биоматериала для замещения объемных дефектов головного мозга.

*©Л.А.Мусина, 2015*

УДК 616.5-001.4-036.17-076.5-078.33

## **ВЛИЯНИЕ ЖИДКОГО СИЛИКОНА НА СТРУКТУРУ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА**

**Соловьева Е.П.**

ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»  
Минздрава РФ, г. Уфа, dikatang@gmail.com.

**Введение.** В офтальмохирургии силиконовое масло используется для замещения стекловидного тела при витрэктомии. Данная операция проводится для устранения отслойки сетчатки, пролиферативной ретинопатии, гигантских разрывов сетчатки, а также при помутнении и

значительной потере стекловидного тела [1, 2]. Принято считать, что силикон является биологически инертным, нетоксичным и нерезорбируемым материалом [3]. Наряду с большим числом публикаций, демонстрирующих оптимистический взгляд на применение силиконового масла, есть работы, в которых сообщается о развитии осложнений после применения данного материала. Известно, что после интравитреальных операций с замещением стекловидного тела силиконовым маслом отмечены случаи возникновения задней субкапсулярной катаракты, вторичной офтальмогипертензии, контактной кератопатии, образования эпиретинальных мембран, субконъюнктивальных кист, миграции силиконового масла в супрахориоидальное пространство и желудочки головного мозга [4, 5]. Природа этих осложнений до конца не изучена, остаются открытыми вопросы о влиянии жидкого силикона на внутренние оболочки глазного яблока, в частности на сетчатку.

**Цель исследования** выявление морфологических изменений в сетчатке глаза после введения силиконового масла

**Материалы и методы исследования.** Материалом для исследования морфологических изменений в тканях глаза после витрэктомии с замещением стекловидного тела силиконовым маслом послужили 8 энуклеированных глаз пациентов, имеющих в анамнезе данное оперативное вмешательство. Всем больным энуклеация глазного яблока была проведена по медицинским показаниям, вследствие развившегося хронического увеита и угрозы симпатического воспаления парного глаза.

Для гистологического исследования операционный фиксировали в 10% забуференном формалине, промывали, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Гистологические срезы изготавливали на микротоме LeicaRM2145 (Leica, Германия) и окрашивали гематоксилином и эозином, по методам Ван Гизона, Маллори. Иммуногистохимические исследования проводили с помощью непрямого иммунопероксидазного метода с использованием моноклональных антител (SantaCruzInc. 2010) к глиальному фибриллярному белку (GFAP) – для определения степени глиоза сетчатки. Для микроскопического исследования использовали микроскоп AxioImagerZ1 (CarlZeiss, Германия).

**Результаты исследования.** Во всех исследуемых глазных яблоках при микроскопическом исследовании определялись морфологические признаки дистрофии и глиоза сетчатки. Архитектоника слоев сетчатки была нарушена, в наружном и внутреннем плексиформных слоях определялись щелевидные и кистозные пространства. Местами наблюдалось уменьшение количества клеточных элементов, разрастание

глиальной ткани и отложение пигмента. Если обнаруживалось эмульгированное силиконовое масло, то в патологически измененной сетчатой оболочке определялись группы капель силиконового масла, окруженные коллагеновыми волокнами. В случаях, когда в витреальной камере глазного яблока находилось неэмульгированное силиконовое масло, на поверхности сетчатки, граничащей с силиконом, определялась так называемая фиброзная перисиликоновая мембрана. Она представляла собой разрастание коллагеновых волокон, располагающихся параллельно поверхности сетчатки, прилежащих к слою ганглиозных клеток. В тех случаях, где в глазных яблоках было обнаружено эмульгированное силиконовое масло, мельчайшие капли силикона проникали через образовавшуюся фиброзную мембрану в наружные слои сетчатки. При этом вокруг капель силиконового масла наблюдалось разрастание коллагеновых волокон и отложение пигмента. Во всех глазных яблоках наблюдались признаки глиоза сетчатки, что хорошо было видно при проведении иммуногистохимической реакции на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP).

**Обсуждение результатов исследования.** Можно предположить, что обнаруженные нами дегенеративно-дистрофические изменения в сетчатке связаны не только с последствиями травмы, но и с присутствием внутри глаза силиконового масла, которое оказывает механическое, а возможно и токсическое воздействие на клетки. Есть данные, что в сетчатке, независимо от вида использованного силиконового масла, отмечается потеря внутренних, наружных фоторецепторов и ганглиозных клеток, а также истончение и разрежение всех ее слоев [6]. По мнению ряда исследователей силиконовое масло активирует процессы разрастания глиальной ткани и нарушает процессы гликогенолиза, глюконеогенеза и метаболизма белков цитоскелета мюллеровских клеток в сетчатке [7].

Как видно из нашего исследования, длительная тампонада витреальной камеры силиконовым маслом может привести к миграции силиконового масла в сетчатку и другие ткани глаза. В целях предупреждения этого осложнения желательно по возможности как можно раньше удалять силиконовое масло из витреальной камеры. Соблюдать данные рекомендации предлагают и другие исследователи [8].

Обнаруженная нами в исследуемых глазных яблоках фиброзная (перисиликоновая) мембрана по внутренней поверхности сетчатки на границе с силиконовым маслом, возможно, образуется в ответ на контактирование сетчатки с силиконом, а также вероятно вследствие нарушения гематоофтальмического барьера и обмена веществ в сетчатой оболочке. Можно предположить, что присутствие данной мембраны в качестве барьера может само привести к нарушению обменных процессов в

сетчатке и хориоиде. Так называемая силиконовая пролиферативная ретинопатия может стать причиной повторной отслойки сетчатки после удаления силиконового масла [9]. Имеются сведения, что при длительной тампонаде силиконовым маслом, периодических отслойках сетчатки и прогрессирование пролиферативной витреоретинопатии в перисиликоновых мембранах обнаруживаются кроме макрофагов эпителиоидные клетки и гигантские многоядерные клетки. При проведении иммуногистохимического исследования в этих мембранах обнаруживаются цитокератины, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, лизоцим, антитела к CD68, регуляторным протеинам [10].

Таким образом, после введения в витреальную камеру микрокапли силикона проникают в сетчатку, вызывая в ней дегенеративно-дистрофические изменения глиоз и фиброз, а также способствуют образованию фиброзной мембраны на поверхности ганглиозного слоя сетчатки.

### Список литературы

1. Safety and feasibility of a novel intravitreal tamponade using a silicone oil/acetyl-salicylic acid suspension for proliferative vitreoretinopathy: first results of the Austrian Clinical Multicenter Study / M.T. Kralinger, U. Stolba, M. Velikay [et al.] // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2010. – Vol. 248. – P. 1193–1198.

2. Бурый, В.В. Клиническая эффективность микроинвазивной витрэктомии в реабилитации пациентов с осложнениями задних увеитов / В.В. Бурый, Н.Я. Сенченко, В.В. Малышев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. - Т. 82, № 6. – С. 14-16.

3. Subconjunctival deposit of silicone oil after vitreoretinal surgery / L.P. Cunha, H.P. Primiano Jr., A. Nakashima [et al.] // Arq. Bras. Oftalmol. – 2007. - Vol. 70, № 4. – P. 589-592.

4. Ichhpujani, P. Silicone oil induced glaucoma: A review / P. Ichhpujani, A. Jindal, L.J. Katz // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2009. – Vol. 247. - P. 1585–1593.

5. Intravitreal silicone oil migration into the subarachnoid space and ventricles: A case report and review of literature / J.X. Chen, A.E. Nidecker, N. Aygun [et al.] // Eur. J. Radiol. Extra. – 2011. – Vol. 78, № 2. – P. 81-83.

6. Intraocular silicone oil tamponade. A clinico-pathologic study of 36 enucleated eyes / H.L. Knorr, A. Seltsam, L. Holbach, G.O. Naumann // Ophthalmologie. – 1996. – Vol. 93, № 2. – P. 130-138.

7. Response of Müller cells following experimental lensectomy-vitreotomy / Y.K. Durlu, S.-I. Ishiguro, A. Yoshida [et al.] // Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 1990. – Vol. 228. – P. 44-48.

8. Ocular tissue after intravitreal silicone oil injection. Histologic and electron microscopy studies / C. Eckardt, U. Nicolai, M. Czank, D. Schmidt // *Ophthalmologie*. – 1993. – Vol. 90, № 3. – P. 250-257.

9. Perisilicone proliferation after vitrectomy for proliferative vitreoretinopathy / H. Lewis, J.M. Burke, G.W. Abrams, T.M. Aaberg // *Ophthalmology*. – 1988. – Vol. 95, № 5. – P. 583-591.

10. Histopathological and ultrastructural characteristics of oil-associated complications in silicone oil-filled human eyes / X.F. Zhong, Y.P. Li, J.X. Lin [et al.] // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 31-36.

©Е.П. Соловьева, 2015

УДК 577.38

## АДАПТАЦИЯ МЕТОДА ПРИЧИННОСТИ ПО ГРЕЙНДЖЕРУ ДЛЯ АНАЛИЗА СВЯЗАННОСТИ ОБЛАСТЕЙ МОЗГА ПРИ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

Сысоева М.В.<sup>1</sup>, Ситникова Е.Ю.<sup>2</sup>, Сысоев И.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Саратовский государственный технический университет  
имени Гагарина Ю.А.

<sup>2</sup> Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Москва

<sup>3</sup> Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского

Абсансная эпилепсия является неконвульсивной генерализованной эпилепсией неизвестной этиологии. Клинически абсансные разряды проявляются как внезапное короткое ухудшение сознания (абсансы), когда нормальная активность прерывается, быстрота реагирования уменьшается и мыслительное функционирование подавляется. Предсказание разрядовой активности по локальным потенциалам мозга или поверхностной электроэнцефалограмме (ЭЭГ) – это сложная задача, которая стимулирует специалистов по физике и математике разрабатывать новые подходы к анализу данных ЭЭГ, которые могут быть крайне значимы в клинической перспективе.

Согласно современным представлениям, пик-волновые разряды формируются на фоне аномально высокой синхронизации в таламо-кортикальной системе [1, 2]. У больных с абсансной эпилепсией нет показаний для инвазивных исследований и хирургических вмешательств, что ограничивает получение информации о нейробиологических механизмах этого заболевания. Экспериментальную работу в данном

направлении традиционно проводят на крысах двух инбредных линий с генетической предрасположенностью к абсанс-эпилепсии - GAERS и WAG/Rij [3, 4]. Фармакологические, поведенческие и электроэнцефалографические признаки абсансной эпилепсии у этих животных аналогичны таковым у человека; эпилептическая активность формируется спонтанно вследствие нарушения функций таламо-кортикальной системы [5, 1]. Для исследования таламо-кортикальных взаимодействий в процессе развития пик-волнового разряда был использован математический аппарат анализа связанности.

В сравнении с традиционными методами поиска связанности, такими как кросс-корреляция, когерентность, фазовая синхронизация, грейнджеровская причинность [6] может определять слабые или скрытые взаимодействия, которые не обязательно ведут к синхронизации, и вслед за изменениями в силе связи также определяет изменения в направлении связи. Исходно причинность по Грейнджеру была разработана, чтобы определять наличие и направление связи между двумя системами. Основная идея этого метода заключается в построении предсказательных моделей, и если данные из первого временного ряда помогают точнее предсказывать поведение второго, то считается, что первая система влияет на вторую. В своей оригинальной работе Грейнджер использовал только линейные предсказательные (авторегрессионные) модели; новые нелинейные модели успешно применяются в настоящее время. Выбор подходящих параметров модели (параметризация) важен: даже в линейной грейнджеровской причинности выбор размерности модели (число точек в прошлом, которые используются для предсказания) имеет большое влияние на предсказательную способность. В нелинейных моделях тип и количество нелинейных функций так же важно.

Ошибочная параметризация может стать причиной ложных результатов: слишком простые модели ведут к пропущенным связям, слишком сложные и универсальные – к ненадёжным оценкам коэффициентов модели и часто – к ложным выводам. Однако возможно улучшить метод, адаптируя структуру модели к экспериментальным данным, при этом их свойства используются для установления параметров модели. Таким образом, можно снизить число коэффициентов модели и, как следствие, меньшая длина временных рядов может быть использована для её построения, давая возможность иметь более высокое временное разрешение при применении нелинейной причинности по Грейнджеру в скользящем окне. Такой подход был назван нами адаптированной грейнджеровской причинностью. В данной работе он разрабатывается и применяется к сигналам локальных потенциалов, записанным *in vivo* с помощью внутрочерепных электродов, установленных в коре и таламусе крыс линии WAG/Rij – животных

моделей абсансной эпилепсии. В частности, изучается динамика кортико-кортикальных, кортико-таламических и таламо-таламических взаимодействий при переходе от преиктальной к иктальной фазе.

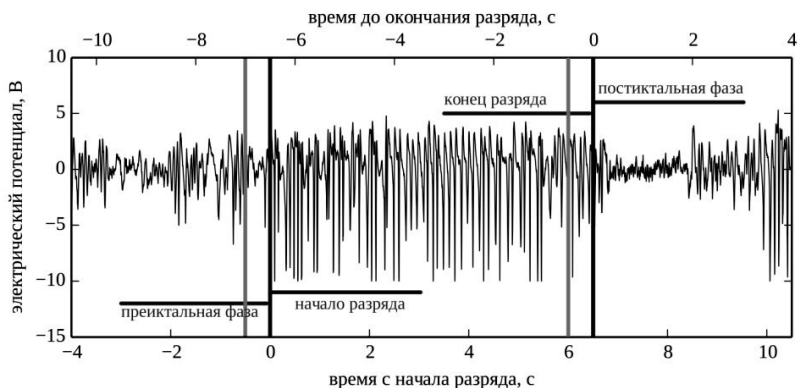


Рис. 1. Пример пик-волнового разряда (лобная кора) и исследованные интервалы ЭЭГ до, во время и после разряда. Прямоугольником показано скользящее окно (шириной 500 мс).

У каждого животного были рассчитаны значения улучшения прогноза (количественной характеристики причинности по Грейнджеру)  $PI$  в интервалах времени, начинавшихся за 10 с до начала разрядов и заканчивавшихся через 10 с после их окончания (Рис. 1).

Значения  $PI(t)$  были нормированы для исключения фоновой составляющей  $PI_{bg}$ . Фоновый уровень  $PI_{bg}$  был рассчитан как среднее значение  $PI$  в течение 7-секундного интервала до начала ПВП (от 10 с до 3 с). Для статистического анализа использовали нормированные значения  $PI_0(t) = PI(t) - PI_{bg}$ .

Значимый сдвиг значения  $PI_0$  в сторону положительных значений можно трактовать как большую связанность по сравнению с фоном, а в сторону отрицательных – как меньшую связанность. Статистический анализ выполнен на всей выборке значений  $PI_0(t_n)$ , полученных от 5 крыс в один и тот же момент времени  $t_n$ . Значимость отличий от нуля определяли с помощью двустороннего  $t$ -теста Стьюдента ( $p < 0.05$ ). Поскольку многократное использование этого теста, как

известно, увеличивает вероятность ложно положительных выводов, статистическая значимость была установлена при условии  $p < 0.05$  у трёх и более последовательных значений [7].

Проведен анализ двухсторонних взаимодействий в таламо-кортикальной системе путем расчета причинности по Грейнджеру с использованием адаптированной нелинейной модели. На Рис. 2 представлены результаты статистического анализа взаимных влияний таламуса и неокортекса во время всех ПВР, зарегистрированных у 5 крыс (всего 218 ПВР, от 10 до 94 у каждого животного).

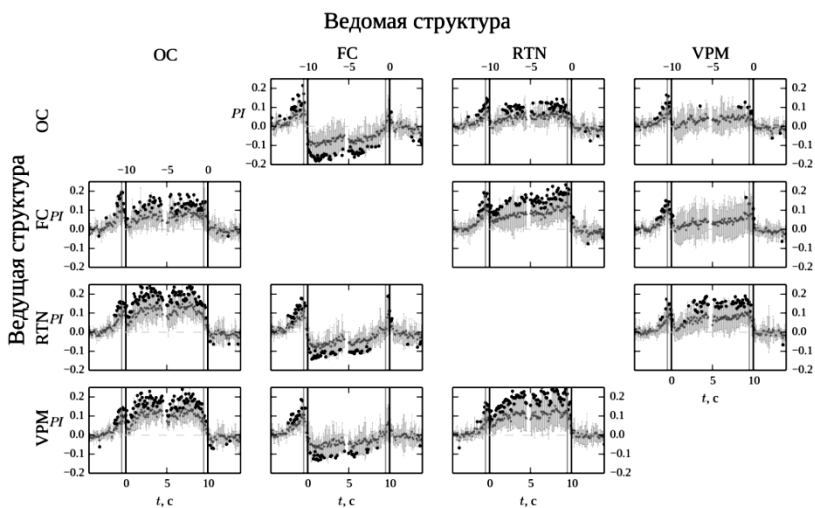


Рис 2. Результаты статистического анализа таламо-кортикальных взаимодействий в течение ПВР с использованием адаптированной нелинейной причинности по Грейнджеру. Показана зависимость значений улучшения прогноза от времени  $PI(t)$  для различных пар отведений, жирными точками обозначены значения, значимо отличавшиеся от фоновых ( $p < 0.05$ ).

Анализировалась направленность взаимных влияний между лобной и затылочной областями коры, а также таламусом (ретикулярное и вентропостеромедиальное ядра) во время эпилептических пиковолновых разрядов на ЭЭГ у крыс WAG/Rij. Установлены следующие факты:

1) За несколько секунд до начала ПВР (т.е. во время инициации эпилептической активности) был обнаружен значимый рост причинности

по Грейнджеру между всеми исследованными областями, что свидетельствует об усилении взаимных влияний в таламо-кортикальной системе.

2) Момент начала ПВР сопровождался резким изменением причинности по Грейнджеру (усиление или ослабление). Таким образом, таламо-кортикальная сеть совершила быстрый переход в неустойчивое состояние, которое длилось около 1 секунды.

3) Через секунду после начала ПВР значения причинности по Грейнджеру достигали устойчивого уровня и значимо отличались от фоновых. В это время (т.е. в процессе поддержания пик-волновой активности) наблюдали усиление (по сравнению с фоном) влияний таламуса (RTN и VPM) на затылочную кору, следовательно, таламус играл ключевую роль в процессе поддержания ПВР. Одновременно отсутствовали влияния коры (лобной и затылочной) на VPM, что может свидетельствовать о пассивной роли коры в процессе поддержания ПВР.

4) В момент окончания ПВР наблюдали резкое изменение причинности по Грейнджеру, значения которой возвращались к уровню фона. Таким образом, процесс прекращения ПВР сопровождался возвращением таламо-кортикальных взаимодействий к исходному состоянию.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 13-04-00084, № 14-02-00492), гранта Президента РФ для поддержки ведущих научных школ НШ-1632.2012.2 и стипендии Президента РФ для молодых учёных СП-1510.2015.4.

### Список литературы

1. Sitnikova E. Thalamo-cortical mechanisms of sleep spindles and spike-wave discharges in rat model of absence epilepsy (a review). *Epilepsy Res.* 2010. 89(1):17-26.

2. Lüttjohann A., Schoffelen J.M., van Luijtelaar G. Peri-ictal network dynamics of spike-wave discharges: phase and spectral characteristics. *Exp Neurol.* 2013. 239: 235-247.

3. Marescaux C., Vergnes M., Depaulis A. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg — a review. *J. Neural. Transm. (suppl).* 1992. 35: 37-69.

4. Coenen A.M.L., van Luijtelaar E.L.J.M. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats. *Behav Genetics.* 2003. 33: 635-655.

5. Meeren H.K., Pijn J.P., Van Luijtelaar E.L., Coenen A.M., Lopes da Silva F.H. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats. *J. Neurosci.* 2002. 22(4): 1480-1495.

6. Granger C.W.J. Investigating Causal Relations by Econometric Models and Cross-Spectral Methods. *Econometrica* 1969; 37(3): 424-438.

7. Maris E., Oostenveld R. Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J. Neurosci. Method.* 2007. 164(1): 177–190.

©М.В. Сысоева, 2015

УДК: 616 — 089.843

## **РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ДЕЙСТВИИ ОКСИДА УГЛЕРОДА**

**ОдинцоваИ.А., СлуцкаяД.Р., ГребенюкА.Н., ТолкачП.Г.**

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург,  
dina\_hanieva@mail.ru

В составе газообразных продуктов горения угарный газ является основным поражающим элементом. Структуры нервной системы испытывают поражающее воздействие как в раннем периоде воздействия, так и в отдаленном. Изучение нейротоксического эффекта в результате отравления оксидом углерода позволит расширить представления о механизмах его воздействия на структуры нервной системы, а также будет способствовать оптимизации существующих и разработке новых схем лечения.

**Цель исследования** – изучить морфофункциональные изменения нейронов коры больших полушарий крыс при действии оксида углерода.

**Материал и методы.** Для исследования брали головной мозг крыс линии Вистар, разделенных на три группы – интактные животные; животные, подвергшиеся действию угарного газа; животные, подвергшиеся действию угарного газа, после чего получившие внутривенно лекарственный препарат – нейропротектор (синтетический аналог тафцина). Головной мозг фиксировали в 10% растворе формалина. Готовили гистологические срезы по стандартной методике, и окрашивали гематоксилином и эозином.

**Результаты и их обсуждение.** При изучении срезов головного мозга крыс контрольной группы, окрашенных гематоксилином и эозином, в коре больших полушарий отчетливо выделяется шесть слоев, представленных различными по морфологии клетками. Молекулярная пластинка коры сравнительно широкая, представлена мелкими мультиполярными нейронами, основной объем пластинки занимают нервные волокна. Наружная зернистая пластинка образована мелкими пирамидными и

звездчатыми нейронами с высокой частотой расположения. Наружная пирамидная пластинка коры больших полушарий крыс представлена пирамидными нейронами с округлыми ядрами, хорошо выраженной цитоплазмой. Встречаются нейроны мелкие, средние и крупные. Внутренняя зернистая пластинка узкая, образована мелкими звездчатыми нейронами. Внутренняя пирамидная пластинка (ганглионарный слой) коры образована крупными и средними пирамидными нейронами, а также небольшим числом звездчатых нейронов. Мультиформная пластинка образована разнообразными по форме нейронами. Преобладают нейроны веретеновидной формы, лежащие на большом расстоянии друг от друга и малые пирамидные нейроны. К коре прилежит белое вещество, образованное миелиновыми нервными волокнами и клетками глии.

При изучении срезов коры больших полушарий головного мозга крыс опытной группы выявляются выраженные изменения нейронов V слоя, представленных средними и крупными пирамидными нейронами, а также изменения сосудов микроциркуляторного русла. В коре головного мозга при окраске гематоксилином и эозином выявлены нейроны с интенсивно окрашенной цитоплазмой, плохо просматриваемыми ядрами. У крупных пирамидных нейронов ганглионарного слоя коры меняются тинкториальные свойства цитоплазмы. У большинства нейронов наблюдается набухание тела и усиление оксифилии цитоплазмы. Ядра и ядрышки таких клеток увеличены и диффузно окрашены. Указанные изменения выявлялись у  $46,12 \pm 2,36\%$  исследованных нейронов.

Также в ганглионарном слое встречаются нейроны с нечеткими контурами. Ядра таких нейронов уменьшены в размерах, гиперхромные, округлой формы, смещенные к периферии клетки.

Наиболее тяжелые изменения нейронов приводят к гибели клеток. В препаратах второй серии в некоторых пирамидных нейронах V слоя коры больших полушарий выявлен кариопикноз. В ганглионарном слое коры больших полушарий головного мозга крыс опытной группы встречаются также клетки с более бледной окраской тела и ядра и клетки-тени. Доля необратимо измененных нейронов, включающих нейроны с признаками кариопикноза, клетки-тени, составила  $28,10 \pm 1,5\%$ .

В нейронах III слоя (наружная пирамидная пластинка) коры больших полушарий головного мозга крыс опытной группы реактивные изменения нейронов не выявлены.

В третьей серии эксперимента в препаратах коры больших полушарий головного мозга крыс изменений нейронов в наружной пирамидной пластинке (III слой коры) не наблюдается. В ганглионарном слое (V слой) коры больших полушарий снижается количество клеток с кариопикнозом. Однако в некоторых нейронах данного слоя наблюдается

кариорексис. Форма тела таких нейронов меняется, границы ядер не определяются.

При изучении препаратов второй и третьей серии эксперимента отчетливо выявляются изменения сосудов микроциркуляторного русла. Кровенаполнение венул и капилляров резко выражено во второй серии опытов. Эндотелий кровеносных сосудов характеризуется набуханием ядер эндотелиоцитов, кариопикнозом и отеком клеток. В третьей серии эксперимента наблюдается нормализация состояния стенок сосудов микроциркуляторного русла.

Полученные данные согласуются с общебиологическими изменениями тканевых структур при неблагоприятных воздействиях физических и химических факторов [1, 2, 3]. При введении лекарственного препарата – нейропротектора наблюдается тенденция к минимизации выявленных реактивных изменений нейронов.

### **Список литературы**

1. Пирцхалава А.В., Лужников Е.А. Особенности клиники и лечения острых отравлений окисью углерода // Неотложная клиническая токсикология: руководство для врачей. – М.: Медпрактика-М. - 2007. - С. 555-562.

2. Chang Y., Chang W., Huang S. Neuroimaging studies in carbon monoxide intoxication // Neuroimaging - Cognitive and Clinical Neuroscience. – 2012. - Vol. 12. – P. 353-374.

3. Piantadosi C.A. Carbon monoxide intoxication // Update in Intensive Care and Emergency Medicine. – 1990. – Vol. 10. – P. 460-471.

*©И.А. Одицова, 2015*

УДК 576.3

## **ВЛИЯНИЕ ОВАРИОЭКТОМИИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ НЕЙРОНОВ ПЕРЕДНЕГО КОРТИКАЛЬНОГО ЯДРА МИНДАЛЕВИДНОГО КОМПЛЕКСА МОЗГА КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ**

**Садртдинова И.И.**

Башкирский государственный университет, Уфа, indira.ildarovna@mail.ru

**Введение.** Несмотря на наличие большого количества экспериментальных работ, посвященных вопросу участия

миндалевидного комплекса (МК) мозга в обеспечении нейроэндокринных взаимодействий, роль выявленных на его территории зон полового диморфизма в регуляции репродуктивных процессов остается не выясненной (Акмаев И.Г., Гриневиц В.В., 2003; Акмаев И.Г., Калимуллина Л.Б., 1993; Хисматуллина З.Р., 2009; Лекомцева Е.В., 2006; Aggleton, J.P., 2000). Одной из основных зон полового диморфизма МК мозга является переднее кортикальное ядро (СОа). Вопрос об ультраструктурных перестройках, происходящих в нейронах СОа под влиянием половых гормонов до конца не изучен.

Целью нашего исследования было изучение ультраструктурных особенностей нейронов переднего кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга у самок крыс линии WAG/Rij до и после овариоэктомии.

**Материалы и методы исследования.** Материал для электронно-микроскопических исследований был взят в двух группах: у крыс контрольной группы и у крыс после овариоэктомии. Хирургическую овариоэктомию проводили под эфирным наркозом по общепринятой методике (Кабак Я.М., 1968). Нами проводился количественный анализ нейронов с различными типовыми формами морфологической изменчивости, отражающие степень функциональной активности, при разных уровнях половых гормонов.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Исследование морфофункционального состояния нейронов СОа МК мозга проводили на микрофотографиях при увеличении от  $\times 4000$  до  $\times 15000$ . Всего было проанализировано 75 нейронов у крыс контрольной группы и у овариоэктомированных самок – 29.

При электронно-микроскопическом исследовании СОа МК мозга у животных нами обнаружены следующие формы морфологической изменчивости нейронов в зависимости от степени хромофилии их цитоплазмы (Лютикова Т.М., 1980): нормохромные, гипохромные, гиперхромные и пикноморфные клетки.

В контрольной группе доля нормохромных нейронов от нейрональной популяции составляла 58%, гиперхромных – 21%, гипохромных – 16%, пикноморфные были единичными (5%). Таким образом, большинство нейронов были нормохромными с типичной для них цитоплазмой, которая не претерпевала сильных изменений.

Электронно-микроскопические исследования показали, что у самок группы контроль ультраструктура нейронов и его субклеточная организация характеризуется высокой структурно-функциональной активностью. Нейрон окружен сплошной плазматической мембраной, которая четко определяет его границы. Нейроны имеют овально-округлую форму с отходящими в разные стороны отростками. Ядра клеток - крупные, ядерная оболочка состоит из двух мембран –

внутренней и наружной, разделенных перинуклеарным пространством шириной 50-150 нм. Ядрышко компактное, с преимущественно гранулярным компонентом, имеющее, как правило, эксцентричное положение в ядре. Кариолема имеет поры и образует незначительные инвагинации. Хроматин мелкозернистый, с формированием рыхлых гранулярных скоплений в центре и более плотных на периферии ядра. Хроматин ядра представлен гетеро- и эухроматином. Скопления гетерохроматина наблюдались в ядре гиперхромного нейрона. А эухроматин располагался в местах разряжения матрикса. Небольшое количество рибосом прикрепляется к наружной поверхности ядерной оболочки.

Цитоплазма нейронов СОа крысы богата органеллами. Особенно хорошо видны все входящие в состав ядерного матрикса и гиалоплазмы структуры в гипохромных нейронах, т.к. они электронно-прозрачны. Митохондрии многочисленны, овальной и круглой формы, преимущественно мелких и средних размеров. Эндоплазматический ретикулум хорошо развит и представлен широкими, лежащими почти параллельно цистернами, разделенными одинаковыми промежутками, с содержанием на наружной поверхности умеренного количества связанных рибосом. В некоторых клетках рибосомы образуют группы – полисомы и находятся вблизи ядерной оболочки. Кроме того, хорошо развит комплекс Гольджи, представленный как пластинчатыми структурами, так и большим количеством крупных и мелких вакуолей.

После овариэктомии количество нормохромных и гиперхромных нейронов снизилось по сравнению с контрольной группой и составило 20 % и 10 %, соответственно. Однако увеличилась доля гипохромных нейронов до 40 %, а пикноморфных до 30 %. Таким образом, большинство нейронов были гипохромными и пикноморфными.

Нами установлено наличие изменений ультраструктур ядерного и энергетического аппаратов клетки, комплекса Гольджи и других органелл цитоплазмы. Среди измененных нейронов отмечали два основных типа: умеренно измененные и нейроны со значительными деструктивными изменениями. Последние были представлены сморщенными нейронами, в которых обнаруживаются вакуолизация, разрушение ядра и цитоплазматических органелл.

Клеточное ядро умеренно измененных клеток - светлое, богатое эухроматином, в нем наблюдается увеличение размеров ядрышка и его смещение к кариолемме. Ядрышко крупное, сферической формы, расположено эксцентрично. На поверхности ядрышка располагается сателлит ядрышка. С внутренней стороны кариолеммы наблюдается скопление гранул рибонуклеопротеинов, а также их выход в цитоплазму, свидетельствующее о высокой метаболической активности ядра.

Возможно, это связано с необходимостью устранения возникших повреждений в цитоплазме. Кроме того, происходит возрастание складчатости ядерной оболочки и увеличение числа открытых ядерных пор, через которые возможен выход гранул рибонуклеопротеинов в цитоплазму и разрушение наружной мембраны. Прослеживаются плотные контакты между наружной ядерной мембраной и митохондриями, что указывает на напряженное функциональное состояние клетки и повышение активности нуклеопротеинового синтеза, а также между митохондриями и комплексом Гольджи, что у А.А. Маниной (1971) трактуется как повышенная потребность ядра и других органелл в энергии в виде аденозинтрифосфорной кислоты. В некоторых нейронах цистерны комплекса Гольджи приобретают изогнутый вид, т.е. он становится кольцевидным. Часто в нейронах овариэктомированных крыс встречаются деструктивно измененные, фрагментированные, местами расширенные цистерны комплекса Гольджи.

Основная масса рибосом была представлена в цитоплазме в виде полисом, но встречались и отдельно расположенные рибосомы. Обилие полисом показывает активизацию процессов трансляции. Отмечали расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, умеренное набухание митохондрий. Поскольку для большинства процессов, происходящих в клетке требуется энергия, многие митохондрии находились в состоянии гиперфункции – усилении выработки энергии, т.е. происходили процессы авторегуляции клеткой энергетических затрат (Манина А.А., 1971). В целом, клетки содержали как неизмененные морфологически митохондрии, так и измененные. Зарегистрировано образование значительного количества лизосом в различных функциональных состояниях, в том числе фаголизосом и липофузинных телец.

**Заключение.** Итак, проведенный нами анализ ультраструктурных перестроек нейронов СОа после овариэктомии свидетельствует о наличии в них качественных и количественных изменений, как в ядре, так и в органеллах цитоплазмы. Большую часть клеточной популяции в контрольной группе занимали нормохромные нейроны. Наблюдаемые морфологические изменения после овариэктомии указывают на мобилизацию энергетических ресурсов и повышение функциональной деятельности нейрона, которые связаны с нуклеопротеиновым синтезом, что является проявлением развития приспособительно-компенсаторных реакций в рассматриваемых клетках и обеспечивает адаптацию нейронов к дефициту гормонов, т.е. идет процесс восстановления. Вместе с тем, в некоторых нейронах прослеживается процесс деструкции.

#### **Список литературы**

1. Акмаев И.Г., Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. М., Медицина, 2003, 168 с.

2. Акмаев И.Г. Миндалевидный комплекс мозга: функциональная морфология и нейроэндокринология / И.Г. Акмаев, Л.Б. Калимуллина. - М.: Наука, 1993- 269 с.

3. Хисматуллина, З.Р. Миндалевидный комплекс мозга в системе регуляции репродуктивных функций организма: дис. ... д-ра биол. наук : 16.00.02 / Хисматуллина Зухра Рашидовна. - Уфа, 2009. - 293 с.

4. Лекомцева, Е.В. Патогенетические механизмы участия гиппокампальной формации и стриарного комплекса при нарушениях центральной нейроэндокринной регуляции / Е.В. Лекомцева // Украинський медичний часопис. - 2006. - №2. – С. 57-64.

5. Манина, А. А. Ультраструктурные изменения и репаративные процессы в центральной нервной системе при различных воздействиях / А. А. Манина. – Л.: Медицина, 1971. – 200 с.

6. Aggleton, J. P. The Amygdala: a Functional Analysis / J. P. Aggleton. - 2nd Edn New York: Oxford University Press, 2000. - 690 p.

*©И.И.Садртдинова, 2015*

УДК 612.821

## **МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЗЖЕЧКА ПРИ ДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ**

**Насырова Е.В.<sup>1</sup>, Шишкин И.В.<sup>1</sup>, Азнабаев О.Ф.<sup>2</sup>,  
Хисматуллина З.Р.<sup>1</sup>, Лобанов С.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа,

<sup>2</sup>Башкирский государственный педагогический университет, Уфа,  
lobanovprof@yandex.ru

Внешние факторы оказывают на организм самые разнообразные влияния. В одних случаях они могут способствовать развитию адаптивных механизмов, если не превышают границ физиологической нормы для данного организма. В других случаях они способствуют формированию механизма полома и ведут к нарушению, как структуры, так и функции клеток [1,2,3].

Резкое изменение условий внешней среды, несущее угрозу организму, как было выявлено запускает сложную адаптивную реакцию. В этой адаптивной перестройке активно участвует и нервная система.

Мозжечок, как и нервная система в целом, обладают огромными

клеточными и функциональными резервами. Общепринятым является представление о том, что только малый процент нейронов мозжечка постоянно находится в активном функциональном состоянии. Структурная и функциональная активность этих клеток существенно возрастает при действии различных экстремальных факторов.

Необычные факторы окружающей среды, действующие на организм, например, такие как алкоголь способны оказывать неблагоприятное влияние на него. По длительности воздействия на организм эти факторы могут быть различными. В одних случаях организм компенсирует их действие за счет имеющихся резервов, в других они требуют адаптационной перестройки [2,3,4].

Анализ данных литературы как отечественных, так и зарубежных исследователей, позволяет отметить, что в морфологии и физиологии нервной системы остается много нерешенных вопросов [2,3]. Остаются до конца неясными многие ультраструктурные механизмы ответных реакций, а также субклеточные аспекты различной деятельности мозжечка. До конца остаётся не изучена структурно-функциональная активность нейронов и клеток глии мозжечка и их синаптических структур, как в течение жизни, так и в зависимости от физиологических состояний. Не установлены механизмы образования новых ультраструктурных связей в нервной системе и активации существующих. Остаются не полностью выяснены многие ультраструктурные механизмы адаптации нейронов и клеток глии мозжечка к новым функциональным состояниям, в том числе изменениям внутренней и внешней среды.

**Целью** нашей работы явилось выявление особенностей структурнофункциональных изменений мозжечка экспериментальных животных при действии алкоголя.

#### **Материалы и методы исследований**

Мозжечок в норме исследовался на материале 13 интактных крыс породы Вистар с массой тела от 180 до 210 г для выявления структурных особенностей. Эксперименты проводились на крысах породы Вистар с массой 205 г. в осенне-зимний период в дневное время в течение 90 суток. Они содержались в стандартных условиях вивария (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г., Приказ Минздрава СССР № 1509 от 30 декабря 1983 г.).

Алкоголь вводился интраперитонеально (26 крыс) ежедневно в виде 20% раствора из расчёта 1 г/кг массы тела животного [5, 6] интраперитонеально в течение 90 суток. Из эксперимента животные выводились на 3, 7, 14, 30 и 90 сутки (передозировкой наркоза).

Морфофункциональные и ультраструктурные исследования проводились с помощью гистологических методов - окрашиванием

препаратов гематоксилин - эозином, гистохимических методов - окрашиванием стандартных гистологических срезов метиленовой и толуидиновым синим. Проводилась дифференцировка разных классов ГАГ окрашиванием альциановым синим при разных pH и молярностях ( $MgCl_2$ ) с последующим метилированием и ферментативным контролем. Затем исследовались на анализаторе фореограмм - АФ-2 и проводился полуколичественный анализ. Изучение кровеносных сосудов микроциркуляторного русла осуществлялось при окрашивании препаратов гематоксилин - эозином, импрегнацией азотно-кислым серебром по В. В. Куприянову, с помощью электронной микроскопии. Экспериментальный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере при pH 7,2 - 7,6. Для трансмиссионной электронной микроскопии материал фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере, при pH 7,2 - 7,4 с последующей дофиксацией в 1% растворе четырехокси осмия ( $OsO_4$ ) в течение одного часа, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации от 50 - до 96% и ацетоне. Материал заливали смолой ЭПОН - 812. Ультратонкие срезы готовились на ультратоме LKB- III и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Экспериментальный материал исследовался на электронном микроскопе ЭМВ - 100 БР или JEM- 100S, при ускоряющем напряжении 75 кВ и 90 кВ. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически и графически в операционной среде WINDOWSXP, системе электронных таблиц EXCELXP в составе интегрированной офисной системы, включающей редактор текста WORDXP.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Комплексные морфологические исследования позволили выявить, что мозжечок имеет сложное строение. В ткани мозжечка различаются клеточные элементы и межклеточный матрикс.

После введения алкоголя у части животных наблюдалось снижение двигательной активности, у другой части она оставалась практически без изменений. На следующие дни после употребления алкоголя крысы были агрессивны и с повышенной двигательной активностью. Чаще всего крысы собирались в группы, тесно прижавшись, друг к другу. По мере увеличения сроков эксперимента у части животных появилась пассивность. Употребление пищи крысами снизилось. В этой экспериментальной группе животных новорожденные крысята появились только у 2 самок. Из 11 новорожденных крысят в течение месяца выжило только 7. Комплексные морфофункциональные исследования показывают, что к 3-7 суткам эксперимента гистологическая картина мозжечка практически не отличается от картины, наблюдаемой в контрольной группе. Электронно - микроскопически клеточная мембрана

нейронов мозжечка без каких-либо видимых изменений. Ядра содержат небольшое количество неравномерно распределенного хроматина. В мембранах ядер отмечается наличие крипт. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла мозжечка были представлены всеми звеньями. Наблюдалась дилатация сосудов. Стенки капилляров отечны и утолщены. В цитоплазме эндотелиальных клеток выявляются пиноцитозные пузырьки.

В нейронах Пуркинье присутствуют первичные лизосомы, рядом в виде групп выявляются митохондрии. Канальцы эндоплазматического ретикулума умеренно расширены и содержат на мембранах рибосомы. В гиалоплазме наблюдаются гетерогенные цитогранулы располагающиеся около митохондрий. Нейрофиламенты несколько утолщены, контуры их слегка размыты. Митохондрии округлой или овальной формы. У части этих органелл отмечаются разрывы внутренней мембраны. Матрикс большинства митохондрий плотный, но в отдельных органеллах наблюдается его пятнистое просветление.

Гистохимические исследования показывают, что содержание и соотношение разных классов гликозаминогликанов в мозжечке крыс изменяется в сторону увеличения содержания сульфатированных ГАГ при действии алкоголя.

Морфометрические исследования показывают изменения, связанные с увеличением комплекса Гольджи и по сравнению с ЭПР в нейронах мозжечка при действии алкоголя.

К 14-30 суткам эксперимента было выявлено, что действие алкоголя приводит к изменению структуры и функции клеток мозжечка. Нейроны в этот период имеют в основном округлую или овальную форму и с ними контактируют клетки глии. Объем клеток увеличен. Ядра нейронов содержат диспергированный хроматин. Ядрышко локализуется в центральной части ядра. Цитоплазматический матрикс этих нейронов был светлее по сравнению с матриксом клеток контрольной группы.

Плазмалемма нейронов мозжечка имела размытые контуры, хотя сохраняла первоначальную ультраструктуру. У некоторых нейронов мозжечка клеточная мембрана четко не выявлялась на более значительных участках.

Рибосомы и полисомы были фиксированы на мембранах канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума и рассеяны в гиалоплазме в виде полисом разных размеров. Гранулярный эндоплазматический ретикулум представлен густо разветвленной сетью расширенных канальцев. Просвет канальцев заполнен мелкозернистым, реже - тонковолокнистым содержимым с повышенной электронной плотностью по сравнению с окружающей гиалоплазмой. Комплекс Гольджи подковообразной формы с выраженной цис- и трансповерхностями.

Количество везикул в этих клетках существенно увеличивается по сравнению с контрольной группой. Особенно заметно возрастает число мелких окаймленных везикул, связь которых как с канальцами гранулярного эндоплазматического ретикулума, так и с цистернами цис-поверхности комплекса Гольджи выявлялись часто. Митохондрии принимают округлую или бобовидную форму с набухшим и просветленным матриксом, их кристы укорачиваются, подвергаются деструкции. Количество митохондрий уменьшается. В цитоплазме нейронов выявляются тонкие микротрубочки, расположенные в виде небольших групп, или по отдельности, в основном около мембранных структур. Нейрофибриллы встречались в виде небольших пучков вблизи плазмалеммы и были ориентированы вдоль ее поверхности. Лизосомы имели повышенную электронную плотность по сравнению с цитоплазмой и были представлены первичными лизосомами.

Включения в этих клетках выявлялись в виде единичных осмиофильных образований. Гранул гликогена не выявлено. Морфометрический анализ позволил выявить существенные изменения объёма митохондрий и ЭПР - ультраструктурных элементов нейронов.

К 60-90 суткам эксперимента на гистологических препаратах мозжечка выявляются явления разрыхления и просветления межклеточного матрикса. Эти явления характеризовались выраженной гетерогенностью ткани мозжечка, что в большей степени прослеживалось вокруг нейронов и в особенности около клеток Пуркинью.

Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла с явлениями дилатации и выраженным периваскулярным отеком.

Гистохимические исследования гликозаминогликанов мозжечка показали, что содержание и соотношение их разных классов существенно отличается от более ранних сроков эксперимента. Эти изменения связаны с возрастанием содержания слабосульфатированных ГАГ, таких как хондроитин-сульфаты, с преобладанием среди них хондроитин-4-сульфатов.

В клетках происходят заметные изменения ядра (уменьшение объема и деформации). Усиливается конденсация хроматина, как вдоль ядерной мембраны, так и в центре ядра. Наблюдается тенденция к децентрализации и разрыхлению ядрышек. Плазмалемма на значительных участках клеточной поверхности не выявляется.

Комплекс Гольджи локализован в небольшом объеме цитоплазмы и был сжат гипертрофированным гранулярным эндоплазматическим ретикуломом. В нейронах мозжечка уменьшено число везикул и вакуолей. По сравнению с гиалоплазмой электронная плотность содержимого просвета канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулума снижена. Количество митохондрий в нейронах и клетках глии

снижено, уменьшен их объем, повышена электронная плотность матрикса, уплотнены кристы.

В этот период редко встречаются везикулы, микротрубочки, первичные лизосомы, довольно часто встречаются скопления микрофиламентов и вторичные лизосомы. В клетках иногда выявляются небольшие скопления гранул гликогена и липидные капли. Проведенные морфометрические исследования и их анализ показали, что соотношение объема ультраструктурных элементов клетки существенно изменяется. Исходя из полученных данных можно заключить, что для нейронов мозжечка характерна интенсификация специфической секреторной функции, осуществляемой гранулярным эндоплазматическим ретикуломом и комплексом Гольджи и активизация митохондрий.

Таким образом, воздействие алкоголя вызывает изменения в нейронах и клетках глии мозжечка. В мозжечке крыс в ранние сроки прослеживаются явления адаптации, в поздние - дезадаптации. У части клеток наблюдались ультраструктурные признаки экстрацеллюлярного обмена. В более поздние сроки для нейронов и клеток глии были характерны нарушения соотношения синтеза и выведения высокомолекулярных соединений, а также ингибирование синтеза и секреции специфических продуктов, связанных с функционированием комплекса Гольджи. В целом можно отметить, что клетки снижают свою функциональную и секреторную активность.

### **Список литературы**

1. Герасимова И.А. Влияние пренатального стресса на перекисное окисление липидов в некоторых отделах головного мозга самцов и самок взрослых крыс / И.А. Герасимова, М.А. Флеров, А.В. Вьюшина // Нейрохимия. 2005. - Т. 22. - № 4. - С.273-278.

2. Емельёва Т.Ф. Структурно-функциональные особенности мозжечка при стрессе: автореф. дисс. . канд. биолог, наук / Т.Ф. Емельёва. — Уфа: 2005. 22 с. Библиогр.: 5 назв.

3. Лобанов С.А. Морфофункциональные изменения митохондрий при стрессе / С.А. Лобанов, А.В. Данилов, Е.В. Данилов, С.К. Асаева, Г.Ф. Арсланова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – № 12. –т. 144. – С. 699-

4. Лобанов С.А. Роль гликозаминогликанов в формировании тканей / С.А. Лобанов, А.Ю. Костарев, В.Ю. Корнаузов, Т.Ф. Емельёва, Данилов А.В., Е.В. Данилов // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М.Акумуллы. – 2009. – №1(18). – С. 67-

5. Лойт О.А. Общая токсикология. / О.А. Лойт. - М. Медицина, 2006

6. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. / Е.А. Лужников. - М. Медицина, 1994. 255 с.

©Е.В. Насырова, 2015

УДК 616.831-02:618.33-001.8-06:616-053.31-07:577.125

## **МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ДЕТЕЙ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИ-ИШЕМИЧЕСКИХ И ТРАВМАТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

**Шамратова В.Г.<sup>1</sup>, Гизатуллин Р.Х.,<sup>2</sup> Тимофеева Е.А.,<sup>1</sup> Мефтахова Г.В.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, г.Уфа, mpha-bsu@mail.ru

<sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

В последние годы в связи со значительным снижением индекса здоровья среди лиц оптимального детородного возраста, увеличением случаев патологии беременности и родов, наблюдается существенный рост удельного веса детей, рожденных с исходным поражением центральной нервной системы (ЦНС) (Ахмадеева, 2007). Наиболее частой причиной, по мнению большинства авторов, является гипоксия, которая у доношенных новорожденных составляет около 73%. Самым грозным клиническим осложнением гипоксии считаются поражения, проявляющиеся гипоксически - ишемической энцефалопатией (Самсыгина, 1996).

Многочисленными исследователями показано, что все структурные повреждения ЦНС сопровождаются значительным изменением мозгового метаболизма с нарушением всех видов обмена – углеводного, жирового и белкового. В связи с этим представляет интерес изучение особенностей аминокислотного и липидного состава крови у детей при гипоксически-ишемических и травматических поражениях центральной нервной системы.

**Методы.** Обследованы больные дети в возрасте 4-6 месяцев с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС разной степени течения заболевания на базе Городской детской клинической больницы №17, Детской республиканской клинической больницы и Республиканского перинатального центра г. Уфы. Показатели больных детей сравнивались с контролем (клинически здоровые дети). Содержание аминокислот (АК) и жирных кислот (ЖК) анализировали с помощью метода тандемной масс-спектрометрии на аналитическом приборе «Quattromicro MS/MS» фирмы «Waters-США» (Perkin Elmer, Финляндия).

**Результаты исследования.** Сравнительный анализ содержания АК у здоровых и больных детей отражен в табл.1. Видно, что при гипоксических заболеваниях ЦНС у детей увеличивается содержание большинства АК, причем концентрация аланина, аргинина, орнитина, фенилаланина и пролина – статистически значимо. Известно, что в критических состояниях отмечается абсолютное снижение калорий, получаемых при окислении глюкозы, и увеличение выхода энергии за счет окисления АК (Корлякова, Лихачева, 2003). Наблюдается «патологический» внутрипеченочный глюконеогенез, основными субстратами для которого являются аланин, глицин, серин. Их пополнение в плазме достигается вследствие прогрессирования мышечного протеолиза: АК мобилизуются из скелетной мускулатуры и транспортируются в печень для синтеза глюкозы и медиаторов системного повреждения. Из мышц и кишечника избыток аммиака выводится преимущественно в виде аланина. Мышцы выделяют особенно много аланина в силу их большой массы, активного потребления глюкозы, а также потому, что они получают часть энергии за счет распада АК (Корлякова, Лихачева, 2003).

*Таблица 1*

Содержание аминокислот в группах здоровых и больных детей

Аминокислоты, $\mu\text{M}$	Здоровые дети	Дети с патологиями ЦНС
Аланин	258 $\pm$ 2,7	282,9 $\pm$ 9,5*
Аргинин	19,2 $\pm$ 0,8	25,6 $\pm$ 2,9*
Цитрулин	21 $\pm$ 0,7	14,4 $\pm$ 1,2*
Глицин	309 $\pm$ 3,9	317 $\pm$ 8,5
Лейцин	140 $\pm$ 2,2	147 $\pm$ 7,4
Метионин	20,9 $\pm$ 0,8	13,6 $\pm$ 1,6*
Орнитин	62 $\pm$ 2,4	104 $\pm$ 9,5*
Фенилаланин	36,8 $\pm$ 0,7	51,8 $\pm$ 2,8*
Пролин	158 $\pm$ 3,7	196,6 $\pm$ 5,3*
Тирозин	91,8 $\pm$ 3,6	86,7 $\pm$ 4,3
Валин	94,5 $\pm$ 1,9	81,2 $\pm$ 2,6*

Примечание: \*- достоверные отличия показателей больных детей от здоровых при  $p < 0,05$

Возрастание содержания аргинина у детей с патологиями ЦНС обусловлено, очевидно, связью обмена аргинина с реакциями орнитинового цикла. Некоторые патологические состояния,

характеризующиеся интенсивным распадом белков тканей, сопровождаются, как известно, активацией орнитинового цикла.

Содержание ЖК у здоровых и больных детей, изученное методом тандемной масс-спектрометрии, представлено в табл. 2. У детей с патологиями ЦНС происходит увеличение содержания короткоцепочечных и среднецепочечных кислот (С4-С10), а также ряда длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот: пальмитолеиновой (С16:1), олеиновой (С18:1) и линолевой (С 18:2).

Ранее Лейдерманом И.Н. и Гиршем А.О. (2008) было показано, что для обмена липидов при гипоксически-ишемическом поражении или повреждении центральной нервной системы характерно усиление липолиза и торможение липогенеза. Увеличение содержания триглицеридов, незатерифицированных ЖК и  $\beta$ -оксибутирата (С4) в сыворотке крови (ChaseH. D., 2009) объясняется активацией симпатoadреналовой системы и ускоренного липолиза триглицеридов в жировой ткани, а также путем увеличения их синтеза в печени из активной формы уксусной кислоты.

Таблица 2

Содержание жирных кислот в группах здоровых и больных детей

Жирные кислоты μМ	Здоровые дети	Дети с патологиями ЦНС
С4	0,16±0,009	0,20±0,007*
С6	0,04±0,006	0,06±0,007*
С8	0,04±0,007	0,07±0,006*
С8:1	0,07±0,014	0,08±0,006
С10	0,05±0,009	0,09±0,006*
С10:1	0,03±0,004	0,06±0,006*
С10:2	0,013±0,0017	0,016±0,004
С12	0,05±0,012	0,06±0,004
С12:1	0,02±0,003	0,04±0,006*
С14	0,11±0,011	0,15±0,007*
С14:1	0,05±0,005	0,05±0,014
С14:2	0,5±0,01	0,9±0,2
С16	2,09±0,5	0,9±0,09*
С16:1	0,29±0,03	0,32±0,08*
С18	0,54±0,01	0,38±0,05*
С18:1	0,63±0,03	0,98±0,10*
С18:2	0,32±0,01	0,36±0,03*

Примечание: \*- достоверные отличия показателей больных детей от здоровых при  $p < 0,05$

На этом фоне концентрация пальмитиновой (С16) и стеариновой (С18) кислот при изученных патологических состояниях, напротив, значимо снижается. Возможно, это вызвано увеличением оборота жирных кислот с длинной цепью, поскольку насыщенные жирные кислоты являются наиболее расходуемым при критических состояниях источником энергии.

**Заключение.** Проведенное исследование позволило установить наличие при гипоксически-ишемических и травматических поражениях центральной нервной системы выраженных метаболических сдвигов, требующих проведения коррекции. Метаболические нарушения, обусловленные критическими состояниями у детей, клинически могут проявляться как болезни, связанные с нарушением обмена веществ. Проявления этих заболеваний неспецифичны. Они вносят большой вклад в инвалидизацию и летальность детей. Характерным для заболеваний обмена веществ является поражение нервной системы, сопровождающееся нарушением обмена аминокислот и жирных кислот. В ургентной ситуации дифференцировать гипоксическое поражение центральной нервной системы от болезней, связанных с нарушением метаболизма, достаточно трудно, особенно в случаях, когда пусковым моментом являются инфекционные процессы. Оценка содержания в крови детей amino- и жирных кислот позволит осуществлять персонифицированный подход в лечении детей.

#### **Список литературы**

1. Ахмадеева Э. Н. Показатели здоровья детей, перенесших неонатальную реанимацию // Медицинский вестник Башкортостана.- 2007.- Том 2, N1.- С. 34-32.
2. Корлякова О.В., Лихачева Н.В. Обмен и функции аминокислот. Под ред. Е.С. Северина. Биохимия: учебник для вузов. -М.: ГЭОТАР-Медиа.- 2003.- 784 с.
3. Лейдерман И.Н., Гирш А.О. Жировые эмульсии в парентеральном питании. Вчера, сегодня, завтра/ И. Н.Лейдерман, А. О.Гирш.- СПб.: Ира-Принт,- 2008.-С.4-32.
4. Самсыгина Г.А. Гипоксическое поражение центральной нервной системы у новорожденных: клиника, диагностика, лечение // Педиатрия.- 1996, N 5.- С. 74-77.
5. Chace H. D. Rapid diagnosis of MCAD deficiency quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry / Chace H. D., Hillman S. L., Van Hove J. L. et al. // Clinical Chemistry. -2009. -V. 43. № 11. - P. 2106-2113.

*©В.Г. Шамратова, 2015.*

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕРВНОЙ И ИММУННОЙ СИСТЕМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ НА ОРГАНИЗМ КРЫС**

**Великомолова Ю.Б., Каюмова А.Ф., Каюмов Ф.А.**

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Актуальность: Неблагополучная экологическая обстановка во всем мире по стойким органическим загрязнителям (СОЗ), в том числе и полихлорированным бифенилам (ПХБ), - одна из актуальных медико-биологических проблем современности.

В, частности, в Республике Башкортостан сконцентрированы крупные промышленные предприятия по нефтедобыче, нефтепереработке, нефтехимическому и химическому производству, в процессе работы которых образуется большое количество хлорорганических соединений. На многих заводах накоплены большие запасы ПХБ, которые не могут быть уничтожены, т.к. они устойчивы к процессам гидролиза, окисления, биораспада.

При воздействии ПХБ на животных и человека возникают нарушения функции печени, поражение ЦНС, гиперкератоз, пигментация кожи. При экспериментальном изучении выявлены неопластические, тератогенные и эмбриотоксические, мутагенные и иммунодепрессивные эффекты, а также нарушения в системе крови.

Ранее нами в эксперименте было выявлено, что при введении ПХБ изменяется поведение крыс с преобладанием пассивно- или активно-оборонительных реакций. В связи с этим, изучение функционального состояния нервной системы и состояния тканей головного мозга представляет несомненный теоретический интерес в плане исследования возможных причин ранее выявленных изменений.

Цель: Изучение взаимодействия нервной и иммунной системы при интоксикации организма ПХБ и выявление особенностей влияния ПХБ на нервную систему экспериментальных животных (крыс).

Материалы и методы: Комплексное исследование было проведено на половозрелых крысах – самцах, массой 150-200 гр. Модель подострой интоксикации ПХБ создавали внутрижелудочным введением с помощью зонда смеси коммерческой смеси «совол», разведенными в подсолнечном масле, в течение 28 дней.

Исследовательское поведение крыс в тесте «открытое поле» оценивалось по вертикальной и горизонтальной активности, количеству и длительности эпизодов грумминга. В течение эксперимента у животных

также измерялись фоновые значения омега-потенциала головного мозга на 1-е, 3-е, 7-е, 9-е, 11-е, 14-е, 16-е, 18-е, 21-е, 23-е, 25-е, 28-е сутки эксперимента.

На 17-е сутки введения ПХБ некоторые животные были умерщвлены от эфирного наркоза для приготовления микропрепаратов головного мозга (фиксация в 10% формалине, срезы толщиной 7мкм окрашивались гематоксилин-эозином)

Результаты работы: Введение полихлорированных бифенилов в дозе 1/20 LD50 угнетают ориентировочно-исследовательское поведение крыс в «открытом поле», что проявляется в достоверном снижении горизонтальной и вертикальной двигательной активности по сравнению с контрольной группой уже с первой недели эксперимента (рис.1, рис.2).

Также с первой недели введения токсиканта на протяжении всего эксперимента уменьшалось количество эпизодов груминга, а продолжительность груминга достоверно уменьшалась лишь на 4 неделю заправки.

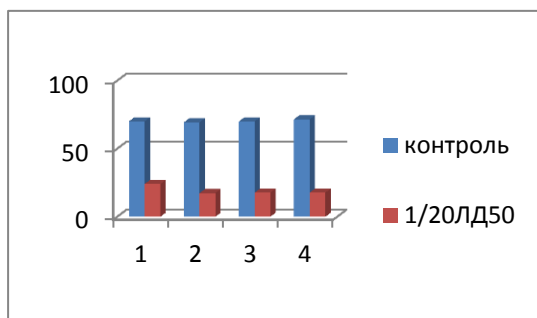


Рис.1. Общая двигательная активность крыс в тесте «открытое поле» в течение 4 недель эксперимента

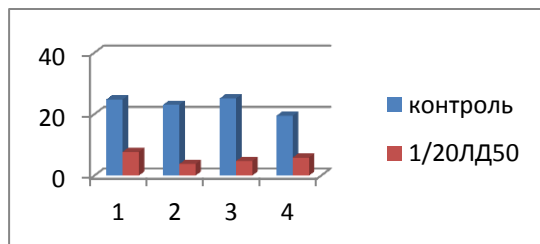


Рис.2. Общее количество стоек крыс в тесте «открытое поле» в течение 4 недель эксперимента

Изучение сверхмедленных волн милливольтового диапазона головного мозга крыс показало, что показатели омега-потенциала во время эксперимента изменяются волнообразно. Достоверное снижение средних негативных показателей омега-потенциала наблюдалось на 11-е, и с 18-х по 28-е сутки эксперимента. Анализ динамики изменений омега-потенциала показал, что наибольшее влияние оказывал «фактор времени», который составил 41% ( $G_k=0,64$ ;  $F=13,6$ ;  $p<<0,0001$ ).

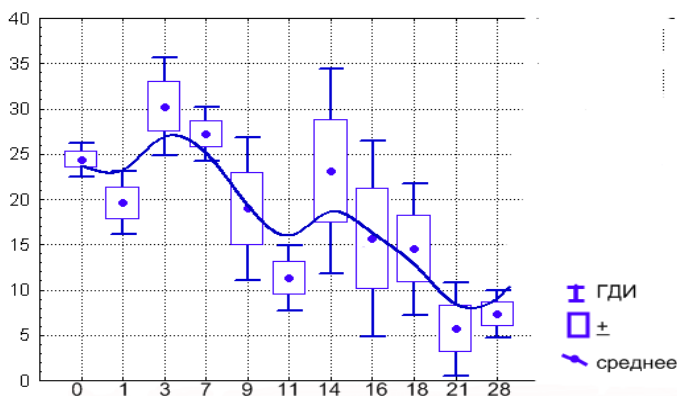


Рис.3. Динамика омега-потенциала головного мозга крыс, получавших ПХБ в дозе 1/20 ЛД50.

При изучении гистологических препаратов головного мозга экспериментальных животных, подвергнутых действию токсиканта было выявлено, что морфологические изменения в головном мозге, прежде всего, касались особенностей его кровоснабжения. Кровеносные сосуды характеризовались периваскулярным отеком (Рис.4). Замедление кровотока в расширенных сосудах приводило к краевому стоянию лейкоцитов, которые прилипая к эндотелиоцитам капилляров, мигрировали за пределы сосудистого русла (рис.5). Далее клетки перемещались уже по ходу нервных волокон (рис.6).

При этом лимфоциты, макрофаги и микроглия выстраивались в ряд и, поскольку пучки нервных волокон взаимно пересекались в различных направлениях, тяжи лимфоидных клеток также приобретали сетевидную форму.

Особенно хорошо это было выражено в «обонятельной» области головного мозга крыс.

Также встречались участки головного мозга, где иммунокомпетентные клетки могли располагаться в виде небольших скоплений как среди белого вещества (рис.7), так и среди мультиполярных нервных клеток (рис.8).

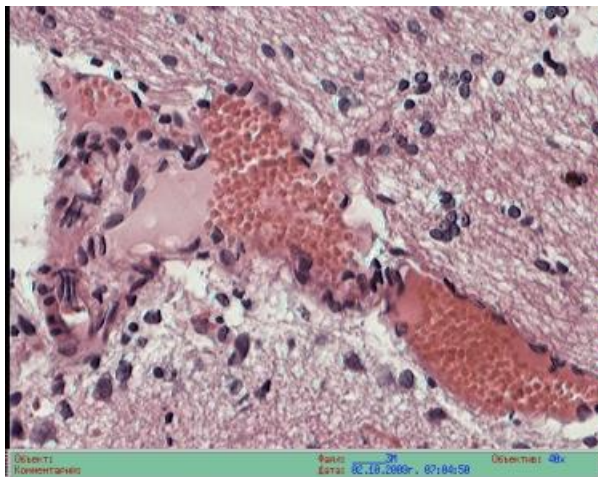


Рис.4. Гиперемия кровеносных сосудов желудочков головного мозга крысы с периваскулярным отеком

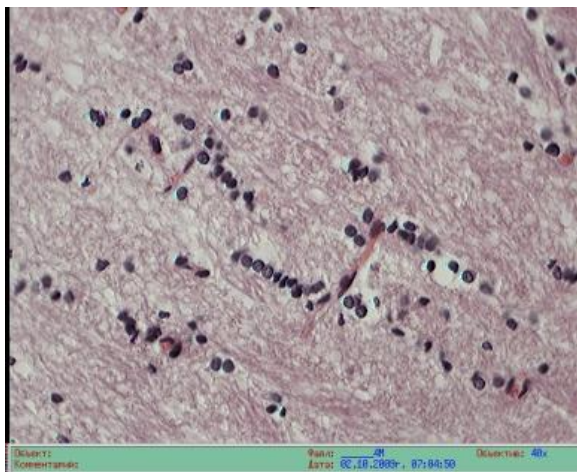


Рис.5. Адгезивное взаимодействие лейкоцитов с эндотелиальными клетками микроциркуляторного русла

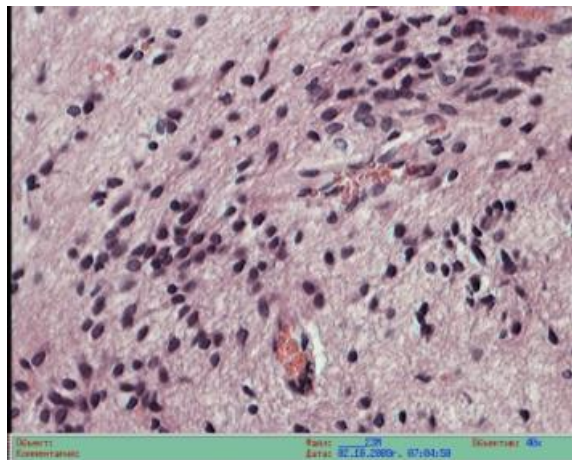


Рис. 6. Диффузное распространение макрофагов по ходу пучков нервных волокон

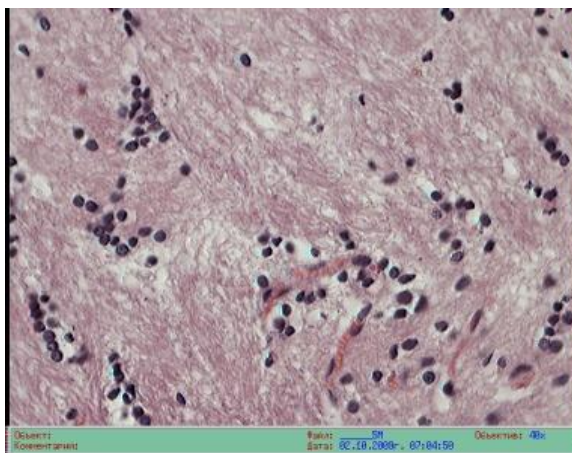


Рис.7. Групповое расположение лейкоцитов в белом веществе головного мозга крыс

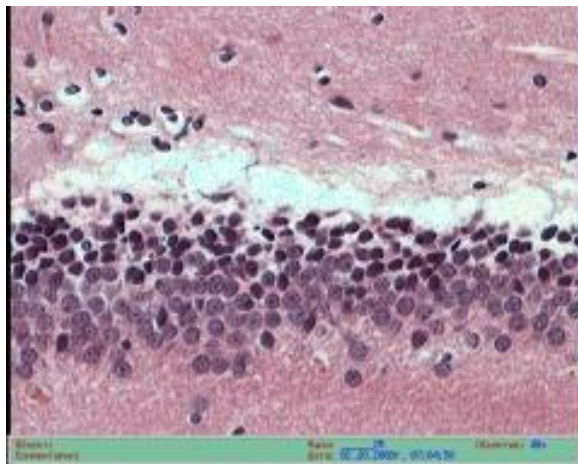


Рис. 8. Миграция лейкоцитов вблизи серого вещества головного мозга.

Выводы: Таким образом, экспериментально показано, что введение полихлорированных бифенилов в дозе 1/20 LD50 влияют на психические процессы, вызывая утрату активности и мотивов поведения у экспериментальных животных. Снижение уровня омега-потенциала во время эксперимента может свидетельствовать о снижении уровня энергообеспечения головного мозга

Анализ морфологической картины головного мозга крыс показал, что в ответ на введение ПХБ определяется выраженная реакция нервной системы в виде миграции иммунокомпетентных клеток как в сером, так и в белом веществе головного мозга. Вполне допустимо, что это мобилизация защитно-приспособительных механизмов организма на возможное попадание молекул чужеродных веществ в нервную ткань.

#### Список литературы

1. Великомолова Ю.Б., Фазлыхметова М.Я., Каюмова А.Ф., Каюмов Ф.А. Морфологическая картина головного мозга и сердца в эксперименте на введение полихлорированных бифенилов // Медицинский вестник Башкортостана – №3 – 2010 – С.129-130.

2. Галимов Ш.Н. Гормонально-метаболические механизмы нарушения мужской репродуктивной функции при экспериментальной интоксикации диоксинсодержащим гербицидом 2,4-ДА : дис. д-ра. мед. наук / Ш.Н. Галимов. Уфа, 2000. - 248 с.

3. Фокин В.Ф., Н.В. Пономарева, Т.П. Секирина, Л.В. Андросова, Г.И. Коляскина, В.М. Новоселов. Взаимосвязи между деятельностью

головного мозга и иммунной системой у человека // Физиология человека – 1995 – Т.21, №2. – С.15-23.

4. Шаяхметова Э.Ш., Кальметьев А.Х., Муфтахина Р.М., Нагорная Л.Г., Каюмова А.Ф., Шафиева Л.Н., Сверхмедленные электрофизиологические процессы головного мозга человека диапазона 0-0,05Гц в экстремальных условиях деятельности: монография – Уфа: Изд. БГПУ, 2014. – 178с.

©Ю.Б. Великомолова, 2015

УДК 617.735.

## **МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАДИАЛЬНЫХ ГЛИОЦИТОВ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij С РАЗЛИЧИЯМИ ГЕНОТИПА ПО ЛОКУСУ Taq 1A DRD<sub>2</sub>**

**Балхиева Л.Х., Мусина Л.А., Хисматуллина З.Р.,  
Байгильдин С.С.**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», <sup>2</sup> ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России», г.Уфа, morphoplant@mail.ru

**Введение.** Ранее нами было установлено, что у гомозиготных крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD<sub>2</sub>) в сетчатке глаза выявляются патоморфологические изменения дистрофически-деструктивного типа, наиболее выраженные у крыс с генотипом A<sub>2</sub>A<sub>2</sub> [1]. Одной из причин дегенерации сетчатки глаз у крыс линии WAG/Rij исследователи называют факт недостаточного количества правильно функционирующих радиальных глиоцитов сетчатки [10, 12].

**Цель исследования.** Выявление структурных и функциональных особенностей радиальных глиоцитов сетчатки глаза у гомозиготных крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD<sub>2</sub>).

**Материалы и методы исследования.** При проведении исследований соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13 ноября 1984 г. №724). У 10 крыс линии Wag/Rij обоего пола в возрасте 6 – 12 месяцев двух генотипов, отличающихся по локусу Taq 1A DRD<sub>2</sub> (10 глаз крыс с генотипом A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>, 10 глаз крыс с генотипом A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>) и у 5 крыс линии Wistar (10 глаз), составивших контрольную группу, энуклеировали глазные яблоки и фиксировали в 10% забуференном формалине по Лилли,

заливали в парафин. Маркер глиальных клеток кислый глиальный фибриллярный белок (GFAP) выявляли на парафиновых срезах сетчатки толщиной 5 мкм согласно протоколу производителя, используя мышинные моноклональные антитела (SantaCruzBiotechnology) и универсальную систему вторичной детекции для визуализации (Novocastra<sup>TM</sup>). Иммуногистохимическое окрашивание производили в гистостейнере LEICABONDMAX (Германия). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в балзам. На микроскопе AXIOIMAGER-Z1 фирмы «CARLZEISS» (Германия) при увеличении X400 измеряли площадь (в мкм<sup>2</sup>), занимаемую окрашенным GFAP в одном поле зрения. Для каждого глаза всех групп крыс (всего по 10 глаз в каждой группе) использовали по 50 полей зрения. Всего сделано 1500 измерений. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Достоверность различий определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента. Для электронной микроскопии кусочки сетчатки фиксировали в 2,5% глутаральдегиде на какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) с дофиксацией в 1% OsO<sub>4</sub>, обезживали и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы контрастировали 2% водным р-ром уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу и изучали в трансмиссионном микроскопе Jeol-100XB (Япония) при увеличениях 5800–30 000.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Выраженные дистрофические и деструктивные изменения клеток пигментного эпителия и нейронов сетчатки крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа по локусу Taq 1A DRD2 сопровождалась морфологическими изменениями радиальных, или так называемых Мюллеровских глиоцитов. Реакция глиальных клеток сетчатки была неоднозначной и характеризовалась проявлением как регрессивных, так и прогрессивно-пролиферативных изменений. Тела радиальных глиоцитов во многих участках сетчатки оказывались «сжатыми» между отечными клетками ВЯС. Цитоплазма глиоцитов вокруг ядра была плотной, небольшим объемом, и содержала редкие короткие цепочки гранулярного ЭПР, каналы гладкого ЭПР, а гранулы гликогена и микрофиламенты в цитоплазме не определялись. Другой вариант патологических изменений заключался в вакуолизации цитоплазмы Мюллеровских глиоцитов и набухании ядра. В поле зрения количество тел глиоцитов увеличивалось иногда до 5-6 клеток, тогда как в норме обычно в поле зрения попадает 1-2 клетки.

Все эти морфофункциональные нарушения сопровождалась изменениями степени экспрессии в ткани сетчатки кислого глиального фибриллярного белка GFAP - маркера глиоза [4]. У крыс линии Wistar иммуногистохимически белок GFAP определялся в сетчатке в незначительном количестве только во внутренней части Мюллеровых глиоцитов. Такая картина характерна для нормы [8, 11]. У крыс линии

WAG/Rij наблюдалось усиление в сетчатке экспрессии GFAP и распределению его почти во всех слоях (рис.1, рис.2). Выраженный синтез GFAP в нервной ткани является ответной реакцией на деструкцию нейронов и играет основную роль в формировании глиального рубца [2, 5, 9]. В сетчатке глаза крыс с генотипом  $A_2A_2$  определялась более выраженная экспрессия GFAP ( $3307,61 \pm 91,59 \text{ мкм}^2$ ) в сравнении с сетчаткой крыс с генотипом  $A_1A_1$  ( $1871,77 \pm 30,51 \text{ мкм}^2$  при  $p < 0,01$ ) и сетчаткой крыс линии Wistar ( $840,75 \pm 13,83 \text{ мкм}^2$  при  $p < 0,001$ ), что несомненно также является свидетельством более значительных разрушений нервных клеток и пролиферации радиальной глии в сетчатке крыс с генотипом  $A_2A_2$ .

Деструкция радиальных глиоцитов, в свою очередь, вносит значительный вклад в дегенерацию нейронов сетчатки, так как нарушается их изоляция, трофическое обеспечение, и если, можно так назвать, и их «опора». Проллиферативная активность радиальных глиоцитов приводит к изоляции очагов деструкции от неизмененных тканей, что является отражением адаптивных реакций организма при повреждениях [6, 7]. Полученные нами данные о состоянии радиальных глиоцитов сетчатки крыс линии WAG/Rij согласуются с результатами исследований А.М.Музиной [3], полученными при изучении нейроно-глиальных взаимоотношений в соматосенсорной коре головного мозга у крыс линии WAG/Rij с различиями в аллельной структуре гена рецептора дофамина второго типа. Согласно этим данным в соматосенсорной коре у крыс с генотипом  $A_1A_1$  обнаруживается большая плотность нейронов, меньшее количество клеток глии и свободной глии, и соответственно у крыс с генотипом  $A_2A_2$  меньшая плотность нейронов, большее количество клеток глии и свободной глии, замещающей погибшие нейроны в нервной ткани.

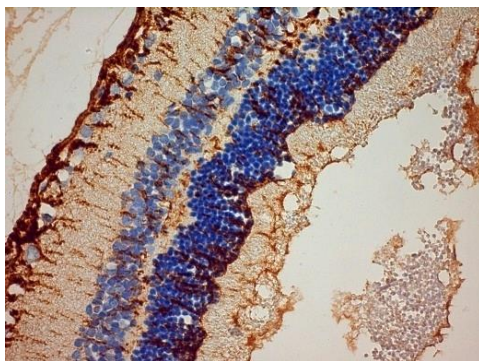


Рис.1. Выраженная экспрессия кислого глиального фибриллярного белка GFAP (коричневое окрашивание) в сетчатке глаза крыс линии WAG/Rij с генотипом  $A_1A_1$ . Непрямой иммунопероксидазный метод с докраской гематоксилином. Увел. X100.

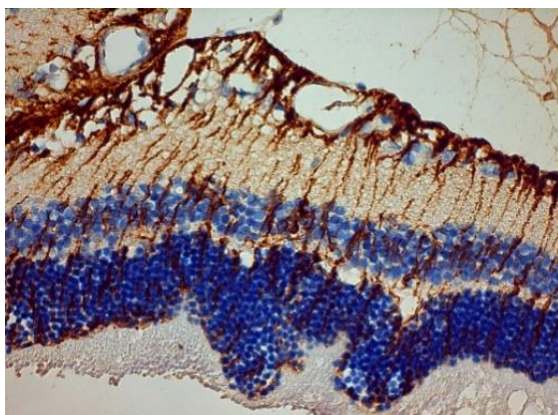


Рис.2. Интенсивная экспрессия кислого глиального фибриллярного белка GFAP (коричневое окрашивание) в сетчатке глаза крыс линии WAG/Rij с генотипом  $A_2A_2$ . Непрямой иммунопероксидазный метод с докраской гематоксилином. Увел. X100.

**Заключение.** Таким образом, радиальные глиоциты в сетчатке глаза экспериментальных крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (DRD2) характеризуются как деструктивными, так и прогрессивно-пролиферативными изменениями, сопровождающимися разной степенью экспрессии кислого глиального фибриллярного белка GFAP. Установленные качественные и количественные различия радиальных глиоцитов сетчатки глаза у крыс линии WAG/Rij двух генотипов позволяют нам предположить, что характерная для сетчатки глаза крыс с генотипом  $A_2A_2$  большая степень замещения разрушенных нейронов глиальными элементами, должна проявляться и большей степенью ослабления функции зрительной системы глаза.

#### Список литературы

1. Балхиева Л.Х., Хисматуллина З.Р., Мусина Л.А. Морфология сетчатки крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа по локусу Taq 1A DRD2 // Вестник БГАУ. - 2013.- № 1 (25).- С.47-49.

2. Логвинов С. В., Жданкина А. А., Варакута Е. Ю. и др. Реакция радиальных глиоцитов крыс при фотоповреждении на фоне коррекции асковертином как показатель репарационных механизмов сетчатки // Актуальные проблемы учения о тканях. - Санкт-Петербург, 2006. - С. 58-59.

3. Мусина А.М. Количественные характеристики нейроно-глиальных взаимоотношений в соматосенсорной коре у крыс линии WAG/Rij // Морфология. – 2010. – Т.137, №4. – С.136.

4. Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Коржевская В.Ф. Иммуногистохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме // Судебно-медицинская экспертиза. — 2010. - № 1. - С. 14-16.

5. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. - М.: Медицина. - 2000.- 416с.

6. Чехонин В.П., Лебедев С.В., Блинов Д.В., Гурина О.И., Семенова А.В., Лазаренко И.П., Петров С.В., Рябухин И.А., Рогаткин С.О., Володин Н.Н. Патогенетическая роль нарушения проницаемости гематоэнцефалического барьера для нейроспецифических белков при перинатальных гипоксически-ишемических поражениях ЦНС // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2004. - Т.3, № 2. - С. 50-56.

7. Шехтер А.Б., Серов В.В.. Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) // Архив патологии. -1991. - С.7-14.

8. Eng L.F., Ghirmikar R.S., Lee Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969- 2000) // Neurochem. Res. - 2000. - № 9-10. - P.1439-1451.

9. Hausmann R., Riess R., Fieguth A. et al. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury // Int. J. Legal. Med. – 2000. - V.113, №2. - P.70—75.

10. Lai Y.L., Jacoby R.O., Jensen J.T., Yao P.C. Retinitis pigmentosa // Am. J. Pathol. -1980. -№ 98. - P. 281-284.

11. Lewis G.P., Matsumoto B., Fisher S.K. Changes in the organization of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1995. - №36. - P.2404–2416.

12. O’Steen W.K., Donnelly J.E. Chronologic analysis of variations in retinal damage in two strains of rats after short-term illumination // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. -1982. – Vol.22, №2. – P.252-255.

© Л.Х. Балхиева, 2015

## **ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА УРОВНИ ТРЕВОЖНОСТИ И ДЕПРЕССИВНОСТИ КРЫС**

**Шарафутдинова Л.А., Юсупов А.Р., Федорова А.М.**

Башкирский государственный университет, Уфа, sharaffla@yandex.ru

В настоящее время большое внимание уделяется перспективам развития нанотехнологий, т.е. технологий направленного создания и использования веществ и материалов в диапазоне размеров до 100 нанометров [5]. Наночастицы, наноматериалы и нанотехнологии их производства кардинально отличаются по своим свойствам и эффектам, комплексу физических, химических и биологических свойств от веществ в форме макроскопических дисперсий и сплошных фаз [3].

Нанопорошки диоксида титана являются одним из наиболее распространенных в настоящее время наноматериалов и находят применение в фотокатализе, производстве пигментов, перспективных технологиях адресной доставки лекарственных средств, пищевой промышленности и во многих других областях.

Несмотря на большие масштабы производства и широкое использование НЧ  $\text{TiO}_2$  в разных сферах человеческой деятельности, их токсические свойства изучены недостаточно, хотя в разных странах ведутся обширные исследования по оценке их безопасности и потенциальных рисков.

Известно, что нервная система наиболее чувствительна кrazного рода воздействиям [4]. Поведенческие реакции используются для проведения экологических, фармакологических, нейрофизиологических, генетических и эволюционных исследований, и в настоящее время наблюдается расширение сферы их применения как тестирующих систем.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния нанодисперсного титана на уровни депрессивности и тревожности крыс.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Исследовать уровень тревожности самцов и самок крыс линии Wistar через 7 дней после однократного перорального введения нанодисперсного диоксида титана в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».
2. Исследовать уровень депрессивности самцов и самок крыс линии Wistar через 7 дней после однократного перорального введения нанодисперсного диоксида титана в тесте «Вынужденное плавание».

**Материалы и методики исследования.** В качестве экспериментальных животных использовались крысы линии Wistar половозрелого возраста массой 210 - 350 грамм. Животных содержали в стандартных условиях вивария, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [1]. Отобранные животные были взвешены и случайным образом разделены на 2 серии опытов: контроль, закармливание наночастицами диоксида титана (наночастицы  $TiO_2$ ). В каждой серии использовалось по 10 животных.

Исследования проводили в течение месяца. Отобранных животных в течение 7 дней тестировали в «Приподнятом крестообразном лабиринте» и «Вынужденном плавании» (контроль). Затем те же группы, получавшие дозу наночастиц  $TiO_2$  дозой 7500 мг/кг, снова тестировались в данных установках. Исследования проводились в течение 15 минут по общепринятой методике в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» и в течении 5 минут в тесте «Вынужденное плавание».

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» нами учитывались следующие показатели, характеризующие уровень тревожно-фобического и эмоционального состояния животных: время нахождения в открытых (ОР) и закрытых (ЗР) рукавах лабиринта, число выходов в ОР и ЗР, время неподвижности (сек), число эпизодов и продолжительность груминга (сек), количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта, число болюсов и актов уринации, а так же уровень ориентировочно-исследовательской реакции животных: число выходов в ОР и ЗР, количество стоек, количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта [2].

В тесте «Вынужденное плавание» нами учитывались следующие показатели, характеризующие уровень депрессивного состояния животных: время первого эпизода активного плавания, суммарное время иммобилизации, общее время плавания. Чем больше время иммобильности, меньше общее время плавания и меньше длительность первого эпизода активного плавания, тем выше уровень депрессивности, и наоборот [1].

Статистическая обработка результатов проводилась в программе StatSoftStatistica 6.0. Для каждого показателя в исследуемых группах вычисляли среднее арифметическое ( $M$ ), ошибку среднего арифметического ( $m$ ). Статистическую значимость различий исследуемых показателей оценивали с использованием критерия Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0,05$  [1].

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные нами исследования показали, что однократное пероральное введение нанодисперсного

диоксида титана в дозе 7500 мг/кг оказывает воздействие на функции ЦНС, выражающееся в снижении уровня тревожно-фобического состояния, о чем свидетельствует увеличение следующих показателей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: время нахождения в открытых рукавах лабиринта, число выходов в открытые рукава, количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта, и увеличении уровня ориентировочно-исследовательской реакции животных (число выходов в ОР и ЗР, количество стоек, количество свешиваний с открытых рукавов лабиринта) (Табл.1).

Также в ходе проведенного исследования нами было установлено, что однократное пероральное введение нанодисперсного  $TiO_2$  через 14 дней после эксперимента в тесте «Вынужденное плавание» приводит к снижению уровня депрессивности, о чем свидетельствуют снижение показателей общего времени иммобилизации, увеличение общего времени плавания и увеличение времени первого эпизода активного плавания (Табл.2).

Таблица 1

Результаты сравнения средних показателей уровня тревожности крыс до и после введения нанодисперсного диоксида титана в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Переменные	До введения $TiO_2$		После введения $TiO_2$		Т, р	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Количество стоек в закрытом рукаве	19,8 ± 1,38	14,8 ± 1,26	15,56 ± 1,19	13,85 ± 3,44	2,34, <0,05	0,57, >0,05
Количество стоек в открытом рукаве	2,53 ± 0,46	1,9 ± 0,47	6,68 ± 0,73	3,45 ± 1,64	- 4,83,<0, 001	-2,22, <0,05
Время нахождения в открытом рукаве, с	206, 55 ± 24,0 0	116,48 ± 30,77	244,34 ± 25,09	165,23 ± 102,72	- 1,09,>0, 05	-1,09, >0,05

Время нахождения в закрытом рукаве, с	692,32 ± 24,45	780,4 ± 31,59	663,08 ± 24,93	734,78 ± 102,72	0,84, >0,05	1,01, >0,05
Количество груминга в открытом рукаве	1,39 ± 0,374	0,55 ± 0,15	2,20 ± 0,28	1,23 ± 1,11	- 1,73,>0, 05	-1,77, >0,05
Количество груминга в закрытом рукаве	11,0 0± 0,67	118,2 ± 20,93	9,56 ± 0,65	7,33 ± 2,28	1,54,>0, 05	0,61, >0,05
Время груминга в открытом рукаве, с	4,28 ± 1,08	4,8 ± 1,94	23,54 ± 5,22	15,23 ± 20,52	- 3,61,<0, 05	-1,54, >0,05
Время груминга в закрытом рукаве, с	123,38 ± 6,58	118,2 ± 20,93	209,02 ±9,33	126,05 ± 56,53	- 7,50,<0, 001	-0,29, >0,05
Количество свешиваний с открытых рукавов	15,8 2± 1,90	3,45 ± 0,76	22,44 ± 2,53	9,13 ± 4,04	- 2,09,>0, 05	-3,82, <0,01
Число выходов в закрытый рукав	8,57 ± 0,50	4,63 ± 0,56	7,80 ± 0,57	6,95 ± 1,60	- 0,50,>0, 05	-3,08, <0,01
Число выходов в открытый рукав	7,81 ± 0,48	3,88 ± 0,72	8,24 ± 0,71	6,23 ± 1,98	1,02,>0, 05	-2,47, <0,05

Таблица 2

Результаты сравнения средних уровней депрессивности крыс до и после введения нанодисперсного диоксида титана в тесте «Вынужденное плавание»

Переменные	До введения TiO <sub>2</sub>		После введения TiO <sub>2</sub>		T, p	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы
Время первого эпизода пассивного плавания	5,60 ± 0,78	10,1 ± 2,9	13,37 ± 1,42	23,8 ± 3,2	- 4,80, <0,00 1	-3,18, < 0,01
Время первого эпизода активного плавания	18,16 ± 4,47	28,3 ± 7,79	18,70 ± 3,02	33,75 ± 4,85	0,10, >0,05	-0,59, >0,05
Время первой иммобилизации	5,80 ± 1,24	4,0 ± 0,26	6,03 ± 2,23	6,2 ± 0,96	- 0,09, >0,05	-2,21, < 0,05
Число ныряний	27,50 ± 7,43	25,8 ± 3,76	4,63 ± 2,13	13,05 ± 3,43	2,96, <0,01	2,5, <0,05
Количество болюсов	5,40 ± 0,62	3,9 ± 0,53	5,80 ± 0,52	3,15 ± 0,44	- 0,50, > 0,05	1,09, >0,05
Количество касаний	74,40 ± 5,45	132,2 ± 12,54	102,21 ± 7,01	178,75 ± 10,54	- 3,13, <0,01	-2,84, <0,05
Число отряхиваний	54,70 ± 5,13	52,2 ± 6,1	46,07 ± 4,75	55,4 ± 5,08	1,23, >0,05	-0,4, > 0,05
Число умываний	9,40 ± 1,35	5,7 ± 1,26	3,87 ± 0,69	14,4 ± 0,85	3,64, <0,01	0,89, > 0,05

Общее время пассивного плавания	118,90 ± 10,36	155,7 ± 10,22	162,27 ± 5,76	197,4 ± 6,07	- 3,66, <0,01	-3,51, <0,01
Общее время активного плавания	118,10 ± 6,43	126,3 ± 10,19	106,40 ± 9,71	84,95 ± 5,71	1,00, >0,05	3,54, <0,01
Общее время иммобилизации	63,00 ± 12,53	18,0 ± 2,03	31,01 ± 9,09	17,65 ± 3,04	2,07, >0,05	0,09, > 0,05
Суммарное время плавания	237,00 ± 12,53	282,0 ± 2,03	271,23 ± 8,83	282,75 ± 3,1	- 2,23, <0,05	-0,2, >0,05
Индекс депрессивности	0,57 ± 0,09	0,62 ± 0,13	0,56 ± 0,10	0,55 ± 0,01	- 0,07, >0,05	0,41, > 0,05

Проведенные исследования показали, что однократное пероральное введение нанодисперсного диоксида титана в дозе 7500 мг/кг в организм крыс в течение 7 суток оказывало выраженное воздействие на функции ЦНС. Диоксид титана понижал уровень тревожно-фобического состояния, увеличивал уровень ориентировочно-исследовательской реакции, а также снижал уровень депрессивности животных.

#### Список литературы

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
2. Калуев А.В. Принципы экспериментального моделирования тревожно-депрессивного поведения // Нейронауки. – 2006. – №1. – С. 34-56.
3. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина. – 2012. – № 4. – С. 15-21.
4. Кривова Н.А., Ходанович М.Ю., Замощина Т.А., Тухватулин Р.Т., Заева О.Б., Суханов Д.Я., Зеленская А.Е., Гуль Е.В., Микрюкова А.В. Влияние диоксида титана на некоторые функции центральной нервной системы крыс // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – № 2 (14). – С. 96–109.

5. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90. – № 4. – С. 10-16.

© Шарфутдинова Л.А., 2015

УДК 611.813.14.018:599.323.4

## **ОРИЕНТИРОВОЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ТИТАНА**

**Шарфутдинова Л.А.**

Башкирский государственный университет, Уфа, sharafla@yandex.ru

Наночастицы диоксида титана – одни из наиболее распространенных наночастиц, широко используемых в различных областях, что связано с уникальностью их физико-химических и каталитических свойств. Они применяются для повышения потребительских качеств бумаги, красок, керамики, пищевых продуктов и т.п. [4, 5]. Поскольку в настоящее время контакт человека с наноматериалами становится все более тесным, идет процесс активного изучения влияния наночастиц на живые системы, в том числе и на здоровье человека.

Целью настоящего исследования являлась оценка влияния нанодисперсного порошка диоксида титана на уровни ориентировочно-исследовательского поведения и эмоциональный статус крыс.

**Материалы и методики исследования.** В качестве экспериментальных животных использовались крысы линии Wistar половозрелого возраста массой 210–350 грамм. Животных содержали в вентилируемом помещении при температуре 20°C, при световом режиме 12/12 (освещение с 8.00 ч), на стандартном пищевом рационе вивария, при свободном доступе к воде и пище, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [2]. Отобранные животные были взвешены и случайным образом разделены на 2 группы: 1-я (10 крыс) – контрольная группа; 2-я (10 крыс) – однократное пероральное введение нанодисперсного  $\text{TiO}_2$  в дозе 500 мг/кг массы тела.

Исследовали влияние нанодисперсного  $\text{TiO}_2$  в виде порошка, представленного в форме рутила, средний размер наночастиц 15–35 нм. Исследуемое вещество вводилось в виде ультрадиспергированной суспензии, полученной путем воздействия ультразвука на порошок  $\text{TiO}_2$

в дистиллированной воде в течение 3 минут. Через 7 дней после перорального введения ультрадисперсного  $TiO_2$  проводили тест «Открытое поле» по общепринятой методике [1, 3].

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Для каждого показателя в исследуемых группах вычисляли среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического (m). Оценку различий между выборками проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при уровне  $p < 0,01$ .

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные нами исследования особенностей поведения крыс в тесте «Открытое поле» показали, что однократное пероральное введение ультрадисперсного  $TiO_2$  в дозе 500 мг/кг ведет к снижению ориентировочно-исследовательской активности, о чем свидетельствует уменьшение количества пересеченных квадратов и стоек в центре и на периферии, времени обнюхивания. В то же время наблюдалось повышение показателей эмоционального статуса: суммарного количества актов и времени груминга, времени иммобилизации (Табл.1).

Полученные результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями [2], в которых изучали нейротропное действие нанодисперсного порошка в дозе 250 мг/кг тела и обнаружили статистически значимое понижение активности крыс опытной группы по сравнению с контрольной.

*Таблица 1.*

Результаты сравнения средних показателей ориентировочно-исследовательской активности и эмоционального статуса крыс до и после введения нанодисперсного диоксида титана в остром эксперименте

Переменные	Самки		Самцы	
	Довведения $TiO_2$	После введения $TiO_2$	До введения $TiO_2$	После введения $TiO_2$
Количество пересеченных квадратов в центре	6,5 ± 1,45	4,44 ± 0,59	4,45 ± 1,12	2,45 ± 0,38
Количество пересеченных квадратов на периферии	63,6 ± 7,25	39,86 ± 3,74*	42,08 ± 4,53	30,07 ± 3,76
Количество стоек в центре	0,44 ± 0,15	0,20 ± 0,12	0,25 ± 0,16	0

Количество стоек на периферии	18,54 ± 3,05	10,36 ± 11,71	8,48 ± 1,88	6,94 ± 0,82
Суммарное количество актов груминга	8,52 ±23,73	12,00 ±1,23*	5,2 ± 1,14	8,00 ± 1,12
Суммарное время груминга, с	64,23 ±1,23	162,90 ±23,73	50,3 ± 10,72	117,13 ± 19,93*
Время иммобилизации, с	335,48 ±43,42	376,00 ± 43,42	481,33 ± 39,5	503,60 ± 36,86
Время обнюхивания, с	287,29 ± 19,25	258,46 ± 19,25	269,05 ± 35,36	248,08 ± 26,96

Примечание: \*- статистически значимые различия ( $p < 0,01$ )

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что однократное введение нанодисперсного  $TiO_2$  оказывает воздействие на ЦНС, выражающееся в снижении ориентировочно-исследовательского поведения и увеличения эмоционального статуса.

### Список литературы

1. Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Казакова Л.Х., Алимкина О.В., Касинская Н.В. Методики изучения физиологических функций лабораторных животных для доклинических исследований в спортивной медицине // Биомедицина, — 2012, — № 4, — С. 15–21.
2. Кривова Н.А., Заева О.Б., Ходанович М.Ю., Карелина О.А., Гуль Е.В., Зеленская А.Е. Состояние слизистой оболочки желудка, про- и антиоксидантной активности и биохимических показателей крови крыс после скармливания нано- или микрочастиц диоксида титана // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – Т. 14. – №2. – С. 96–109.
3. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «Открытое поле» // Журнал Высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 1981. – Т. 31. – №2. – С. 301–307.
4. Besley J. Expert opinion on nanotechnology: risks, benefits, and regulation // Journal of Nanoparticle Research. – 2008. – 10 (4). – P. 549–558.
5. Besov A.S., Krivova N.A., Vorontsov A.V., Zaeva O.B. et al. Air detoxification with nanosize  $TiO_2$  aerosol tested on mice // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – Vol. 173. – P. 40–46.

© Шарфутдинова Л.А., 2015

**Секция №3.**  
**НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ МОЗГА В НОРМЕ**  
**И ПРИ ПАТОЛОГИИ**

УДК: 616 — 089.843

**ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ**  
**НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛИАЛЬНОГО**  
**НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (GDNF)**  
**ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИИ IN VITRO**

**Ведунова М.В.<sup>1,2</sup>, Мищенко Т.А.<sup>2,1</sup>, Митрошина Е.В.<sup>2,1</sup>, Шишкина Т.В.<sup>1,2</sup>, Астраханова Т.А.<sup>1</sup>, Бабаев А.А.<sup>1,2</sup>, Мухина И.В.<sup>2,1</sup>**

<sup>1</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия

Гипоксия является одним из наиболее значимых факторов повреждения клеток головного мозга при ишемическом поражении. Снижение концентрации кислорода в межклеточном пространстве запускает каскад реакций, связанных с процессами разобщения окислительного фосфорилирования на мембране митохондрий и активацией свободно-радикальных процессов в клетке. В результате нарушения поступления кислорода происходят значительные изменения процессов синаптической передачи, которые связаны как с катастрофическими перестройками метаболизма клеток, так и с гибелью функционально значимых звеньев нейронных сетей головного мозга.

Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) является одним из основных факторов, выделяемых глиальными клетками для поддержания жизнеспособности нейронов в условиях стресса [1,2]. Ранее нами было показано, что превентивное введение глиального нейротрофического фактора защищает нейронные сети культур диссоциированных клеток гиппокампа от повреждающего действия гипоксии. GDNF увеличивает выживаемость клеток и препятствует постгипоксической деструкции сетевой спонтанной биоэлектрической активности культур диссоциированных клеток гиппокампа [3].

Согласно современным представлениям одной из основных причин гибели нейронов в период реоксигенации является патологическое

увеличение выброса глутамата из пресинаптических терминалей и, как следствие, развитие кальций зависимых изменений в постсинаптической терминали, приводящих к гибели клетки. В отдаленный постгипоксический период, напротив, наблюдается угнетение сетевой активности. Описанные в настоящее время молекулярные механизмы действия GDNF не полностью отражают выявленную способность данного нейротрофина влиять на спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей первичных диссоциированных культур гиппокампа. Способность GDNF влиять на экспрессию различных субъединиц AMPA-рецепторов [4] может рассматриваться как один из механизмов защитного действия и модулирования спонтанной биоэлектрической активности. Субъединица GluR2 одна из самых широко распространенных субъединиц, обеспечивающих непроницаемость AMPA-рецептора для ионов кальция, и по уровню ее экспрессии можно судить об уровне синтеза AMPA-рецепторов [5]. В связи с этим представляет интерес исследования влияния гипоксии и глиального нейротрофического фактора на уровень экспрессии GluR2 субъединицы AMPA-рецепторов.

Исследования проводились на первичных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Моделирование нормобарической гипоксии проводили на 14 день развития путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Регистрация спонтанной кальциевой активности проводилась с помощью флуоресцентного кальциевого зонда Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Invitrogen) и конфокальной микроскопии (Zeiss LSM510, Германия). Для прижизненной детекции мРНК GluR2 использовались РНК-зонды (SmartFlare, Merck Millipore, SFC-534). Для детектирования мРНК GluR2 была выбрана кодирующая последовательность 5'-TCCGCAGCCACTATTGTAGTCTCTTG-3'. Использование РНК-зондов позволяет прижизненно исследовать активацию гена и появление в цитоплазме мРНК. Каждый РНК-зонд состоит из золотой наночастицы, конъюгированной с многочисленными копиями двунитевого олигонуклеотида, в котором одна нить ("репортерная нить") включает флуорофор, блокированный золотой наночастицей. При контакте РНК-зонда со своей РНК-мишенью, одна из нитей олигонуклеотида связывается со своей комплементарной "захватывающей" нитью и заменяет репортерную нить. При отсоединении репортерной нити флуорофор более не блокируется золотой наночастицей, флуоресценция может быть детектирована. Совмещение технологии мРНК зондов с функциональным кальциевым имиджингом может позволить детектировать уровень функциональной активности в клетках с детектируемым уровнем интересующей мРНК (рис. 1).

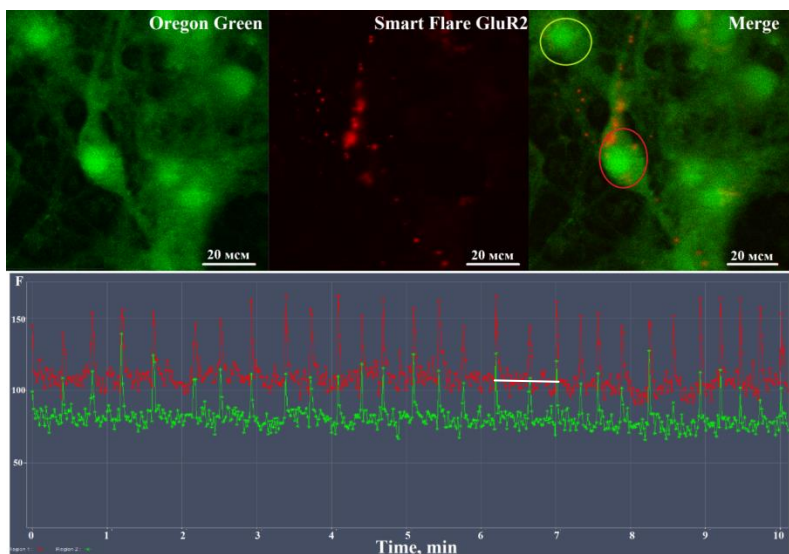


Рис. 1. Культура диссоциированных клеток гиппокампа (21 день развития *invitro*), слева - SmartFlare мРНК GluR2 (Cy5), справа - OregonGreen 488 ВАРТА-1 АМ, масштаб – 20 мкм

Изучение показателей функциональной кальциевой активности показало, что на 14 день развития диссоциированных культур клеток гиппокампа формируется сетевая активность, которая проявляется в синхронных кальциевых осцилляциях, происходящих на 69-82% клеток культуры. Гипоксия вызывает необратимые изменения функциональной кальциевой активности. Через 7 суток после моделирования нормобарической гипоксии происходило достоверное ( $p < 0,05$ , ANOVA) снижение числа клеток проявляющих кальциевую активность. В диссоциированных культурах клеток гиппокампа, перенесших эпизод острой гипоксии, наблюдалось снижение частоты кальциевых осцилляций (табл. 1).

Таблица 1

Влияние глиального нейротрофического фактора (GDNF) на изменение показателей спонтанной кальциевой активности первичной культуры клеток гиппокампа через 7 суток после моделирования острой нормобарической гипоксии

	Количество работающих клеток, %	Частота кальциевых осцилляций, с	Длительность кальциевых осцилляций, с
Контроль	71,2 ± 7,64	6,01 ± 0,65	6,5 ± 0,23
Гипоксия	19,95 ± 9,78*	0,2 ± 0,12*	15,3 ± 0,48*
Гипоксия + GDNF	37,5 ± 5,05*#	0,4 ± 0,13*	14,1 ± 0,5*

\* - различия с группой "Контроль" достоверны  $p < 0,05$  ANOVA

# - различия с группой "Гипоксия" достоверны  $p < 0,05$  ANOVA

Превентивное применение GDNF (1 нг/мл) увеличивало процент клеток в культуре, проявляющих спонтанную кальциевую активность. Полученные данные согласуются с ранее опубликованными результатами о действии GDNF (1 нг/мл) на жизнеспособность клеток в культуре, а также на сохранение сетевой биоэлектрической активности, регистрируемой с помощью мультиэлектродных матриц в отдаленный постгипоксический период [3]. Таким образом, показано, что GDNF (1 нг/мл) обладает выраженным антигипоксическим и нейропротективным эффектом.

Прижизненная детекция мРНК GluR2 AMPA-рецептора показала, что GDNF достоверно ( $p < 0,05$ , ANOVA) увеличивал количество мРНК GluR2 позитивных клеток в культуре (рис. 2) при нормоксии.

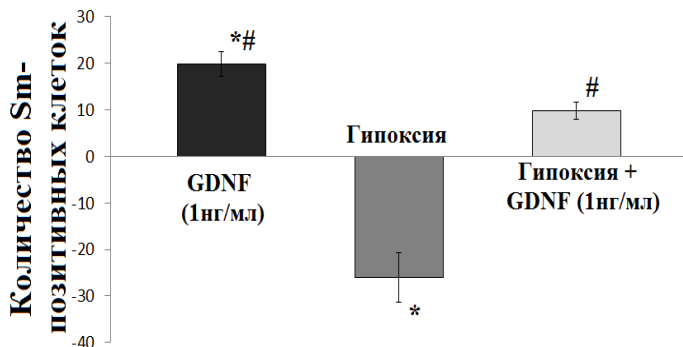


Рис. 2. Доля мРНК GluR2 позитивных клеток в диссоциированной культуре гиппокампа на 3 сутки постгипоксического периода  
 \* - различия с группой "Контроль" достоверны  $p < 0,05$  ANOVA  
 # - различия с группой "Гипоксия" достоверны  $p < 0,05$  ANOVA

Гипоксия снижает ( $p < 0,05$ , ANOVA) количество клеток, в которых детектируется мРНК GluR2. Превентивное введение GDNF (1 нг/мл) при моделировании острой нормобарической гипоксии способствует сохранению количества клеток в культуре, экспрессирующих мРНК GluR2. Таким образом, проведенные исследования показали, что GDNF не только обладает нейропротективным эффектом, проявляющимся в его влиянии как на электрическую, так и метаболическую активность нейронных сетей, но и является активным корректором синаптической пластичности за счет регуляции экспрессии субъединиц AMPA-рецепторов.

Работа поддержана грантами РФФИ №14-04-31601, № 13-04-01871, №13-04-12067, публикация подготовлена в рамках выполнения государственной работы «Обеспечение проведения научных исследований», Работа частично поддержана грантом (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОНРФ и ННГУ)

#### Список литературы

1. Gash D. M., Zhang Z., Gerhardt G. Neuroprotective and neurorestorative properties of GDNF // *Annals of Neurology*. 1998. V. 44. P. S121–S125.
2. Airaksinen M. S., Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value // *Neuroscience*. - 2002. - V. 3. - P. 383-394
3. Ведунова М. В., Сахарнова Т. А., Митрошина Е. В., Шишкина Т. В., Астраханова Т. А., Мухина И. В. Антигипоксические и

нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии in vitro и in vivo // СТМ. - 2014. - Т. 6. - № 4. - С. 38-47.

4. Brené S., Messer C., Okado H., Hartley M., Heinemann S. F., Nestler E. J. Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element // Eur J Neurosci.- 2000. - V. 12. - P. 1525-1533.

5. Балашова А. Н., Дитятев А. Э., Мухина И. В. Формы и механизмы гомеостатической синаптической пластичности // СТМ. - 2013. - Т. 5. № 2. - С. 98-107.

© Ведунова М.В. с соавт., 2015

УДК: 616 — 089.843

## **ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ПОЛА НА УРОВЕНЬ ТРЕВОЖНОСТИ И ГРУММИНГ У КРЫС ЛИНИИ WAG/Rij С ИЗМЕНЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ КОРОТКОЙ ИЗОФОРМЫ D2 РЕЦЕПТОРА**

*Ахмадеев А.В., Леушкина Н.Ф., Галеева Л.Ф.  
Башкирский государственный университет, Уфа*

Значительный вклад в совершенствование лечения эпилепсии может внести фармакогенетика, достижения которой позволят индивидуализировать терапевтический подход к лечению эпилепсии, а также снизить риск возникновения побочных эффектов (Авакян и соавторы, 2010). В успешном решении указанных задач большую роль играет наличие моделей патологии мозга, которые позволяют в экспериментах на животных углубить имеющиеся представления о механизмах развития заболевания, а также осуществить проведение исследований по поиску новых лекарственных препаратов.

Крысы линии WAG/Rij являются инбредной линией с генетически детерминированной абсансной эпилепсией. Абсансы («petitmal», малый припадок) имеют высокоспецифичные поведенческие проявления, и сопровождаются определенными электрофизиологическими паттернами. Они широко используются в качестве адекватной модели для изучения механизмов генерализованной абсансной эпилепсии человека (CoenenandvanLuijtelaar, 2003), причины возникновения которой остаются до настоящего времени неизвестными.

Известно, что у крыс линии WAG/Rij одним из патогенетических механизмов эпилептической активности является гипофункция дофаминергической системы мозга (Kuznetsovaetal., 2000). Предполагается, что дефицит дофаминергической системы у крыс линии

WAG/Rij может быть предопределен изменением функционирования дофаминовых рецепторов (Кузнецова и др., 1996; Базян и др., 2001, Vigioukovaetal., 2005; Midzyanovskaya, 2006). Рецепторы D2 являются наиболее распространенным типом дофаминовых рецепторов. Они представлены в коре головного мозга, в среднем мозге, и особенно широко в лимбической системе. От режима функционирования данных рецепторов и уровней дофамина (ДА) зависит стратегия приспособительного поведения (Шаляпина, 2005), которая может проявляться в двух формах – активной и пассивной.

Проведенные исследования полиморфизма Таq 1A рестрикционного локуса гена, кодирующего синтез дофаминовых рецепторов второго типа (*DRD2*) у крыс линии WAG/Rij показали наличие двух аллелей ( $A_1$  и  $A_2$ ) в этом локусе и выявили частоту представительства генотипов  $A_1/A_2$ ,  $A_1/A_1$  и  $A_2/A_2$  в популяции этой линии крыс (Калимуллина и соавторы, 2005).

Показано, что аллель  $A_1$  локуса Таq 1 *ADRD2* находится в неравновесии по сцеплению ( $D'=0,855$ ) с минорными аллелями (Т) двух фланкирующих 6 экзон интронных локусов (*rs 2283265* и *rs 1076560*) этого гена, снижающими экспрессию короткой изоформы рецептора (*D2S*). Приведенные данные (Zhangetal., 2007) подтверждены и Jocham etal. (2009), показавшими наличие неравновесия по сцеплению между локусами *rs 1800497* и *rs 2283265* ( $D' = 0.78$ ). Так как *DRD2* у крысы на 95% гомологичен с этим геном человека (Jonathan, Sagvolden, 2005), можно полагать, что выявленная закономерность имеет место и у крыс. Известно, что снижение экспрессии *D2S* и изменение в силу этого соотношения длинной и короткой изоформ приводит к повышению синтеза и выделения ДА, что предопределяет повышение его содержания в тканях мозга (Usielloetal., 2000, Bertolinoetal., 2009 и др.).

Исходя из сказанного выше целью работы стало выявление уровня тревожности и особенностей ориентировочно-исследовательского поведения у крыс линии WAG/Rij с генотипом  $A_1/A_1$  по локусу Таq 1 *ADRD2* с учетом фактора пола.

Субпопуляция крыс линии WAG/Rij с генотипом  $A_1/A_1$  по локусу Таq 1 *ADRD2* впервые получена на кафедре МФЧЖ БашГУ путем скрещивания гомозиготных особей, выявленных генетическим анализом указанного локуса в исходной популяции этих крыс (Калимуллина и др., 2005).

Ориентировочно-исследовательское поведение крыс в условиях новизны обстановки изучали в установке «открытое поле». Показатели тревожности, выявившиеся у крыс при изучении их ориентировочно-исследовательского поведения, анализировали с помощью теста «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ).

Исследование половых различий при изучении ориентировочно-исследовательского поведения показало, что самки крыс с генотипом  $A_1/A_1$  по указанному локусу *DRD2* по сравнению с самцами обладают большей двигательной и исследовательской активностью ( $p < 0,001$ ), показывают более интенсивный груминг ( $p < 0,001$ ) при отсутствии различий в иммобилизации и выраженности вегетативных компонентов. Основные компоненты поведения в тесте «открытое поле» у самок и самцов изучаемой популяции представлены на рисунке 1.

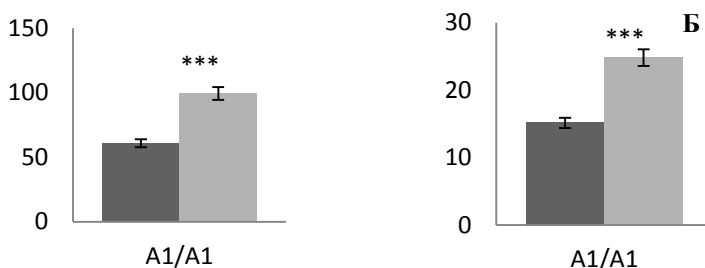


Рис.1. Особенности поведения в ОП у самцов (черный столбик) и самок (серый столбик) крыс линии WAG/Rij с генотипом  $A_1/A_1$  по локусу Taq 1 *ADRD2* : А - общая двигательная активность; Б - общая исследовательская деятельность

Выявленные половые различия, характеризующие большую активность самок крыс в условиях новизны обстановки, согласуются с имеющимися в литературе данными по крысам линии Вистар (Ордян, 2005, Cabrera et al., 2002, Frye et al., 2000, 2006.), которые объясняет этот феномен меньшей выраженностью у них тревожности.

Изучение половых различий поведения в ПКЛ крыс с генотипом  $A_1/A_1$  выявило меньший уровень тревожности у самок. Это нашло отражение в том, что самки по сравнению с самцами этой группы, чаще посещали ОР ( $p < 0,001$ ). При этом время, проведенное ими в ЗР меньше ( $p < 0,05$ ), чем в ОР ( $p < 0,01$ ) по сравнению с самцами. Время иммобилизации у самцов в ЗР превышало аналогичный показатель у самок в десять раз, что является показателем (в совокупности с другими) наличия у них большего уровня тревожности (Рис.2).

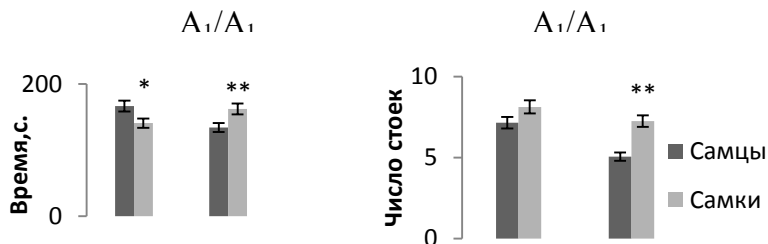


Рис.2. Показатели поведения самцов и самок крыс в ПКЛ: А - длительность пребывания в ОР и ЗР лабиринта самцов и самок крыс с генотипом А<sub>1</sub>/А<sub>1</sub> (с); Б - число стоек в ОР и ЗР лабиринта у

Изучение поведения самцов и самок крыс, имеющих различия генотипа локуса Таq 1*ADRD2*, в приподнятом крестообразном лабиринте показало наличие половых различий в группе крыс с генотипом А<sub>1</sub>/А<sub>1</sub>. Они проявляются в показателях предпочтения ОР и ЗР лабиринта, количестве совершаемых стоек, по продолжительности времени иммобилизации. Самцам с генотипом А<sub>1</sub>/А<sub>1</sub> присуща большая тревожность. Также можно отметить, что явления стереотипии (челночные передвижения из рукава лабиринта в другой), имеют место как у самцов, так и самок этой группы.

### Список литературы

1. Авакян, Г.Н. Экспериментальная и клиническая эпилептология / Г.Н.Авакян, О.Л. Бадалян, С.Г. Бурд, Г.Г. Авакян, А.С. Чуканова, М.И. Стойко, А.А. Савенков, Е.А. Вальдман, Т.А. Воронина, Л.Н. Неробкова, Е.В. Крикова // Эпилепсия. - 2010. - № 4. - С. 41-54.
2. Базян, А.С. Возможные механизмы формирования типологических особенностей поведения крыс линии WAG/Rij / А.С. Базян, И.С. Мидзяновская, Г.Д. Кузнецова, К.Ю. Саркисова, В.М. Гецова, Н.В. Орлова, А.А. Лушкин // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.
3. Калимуллина, Л.Б. Полиморфизм Таq 1А рестрикционного локуса гена DRD<sub>2</sub> и гена DAT<sub>1</sub> у крыс линии WAG/Rij / Л.Б. Калимуллина, А.В. Ахмадеев, А.Ф. Бикбаев // Медицинская генетика. - 2005. - №5. - С.198-199.
4. Шаляпина, В.Г. Основы нейроэндокринологии / В.Г. Шаляпина // СПб.: Элби, 2005. - 156 с.

5. Coenen, A.M.L. Genetic animal models for absence epilepsy: a review of the WAG/Rij strain of rats / A. M. L. Coenen, E.L.J.M. van Luijtelaar // Behavior Genetics. - 2003. - V.33 (6). - P. 635–655.
6. Jocham, G. Dopamine DRD2 polymorphism alters reversal learning and associated neural activity /G. Jocham, T.A. Klein, J. Neumann, D.Y. von Cramon, M. Reuter, M.J. Ullsperger // Neurosci. -2009. - V.29. - №12. - P.3695-3704.
7. Kuznetsova, G.D. Generalized absence epilepsy and catalepsy in rats / G. D. Kuznetsova, E.V. Petrova, A.M. Coenen, S. A. Chepurnov, G. van Luijtelaar // Physiology and Behavior. - 1996. - V.60. - P.1165-1169.
8. Kuznetsova, G. D. Mixed forms of epilepsy in a sub-population of WAG/Rij rats. In: The WagRij rat model of absence epilepsy / G.D. Kuznetsova, A.M.L. Coenen, E.L.M.van Luijtelaar // The Nijmagan. - Moscow research. - 2000. - Nijmegen. - NICI. -141 p.2001. - № 6. - C.709-715.
9. Midzianovskaya, I.S. Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats / I.S. Midzianovskaya, G.D. Kuznetsova, A.M. Coenen, A.M. Spiridonov, E.L. van Luijtelaar // Brain Research. - 2001. - V.91. - P.62-70.
10. Zhang, Y. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory / Y. Zhang, A. Bertolino, L. Fazio, G. Blasi, A. Rampino, R. Romano, T. Mei-Ling Lee, Tao Xiao, A. Papp, D. Wang, W. Sadee // Journal The Proceedings of the National Academy of Sciences USA. - 2007. - V.104. - №51. - P.20552-20557.

©A.B.Ахмадеев, 2015

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1 И 2 ТИПОВ В РЕАЛИЗАЦИИ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО И АНТИГИПОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ N-АРАХИДОНОИЛДОФАМИНА (N-ADA) ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ IN VITRO**

**Митрошина Е.В.<sup>1,2</sup>, Ведунова М.В.<sup>2,1</sup>, Сахарнова Т.А.<sup>1,2</sup>,  
Хаспеков Л.Г.<sup>3</sup>, Мухина И.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний  
Новгород, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Нижегородский государственный университет им.  
Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научный центр неврологии», Москва, Россия

На сегодняшний день ишемический инсульт является одной из главных причин смертности и тяжелой инвалидизации населения как в России, так и во всем мире. Гипоксия является одним из ключевых факторов повреждения клеток головного мозга при ишемическом инсульте. Клетки головного мозга особенно чувствительны к дефициту кислорода, снижение его концентрации в межклеточной среде приводит к нарушению процессов синаптической передачи и гибели части нейронов, являющихся ключевыми составляющими нейронных сетей головного мозга. Поиск и изучение соединений, способных активировать эндогенные системы организма, адаптирующие организм к действию неблагоприятных факторов, в том числе гипоксии, является чрезвычайно актуальной задачей, имеющей важное научное и социальное значение.

Нейролипиды относятся к одному из активно исследуемых в последнее время семейств нейроактивных липидов. В состав данного семейства входят эндогенные амиды жирных кислот с биогенными аминами, а также эфирные производные - 2-ацилглицерины. Наиболее изученными мишенями действия нейролипидов являются каннабиноидные рецепторы 1 и 2 типов (CB1 и CB2), принадлежащих к суперсемейству А рецепторов, сопряженных с G-белком. Каннабиноидные рецепторы 1 типа широко экспрессируются клетками нервной системы, прежде всего на пресинаптических аксонных терминалях [1, 2]. Также показано их присутствие на мембранах митохондрий нейронов, где они непосредственно регулируют клеточное

дыхание и выработку энергии. Кроме нейронов, каннабиноидные рецепторы экспрессируют и глиальные клетки.

Современные представления о работе эндогенной каннабиноидной системы позволяют говорить о том, что нейроактивные липиды играют важную роль в модуляции синаптической передачи и поддержании нормального функционирования нервной системы [3]. Регуляция активности нейронов каннабиноидами в условиях ишемии оказывает нейропротекторное действие, что было показано рядом исследований на различных моделях как *in vivo* и *in vitro* [4, 5]. Наибольший интерес в качестве веществ, способных регулировать адаптационные системы организма, представляют собой те представители эндоканнабиноидов, которые не обладают психогенными эффектами и при этом проявляют максимальные нейропротекторные свойства. Перспективным соединением с этих позиций является недавно открытый и синтезированный эндоканнабиноид N-арахидоноилдофамин (N-ADA), являющийся лигандом каннабиноидных рецепторов как первого, так и второго типов и демонстрирующий нейропротекторные свойства [6-8]. Конкретные молекулярные механизмы его нейропротекторного действия остаются мало изученными. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение выявления возможных молекулярных механизмов защитного действия N-ADA и влияния гипоксии и N-ADA на уровень экспрессии каннабиноидных рецепторов.

Исследования проводились на первичных культурах гиппокампа, полученных от 18-дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6. Моделирование нормобарической гипоксии проводили на 14 день развития путем замены культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода. Исследование функциональной активности нейронных сетей первичных культур гиппокампа проводилось с использованием мультиметрической системы MEA60 (MultichannelSystems) и функционального кальциевого имиджинга с применением  $Ca^{2+}$ -чувствительного красителя Oregon Green (Invitrogen) и конфокальной микроскопии (Zeiss LSM510, Германия). Для оценки уровня экспрессии каннабиноидных рецепторов 1 типа использовался метод прижизненной детекции мРНК с помощью РНК-зондов (SmartFlare, Merck Millipore). Использование РНК-зондов дает возможность прижизненно исследовать *in vitro* активацию гена и появление в цитоплазме мРНК белка интереса.

Изучение функциональной активности нервных клеток показало, что на 14 день культивирования первичных культур клеток гиппокампа формируется сетевая активность, как электрическая, так и кальциевая. Гипоксическое воздействие вызывает катастрофическое снижение уровня спонтанной активности культур. Показано, что активация

каннабиноидных рецепторов с помощью аппликации N-ADA 10 мкМ во время моделирования гипоксии отчасти сохраняет спонтанную биоэлектрическую активность нейронных сетей в течение 7 дней после моделирование гипоксии (рис. 1).

Выявлено, что нейропротекторный эффект оказывает активация каннабиноидных рецепторов 1 типа, поскольку их блокада с помощью антагониста SR141716A (SR1) нивелировала нейропротекторное действие N-ADA, в то время как блокада CB2 с помощью антагониста SR144528 (SR2) существенного влияния не оказывала.

Изучение функциональной кальциевой активности в постгипоксическом периоде показало, что гипоксия вызывает необратимые изменения функциональной кальциевой активности. Через 7 суток после моделирования нормобарической гипоксии наблюдалось достоверное ( $p < 0,05$ , ANOVA) снижение числа клеток проявляющих спонтанную кальциевую активность (рис. 2). Полученные с помощью кальциевого имиджинга данные подтверждают ключевую роль каннабиноидных рецепторов 1 типа в реализации нейропротекторного действия N-ADA на индуцированные гипоксией изменения спонтанной кальциевой активности нейронных сетей диссоциированных культур гиппокампа.

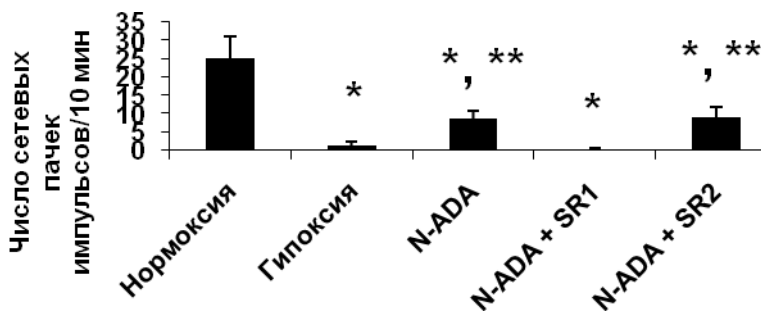


Рис. 1. Количество малых сетевых пачек импульсов за 10 минут в культурах клеток гиппокампа на 7 сутки после гипоксии, \* - различия в сравнении с группой «Нормоксия» достоверны ( $p < 0,05$ ), \*\* - различия с группой «Гипоксия» достоверны, ANOVA

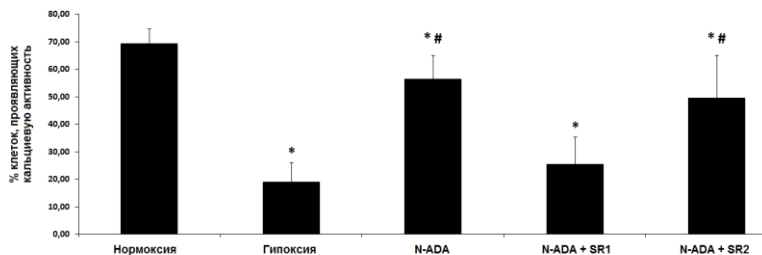


Рис. 2. Доля клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность культурах клеток гиппокампа на 7 сутки после гипоксии, \* - различия в сравнении с группой «Нормоксия» достоверны ( $p < 0,05$ ), # - различия с группой «Гипоксия» достоверны, ANOVA

В связи с этим следующей задачей исследования явилась оценка уровня экспрессии CB1 рецепторов при действии N-арахидоноилдофамина.

Прижизненная детекция мРНК CB1 рецепторов выявила, что мРНК CB1 активно синтезируется как нейронами, так и глиальными клетками. Показано, что N-ADA достоверно ( $p < 0,05$ , ANOVA) снижал количество мРНК CB1 позитивных клеток в культуре (рис. 3) при нормоксии. В контрольной группе культур экспрессия мРНК CB1 детектировалась в  $37,7 \pm 5,41$  % клеток, а через 48 часов после аппликации  $10 \text{ мкМ}$  N-ADA – в  $24,4 \pm 7,26$  % клеток. Таким образом, показано, что экзогенная аппликация N-ADA приводит к изменению уровня экспрессии мРНК каннабиноидных рецепторов 1 типа. На следующем этапе планируется исследование воздействия гипоксии на уровень экспрессии мРНК CB1 рецепторов.

Публикация подготовлена в рамках выполнения государственной работы «Обеспечение проведения научных исследований», Работа частично поддержана грантом (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОНРФ и ННГУ)



7. Grabiec U., Koch M., Kallendrusch S. et al. // Neuropharm. 2012. Vol. 62. P. 1797-1807.

8. Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Сахарнова Т.А. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. №10. С.447-451.

© Е.В. Митрошина с соавт., 2015

УДК: 616 — 089.843

## **ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ ГИПОКСИИ**

**Мищенко Т.А.<sup>1,2</sup>, Ведунова М.В.<sup>2,1</sup>, Щелчкова Н.А.<sup>1</sup>, Терентьева К.А.<sup>1</sup>,  
Косарева М.А.<sup>1</sup>, Халецкая О.В.<sup>1</sup>, Мухина И.В.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний  
Новгород, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Нижегородский государственный университет им.  
Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

Гипоксия рассматривается как одно из ключевых звеньев ишемического поражения центральной нервной системы (ЦНС). В условиях сниженного содержания кислорода происходят глобальные функционально-метаболические изменения (нарушение синаптической передачи, активация свободно-радикальных процессов и др.), приводящие к гибели клеток и разрушению нейрон-глиальных взаимодействий в головном мозге. В связи с этим актуальной проблемой в современной нейробиологии является поиск сигнальных молекул, отражающих степень гипоксических повреждений для разработки новых методов комплексной диагностики нейрососудистых заболеваний.

Среди веществ, которые потенциально могут выступать в качестве диагностического критерия при оценке степени поражения ЦНС, являются ключевые представители семейства нейротрофинов - нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и глиальный нейротрофический фактор (GDNF).

Нейротрофический фактор головного мозга принимает активное участие не только в нейрогенезе, обеспечивая активную дифференцировку и пролиферацию нейронов, образование

синаптических контактов, но и в регуляции метаболических процессов, протекающих в клетках в постнатальном периоде [1]. Недавними исследованиями было показано, что BDNF обладает выраженными нейротрофическими, антиапоптотическими свойствами и играет важную роль при ишемических и нейродегенеративных заболеваниях [2,3].

Глиальный нейротрофический фактор - важная сигнальная молекула, секретируемая клетками глии (астроциты, шванновские клетки), способствует пролиферации и дифференцировке различных популяций клеток центральной и периферической нервной системы [4]. Выявлено, что GDNF сохраняет выживаемость и функциональную активность нервных клеток в условиях воздействия стресс-факторов [5].

Целью настоящего исследования стало выявление диагностического значения определения содержания нейротрофических факторов (BDNF, GDNF) при гипоксическом воздействии.

На первом этапе исследований для определения степени вовлеченности нейротрофических факторов BDNF, GDNF в патологические процессы, связанные со снижением уровня содержания кислорода была проведена оценка концентрации нейротрофинов в крови и гомогенате головного мозга экспериментальных животных при моделировании острой нормобарической гипоксии (ОГБГ). В качестве экспериментального материала были выбраны половозрелые самцы мышей линии C57BL/6. Для моделирования ОГБГ использовалась вакуумная проточная барокамера. Мыши помещались в условия, соответствующие подъему на высоту 10000-10500 м (170-185 мм рт. ст.) со скоростью 183 м/с. Время пребывания животного в барокамере составляло 10 минут, по истечении которого, либо до появления второго агонального вдоха, особей подвергали немедленному «спуску» с моделируемой высоты. Для каждого животного регистрировалось время жизни на «высоте» (Тж), время потери и восстановления физиологической позы. В качестве дополнительного параметра оценки срочной адаптации животных к воздействию гипоксии проводился анализ устойчивости особей к воздействию острой гипоксии: низкоустойчивые особи (Тж менее 3 мин), среднеустойчивые (Тж от 3 до 9 мин) и высокоустойчивые (Тж более 9 мин без видимых проявлений гипоксического повреждения). На следующий день после моделирования ОГБГ осуществлялся забор биологического материала у животных. Кровь центрифугировали в течение 15 минут при 250g. Для изучения уровня нейротрофинов в межклеточном пространстве головного мозга производили его гомогенизацию в холодном физиологическом растворе в течение 1 минуты, затем центрифугировали при 40С при 200g. Полученная плазма крови и гомогенат головного мозга мыши использовались для определения показателей BDNF, GDNF. Содержание

BDNF, GDNF определяли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов Elisa Kit (CUSABIO, Китай).

Вторая серия экспериментов заключалась в определении концентрации нейротрофических факторов (BDNF, GDNF) в плазме крови новорожденных с гестационным возрастом 31 – 42 недель. В ходе осмотра, оценки динамики неврологического статуса и нейросонографического обследования дети были разделены на две группы: в 1-ю включены дети с неонатальными судорогами гипоксического генеза (n=5), во 2-ю — с тяжелым постгипоксическим поражением нервной системы с формированием атрофических процессов в головном мозге без судорожных проявлений (n=5). Контрольную группу составили здоровые новорожденные. Определение концентрации BDNF, GDNF (R&D Systems, США) осуществлялось методом иммуноферментного анализа при поступлении ребенка в стационар и через 10-14 дней после проведения терапии.

Обработка и анализ полученных данных проводился с использованием пакета программ ANOVA. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

В результате проведенных исследований было показано, что острая гипобарическая гипоксия негативно влияла на жизненные и поведенческие показатели опытных особей. Время жизни на "высоте" в среднем составляла  $6,18 \pm 0,76$  минут, время потери позы -  $2,23 \pm 0,22$  минуты, время восстановления позы -  $4,29 \pm 1,17$  минуты. Опытная группа была представлена в основном среднеустойчивыми (50%) и низкоустойчивыми (21,5%) животными. Процент высокоустойчивых особей составил 28,5%. Определение содержания нейротрофических факторов BDNF, GDNF в гомогенате мозга на следующие сутки после моделирования ОГБГ показало достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение уровня нейротрофинов у опытных животных относительно интактной группы. Схожая динамика изменений наблюдалась при анализе уровня BDNF и GDNF в сыворотке крови экспериментальных животных (табл. 1). Несмотря на то, что не было выявлено достоверных различий в концентрации нейротрофинов в крови экспериментальных животных, показанные тенденции дают нам основание предполагать наличие прогрессирующих морфофункциональных изменений головного мозга в отдаленном постгипоксическом периоде.

Таблица 1

Содержание BDNF и GDNF в биологических субстратах  
экспериментальных  
животных (M [ min; max])

	Интанктные	ОГБГ
BDNF пг/мл, мозг	158,30 [114,6; 198,2]	113,87* [97,0; 125,6]
GDNF пг/мл, мозг	18,91 [13,5; 25,0]	13,50* [11,6; 15,70]
BDNF пг/мл, кровь	54,13 [39,4; 67,0]	48,42 [42,0; 58,3]
GDNF пг/мл, кровь	5,30 [3,40; 7,30]	4,23 [3,50; 5,1]

\*- различия с группой «Интанктные» достоверны,  $p < 0,05$ , ANOVA

Исследование концентрации нейротрофического фактора BDNF в плазме крови новорожденных показало, что в обеих группах больных после проведения курса терапии наблюдалась выраженная тенденция к увеличению концентрации нейротрофического фактора BDNF на 36,87% (в 1-й группе) и 22,01% (во 2-й группе) ( $p < 0,05$ ). Обнаружена взаимосвязь между концентрацией BDNF в плазме крови и неврологическим статусом больного после курса лечения ( $r = -0,81$ ). Выявлено, что неблагоприятным прогностическим признаком являлось исходное повышение BDNF свыше 4000 пг/мл (разведение плазмы крови 1:10). Для таких пациентов установлена неэффективность применяемой терапии и усугубление неврологических нарушений.

Концентрация GDNF в плазме крови у детей в обеих группах была несколько ниже, чем в контрольной группе, что может быть обусловлено угнетением репаративных процессов в нервной ткани после перенесенной тяжелой гипоксии (табл. 2).

Таблица 2

Динамика концентрации нейротрофических факторов BDNF, GDNF в плазме крови новорожденных с перинатальным гипоксическим поражением ЦНС

	Контроль	1-я группа	2-я группа
BDNF пг/мл (разведение плазмы крови 1:10)	641±211,15	До лечения: 1296±315,26 После лечения: 2168±281,23*	До лечения: 1103±143,21 После лечения: 1345±196,78*
GDNF пг/мл	9,55±0,89	До лечения: 7,09±0,70 После лечения: 8,24±1,02	До лечения: 6,43±0,63* После лечения: 7,29±1,27*

\* - различия с группой "Контроль" достоверны,  $p < 0,05$ , ANOVA

Таким образом, проведенные исследования показали, что при гипоксическом повреждении происходят существенные изменения уровня содержания нейротрофических факторов BDNF, GDNF во всех исследуемых биологических материалах (гомогенат головного мозга, плазма крови). Наибольшей диагностической значимостью для оценки степени гипоксического поражения ЦНС обладает концентрация нейротрофического фактора BDNF.

Работа поддержана грантами РФФИ №14-04-31601, № 13-04-01871, №13-04-12067 и частично поддержана грантом (соглашение от 27 августа 2013г. № 02.В.49.21.0003 между МОН РФ и ННГУ). Публикация подготовлена в рамках выполнения государственной работы «Обеспечение проведения научных исследований».

### Список литературы

1. Сахарнова Т.А., Ведунова М.В., Мухина И.В. Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и его роль в функционировании центральной нервной системы // Нейрохимия. - 2012. -Т. 24. - № 4. - С. 269-277.
2. Chen A., Xiong L-J., Tong Y., Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury // Biomedical reports. - 2013. - V. 1. - P. 167-176.
3. Vedunova M.V, Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Mukhina I.V. TrkB-mediated neuroprotective and antihypoxic properties of Brain-derived neurotrophic factor // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. - 2015. - V. 2015. - Article ID 453901. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/453901>.

4. Airaksinen M. S., Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value // Neuroscience. - 2002. - V. 3. - P. 383-394.

5. Ведунова М. В., Сахарнова Т. А., Митрошина Е. В., Шишкина Т. В., Астраханова Т. А., Мухина И. В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии in vitro и in vivo // СТМ. - 2014. - Т. 6. - № 4. - С. 38-47.

© Мищенко Т.А. с соавт., 2015

УДК 612.821

## **ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ МОЗЖЕЧКА**

**Шишкин И.В.<sup>1</sup>, Насырова Е.В.<sup>1</sup>, Азнабаев О.Ф.<sup>2</sup>  
Хисматуллина З.Р.<sup>1</sup>, Лобанов С.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа,

<sup>2</sup>Башкирский государственный педагогический университет, Уфа,  
lobanovprof@yandex.ru

Гипоксия оказывает влияние на нейроны и клетки глии головного мозга (1,3,4,6), в том числе и мозжечка. В этих условиях в клетках и межклеточном матриксе мозга изменяется содержание белков, углеводов, липидов, различных метаболитов (2,3,5) и т.д. Существенная роль в регуляции деятельности клеток как в обычных условиях, так и при стрессе отводится гликокаликсу, в состав которого входят гликозаминогликаны (4,7,8). В литературе недостаточно полно отражены вопросы, связанные с изменением содержания и соотношения разных классов гликозаминогликанов и их топографией.

Целью является выявление влияния гипоксии на состав и содержание гликозаминогликанов мозжечка.

Материалы и методы исследования.

Исследования проводились на половозрелых крысах породы Вистар с массой тела 205±15 г в дневное время суток в осенне-зимний период. Гипоксия моделировалась при помещении животных (31 крыса) в барокамеру с пониженным атмосферным давлением (400 мм рт. ст.) в дневное время суток (в течение 8 часов) по следующей схеме: 45 минут в условиях гипоксии + 15 минут при обычном атмосферном давлении для

вентиляции барокамеры. Экспериментальная гипоксия продолжалась в течение 30 суток. Все животные контрольной (12 крыс) и экспериментальной групп содержались в стандартных условиях вивария с одинаковым пищевым и питьевым режимом. (Приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г., Приказ Минздрава СССР № 1509 от 30 декабря 1983 г.).

Животные выводились из эксперимента на 1,3, 7, 14, 21 и 30 сутки.

Гистохимические исследования проводились для изучения нейронов мозжечка крыс и выявления тигроидного вещества (проводилось окрашивание стандартных криостатных срезов метиленовой синью и толуидиновым синим).

При исследовании межклеточного матрикса с целью выявления сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов (в %) в ткани мозжечка нами использовались стандартные криостатные срезы при их окрашивании альциановым синим. Для дифференцировки разных классов гликозаминогликанов криостатные срезы мозжечка обрабатывались альциановым синим при разных pH (1,0 и 2,5) и молярностях (раствор  $MgCl_2$  – 0,2-1,0 моль). Для уточнения и контроля исследований проводили метилирование с ферментативным контролем. Для проведения полуколичественного анализа срезы (окрашенные альциановым синим) исследовались на анализаторе фореограмм – АФ-2.

Результаты исследования.

При гипоксии крысы мало двигались, больше лежали, собираясь группами, у них появлялась сонливость, наблюдалась слабость, повышенная утомляемость, одышка. От приема воды животные не отказывались, хотя употребление пищи значительно снизилось.

При действии гипоксии уже в первые трое суток нейроны мозжечка имеют нечеткие, размытые контуры, неодинаковое окрашивание, ткань при этом приобретает мозаичный характер. Цитоплазма клеток по сравнению с ядрами окрашена менее интенсивно. Кровеносные сосуды микроциркуляторного русла полнокровны. В просвете выявляются форменные элементы.

Анализ данных гистохимических исследований показывает динамику гликозаминогликанов в ткани мозжечка (рис. 1).

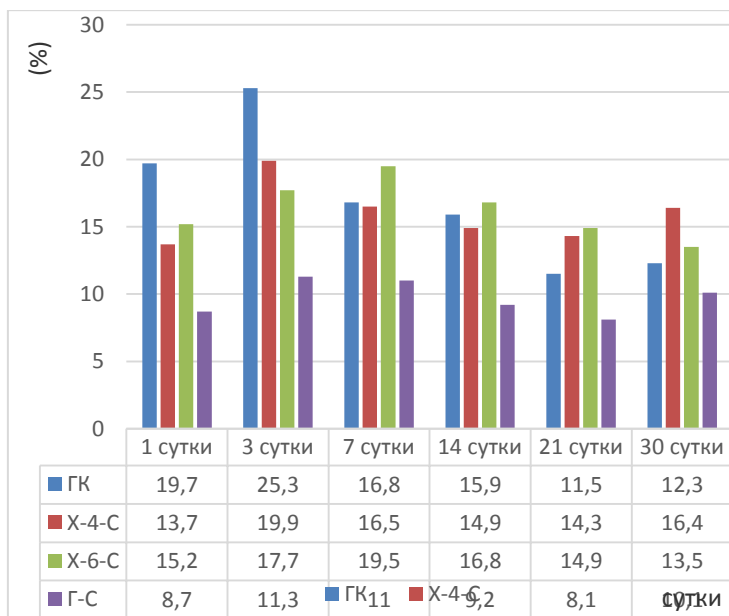


Рис. 1. Соотношение гликозаминогликанов в мозжечке крыс при гипоксии.

ГК-гиалуроновая кислота, X-4-С- хондроитин 4-сульфат, X-6-С- хондроитин 6-сульфат, Г-С-гепаран сульфат

Гипоксия вызвала увеличение содержания несulfатированных гликозаминогликанов и слабо sulfатированных гликозаминогликанов, среди которых преобладали хондроитин 4-сульфат уже к 3 суткам. В этих условиях изменялось не только содержание sulfатированных гликозаминогликанов, но и их соотношение. В большей степени эти изменения соотношения наблюдались между хондроитин 4-сульфат и хондроитин 6-сульфат. Соединения данной группы обладают высокой биологической активностью и оказывают регулирующее влияние на клетки.

К 7 суткам эксперимента среди гликозаминогликанов начинает возрастать уровень хондроитин 6-сульфатов, с одновременным уменьшением содержания и соотношения несulfатированных и слабосulfатированных гликозаминогликанов. Данное изменение нами рассматривается как проявления компенсаторно-адаптивных реакций.

К 7-14 суткам эксперимента наблюдаются явления изменения функциональной активности нейронов. Вокруг клеток Пуркинью

сохраняются явления перичеселлюлярного отека. Нейроны имеют сочные, интенсивно окрашенные ядра, цитоплазматический матрикс с повышенной плотностью. Анализ гистохимических исследований позволяет отметить дилатацию кровеносных сосудов микроциркуляторного русла. В некоторых участках мозжечка наблюдается периваскулярный отек кровеносных капилляров. Нейроны в этих участках имеют просветленный матрикс. Нуклеоплазма по сравнению с цитоплазмой намного светлее. Нами выявлено, что к 14-м суткам эксперимента сохраняются явления разной функциональной активности нейронов и клеток глии мозжечка. Среди клеток глии в этот период выявляются фигуры митоза.

Морфологические исследования позволяют проследить, что на 14-е сутки эксперимента в некоторых участках мозжечка изменяется состав и соотношение сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов, что создает условия, в которых клетки-зерна начинают мигрировать между нейронами Пуркинье и попадают в молекулярный слой. Ганглиозный слой в этот период приобретает мозаичный характер, что является проявлением адаптации. Это явление можно связать в некоторых случаях с явлениями апоптоза, в других случаях с аутолизом клеток. Это ведет к разрушению не только самих клеток, но и окружающего межклеточного матрикса, что способствует и облегчает миграцию клеток-зерен в молекулярный слой.

Исследования мозжечка крыс на 21-е сутки эксперимента позволили проследить гиперемии кровеносных сосудов микроциркуляторного русла мозжечка. Во многих участках сохраняется дилатация. В этот период сохраняются явления миграции клеток-зерен в другие слои мозжечка. В этот период нейроны ганглиозного слоя характеризуются разной функциональной активностью, что проявляется гетерогенностью окрашивания тел этих клеток и сохранением неоднородного состава гликозаминогликанов.

К 30-м суткам эксперимента в мозжечке продолжается миграция клеток-зерен и корзинчатых клеток, как в ганглиозный слой, так и молекулярный.

Функциональная активность клеток Пуркинье в этих условиях была повышена. Ядра этих клеток были более равномерно окрашены, чем в ранние сроки. Вокруг этих клеток наблюдалось расположение клеток глии, клеток-зерен и корзинчатых клеток.

Таким образом, проведенные исследования мозжечка крыс при действии гипоксии позволяют проследить особенности структурных и функциональных изменений нейронов и клеток глии, которые в этих условиях сохраняют достаточно высокую функциональную активность, специфическую и пластическую деятельность.

Следовательно, в ранние сроки после начала эксперимента наблюдается реактивное состояние сосудов, которое в дальнейшем сохраняется и частично сглаживается, но не исчезает полностью и в отдаленные сроки. Специфических изменений в кровеносных сосудах не обнаружено.

В течение первых суток в клетках мозжечка преимущественно выявляются компенсаторно-приспособительные процессы. В более поздние сроки прослеживаются не только дегенеративные явления, но и явления физиологической регенерации.

Гистохимические исследования мозжечка показывают изменения соотношения и содержания разных классов гликозаминогликанов. Выявлено, что с увеличением срока эксперимента наблюдается повышение содержания сульфатированных гликозаминогликанов. Изменения гистохимического состава мозжечка при гипоксии приводят к миграции нейронов из одного слоя в другой.

Полученные нами данные об изменениях нейронов и клеток глии мозжечка позволяют заключить, что нервные клетки сохраняют высокую структурно-функциональную активность, обеспечивая специфическую и пластическую деятельность. Физиологическая дегенерация нейронов, по нашим данным, является незначительной.

### **Список литературы**

1. Власова И.Г. Адаптация к гипоксии на клеточно-тканевом уровне / И.Г. Власова, Н.А. Агаджанян // Нур. Med. J. 1995. - Т. 3. - № 2. - С. 6-10.
2. Влияние высокогорной гипоксии на содержание стабильных метаболитов монооксида азота в крови человека / Л.Б. Доломан, А.В. Коцюруба, А.С. Хромов, В.Ф. Сагач // Нур. Med. J. 2004. Т. 12. - № 3-4. - С. 56-59.
3. Герасимова И.А. Влияние пренатального стресса на перекисное окисление липидов в некоторых отделах головного мозга самцов и самок взрослых крыс / И.А. Герасимова, М.А. Флеров, А.В. Вьюшина // Нейрохимия. 2005. - Т. 22. - № 4. - С.273-278.
4. Емелёва Т.Ф. Структурно-функциональные особенности мозжечка при стрессе: автореф. дисс. . канд. биолог, наук / Т.Ф. Емелёва. — Уфа: 2005. 22 с. Библиогр.: 5 назв.
5. Лобанов С.А. Морфофункциональные изменения митохондрий при стрессе / С.А. Лобанов, А.В. Данилов, Е.В. Данилов, С.К. Асаева, Г.Ф. Арсланова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – № 12. – т. 144. – С. 699-

6. Лобанов С.А. Влияние гипоксии и гиподинамии на функции мозжечка (экспериментальное исследование): монография / С.А. Лобанов, Е.В. Данилов. – Уфа, Изд-во БГПУ им.М.Акмиллы, 2009. - 120 с.

7. Лобанов С.А. Роль гликозаминогликанов в формировании тканей / С.А. Лобанов, А.Ю. Костарев, В.Ю. Корнаузов, Т.Ф. Емелёва, Данилов А.В., Е.В. Данилов // Вестник Башкирского государственного педагогического университета им. М.Акмиллы. – 2009. – №1(18). – С. 67-

8. Пшенникова М.Г. Влияние адаптации к гипоксии на устойчивость к нейродегенеративному повреждению мозга у крыс разных генетических линий / М.Г. Пшенникова // Вестник Российской академии медицинских наук. 2007. - № 2. - С. 50-55.

©И.В. Шишкин, 2015

УДК: 616 — 089.843

## **ОСОБЕННОСТИ ПИК-ВОЛНОВЫХ РАЗРЯДОВ ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ НЕОКОРТЕКСА КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ, ГОМОЗИГОТНЫХ ПО АЛЛЕЛЮ A2 ЛОКУСА TAQ 1A РЕЦЕПТОРА ДОФАМИНА ВТОРОГО ТИПА**

**Федорова А.М.<sup>1</sup>, Калимуллина Л.Б.<sup>1</sup>, Кузнецова Г.Д.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа,

<sup>2</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
Москва, marmishka-06@mail.ru

Адекватной моделью для изучения механизмов абсансной эпилепсии человека являются крысы линии WAG/Rij (van Luijteleaag и Soenen, 1987). Абсансы у этих крыс имеют высокоспецифичные поведенческие проявления и сопровождаются определенными ЭЭГ паттернами (Meegen et al, 2004). Показано, что в ЭЭГ крыс линии WAG/Rij регистрируются типичные для абсансной эпилепсии пик-волновые разряды (ПВР первого типа). Но у 50% крыс линии WAG/Rij наряду со пик-волновыми разрядами первого типа имеют место пик-волновые разряды второго типа (Midzyanovskaya, 2006).

Показано, что дофаминергическая система вовлечена в патогенез абсансной эпилепсии у крыс линии WAG/Rij (Kuznetsovaetal., 1996; Midzyanovskaya, Kuznetsova, 2001). Предположение о том, что ведущую роль при этом играет изменение функционирования DRD<sub>2</sub> (Midzyanovskaya, 2006) основано на результатах экспериментов с введением агонистов и антагонистов DRD<sub>2</sub>.

Целью работы является исследование особенностей пик-волновых разрядов на электроэнцефалограмме неокортекса крыс линии WAG/Rij,

гомозиготных по аллелю A<sub>2</sub> локуса Таq 1A рецептора дофамина второго типа.

### **Материал и методы**

Исследование проведено на группе половозрелых 6-месячных крыс: гомозиготных крысах линии WAG/Rij с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> (n=12) по локусу Таq 1A гена рецептора дофамина второго типа. Субпопуляции крыс линии WAG/Rij получены в результате скрещивания гомозиготных A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> по локусу Таq 1A гена DRD<sub>2</sub> крыс, выявленных в исходной популяции генетическим анализом, показавшим наличие полиморфизма указанного локуса (Калимуллина и соавторы, 2005).

Для проведения электрофизиологических исследований использовали стереотаксический метод вживления хронических электродов (наркотизатор хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг.) с координатами фронтальная кора (AP- +3; L-3); теменная кора (AP-0; L-5); затылочная кора (AP- -6; L-3). Референтный электрод располагали над мозжечком. Запись осуществляли в программе EEGView (А. М. Спиридонов) на электроэнцефалографе BioskriptBST-2000 (Германия). Частотный состав электроэнцефалограммы определялся в диапазоне от 1 до 25 Гц, частота опроса (дискретизации) составляла 128 мс, постоянная времени – 0,3с, фильтр высокой частоты – 70 Гц. Данные ЭЭГ обрабатывали с помощью визуального анализа и вейвлет-анализа. Для анализа частотно-временных характеристик пик-волновых разрядов использовали вейвлет-преобразование Морле и его модифицированный вариант, предложенный Босняковой и Обуховым (2005) и Габовой и др. (2008), позволяющий выделить динамику частоты разряда.

### **Результаты исследования**

Пик-волновые разряды первого типа характеризуются тем, что они широко генерализованы по коре, имеют высокую амплитуду пиков, которая в полтора-два раза превышает основной ритм ЭЭГ, длительность большинства разрядов составляет более 4 секунд. Частота комплексов «пик-волна» в разрядах приблизительно одинаковая во всех отведениях, включая и затылочное отведение. Для крыс с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> свойственны короткие разряды первого типа, продолжительность, которых менее 4 секунд.

У крыс с генотипом A<sub>2</sub>/A<sub>2</sub> наряду с выше описанными разрядами первого типа, были зафиксированы другие типы пароксизмальной активности. Для них характерна небольшая продолжительность, меньшая амплитуда пиков в ПВР, по сравнению с разрядами первого типа. Они имеют противоположное по сравнению с разрядами первого типа позитивное смещение. Еще одна специфическая черта таких разрядов заключается в том, что они локальны, встречаются преимущественно в затылочном отведении. Они отличаются также более низкой частотой –

около 6 Гц, слабой выраженностью возбуждающего компонента – пика, и состояли в среднем из 3-10 комплексов «пик-волна», и имеют продолжительность не более 3 секунд. Эти комплексы «пик-волна» носят название разрядов второго типа (VanLuijteleaar, Coenen, 1987).

Разряды второго типа были отмечены среди животных второй группы у двух крыс. У них было зарегистрировано 32 разряда второго типа, они были выражены в затылочной области коры мозга. Длительность разрядов колебалась от одной до трех секунд. На рисунке 1 представлен разряд второго типа, зарегистрированный у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ . Разряд имеет продолжительность, равную 2,5 секундам, состоит из 8 комплексов «пик-волна».

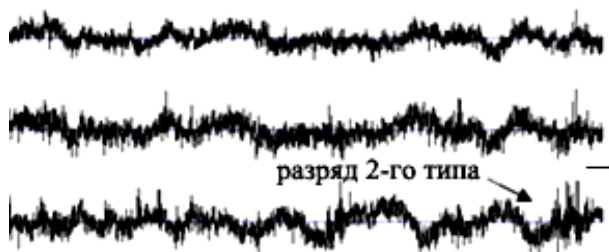


Рис. 1. Разряды 1-го и 2-го типа на трехканальной записи электроэнцефалограммы (фронтальная кора, теменная кора, затылочная кора) крыс группы  $A_2/A_2$  Калибровка 1с, 500мкв.

У крыс с генотипом  $A_2/A_2$  эпилептичность выражается наличием, как разрядов первого, так и второго типов.

Для этой группы крыс свойственны ПВР небольшой продолжительности, менее 4 секунд. На рисунке 36 представлены вейвлет-преобразования одного из таких коротких разрядов. Как следует из компьютерной записи (рис.2а), разряд имеет длительность около двух секунд. Он начинается с высокой частоты – 14-16 Гц (рис. 2в). В течение всего разряда происходит стремительное снижение его частоты. Скорость снижения частоты у коротких разрядов обычно 1Гц/с или более. Иногда на этом фоне наблюдается небольшое временное повышение частоты (рис. 2в – на отметке 1,5 с можно наблюдать незначительный подъем частоты). Средняя начальная частота комплексов «пик-волна» составляет  $12,8 \pm 0,13$  Гц, это значение вытекает из анализа модифицированных вейвлет преобразований. Коэффициент вейвлета (W), который можно рассмотреть на трехмерном графике, у крыс данной группы колеблется в диапазоне 1000-1500 (рис. 2б).

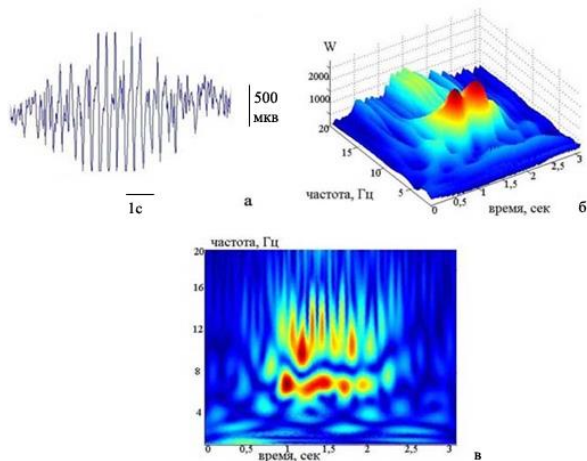


Рис. 2. Частотно-временная динамика короткого разряда, зарегистрированного у крыс с генотипом  $A_2A_2$ . а) запись разряда пик-волна; б) трехмерный график данного разряда, построенный с помощью преобразования вейвлет Морле. По осям на трехмерном графике – время (сек), частота (Гц), коэффициент вейвлета ( $W$ ); в) анализ с помощью модифицированного вейвлета. Калибровка 1с, 500мкв.

Другим типом пароксизмальной активности, выявленным у крыс с генотипом  $A_2A_2$ , являются разряды, отличные от разрядов первого и второго типов. Эти «атипичные» разряды не имеют четкого опережения разряда во фронтальной коре. Максимальная частота разряда может приходиться как на его середину, так и на его конец. Часто разряды, возникнув во фронтальной коре, не распространяются на теменную и затылочную области. Разряды различаются по локализации области с наиболее выраженной амплитудой. На рисунке №3 представлен вейвлет анализ одного из атипичных разрядов, зарегистрированных у крыс с генотипом  $A_2A_2$

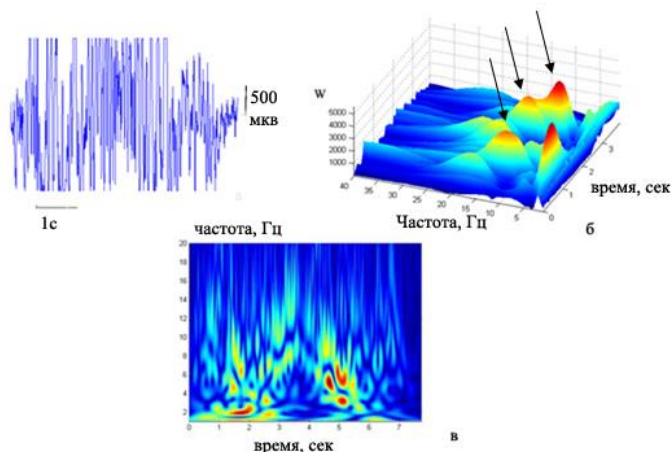


Рис.3. Частотно-временная динамика атипичного разряда, зарегистрированного в ПСК у крыс с генотипом  $A_2A_2$ . а) запись разряда пик-волна; б) трехмерный график данного разряда, построенный с помощью преобразования вейвлет Морле. По осям на трехмерном графике – время (сек), частота (Гц), коэффициент вейвлета (W); в) анализ с помощью модифицированного вейвлета. Калибровка 1с, 500мкВ.

Продолжительность разряда составляет около 7 сек (рис. 3а). Разряд начинается с высокой частоты (14 Гц), но в течение первой секунды происходит снижение частоты, что приводит к урежению комплексов «пик-волна». К третьей секунде отмечается вновь повышение частоты до 14-16 Гц, в конце разряда частота комплексов пик-волна падает и, кроме того, отмечается понижение амплитуды. Таким образом, в течение разряда отмечается колебание частоты, максимальная частота комплексов «пик-волна» в диапазоне 12-14Гц приходится и на начало и на середину разряда (рис. 3б), тогда как для «типичных» разрядов 1-го типа, мы наблюдали такую частоту в начале разряда. У крыс с генотипом  $A_2A_2$  атипичных разрядов было зарегистрировано больше всего, по сравнению с разрядами первого и второго типов. Их количество равно 192. Для крыс группы  $A_2A_2$  мы отметили чередование широко генерализованных по коре разрядов с разрядами с «атипичной» структурой.

Известно, что в формировании ПВР первого типа участвуют структуры кортико-таламического круга, и они являются характерным признаком абсансной эпилепсии (vanLuijelaar, Coenen, 1986). Механизм формирования разрядов второго типа остается неизвестным, однако, показано, что дофаминергическая система также причастна к их

модуляции (Gulledge, Jaffe, 1998). Нет сведений в литературе и о нейроанатомическом базисе ПВР второго типа. Однако, выявленное разнообразие паттернов ПВР у крыс  $A_2/A_2$  позволяет предполагать, что эпилептическая система у них сложнее, и включает в себя, кроме ПСК, другие структуры мозга. Возможно, появление ПВР второго типа является отражением изменения таламо-кортикальных взаимоотношений за счет вовлечения в состав эпилептической системы не только ретикулярного, но и других ядер таламуса, а также ствола мозга. Пик-волновые разряды второго типа и «атипические» разряды выявлены только у крыс с генотипом  $A_2/A_2$ , что указывает на присущие им особенности в структурном базисе процессов эпилептогенеза (Мусина, 2011).

### Список литературы

1. Gulledge A., Jaffe D. Dopamine decreases the excitability of layer V pyramidal cells in the rat prefrontal cortex / A. Gulledge, D. Jaffe // *Neuroscience*. – 1998. – V.18. – P.9139-9151.

2. Kuznetsova G.D. Generalized absence epilepsy and catalepsy in rats / G. D. Kuznetsova, E.V. Petrova, A.M. Coenen, S.A. Chepurinov, G. van Luijtelaar // *Physiology and Behavior*. –1996. – V.60. – P.1165-1169.

3. Meeren H.K.M. Evolving concepts on the pathophysiology of generalized absence seizures: the cortical focus theory / H.K.M. Meeren, E.L.J.M. van Luijtelaar, F.H. Lopes da Silva, A.M.L. Coenen In : *The WAG/Rij model of absence epilepsy: The Nijmegen-Russian Federation Papers*. - Nijmegen (Netherlands), Nijmegen Institute for Cognition and Information. – 2004. - P. 89-97.

4. Midzyanovskaya I.S. Absence and mixed forms of epilepsy in WAG/Rij rats: characteristics and brain aminergic modulations / I.S. Midzyanovskaya. –Nijmegen: Nijmegen University Press. – 2006. – P.230.

5. Midzyanovskaya I.S. Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats / I.S. Midzyanovskaya, G.D. Kuznetsova, A.M. Coenen, A.M. Spiridonov, E.L. van Luijtelaar // *Brain Research*. – 2001. – V.91. – P.62-70.

6. van Luijtelaar E.L., Coenen A.M. The WAG/Rij rat model for absence epilepsy: age and sex factors / E.L. van Luijtelaar, A.M. Coenen // *Epilepsy Research*. – 1987. – V.1(5) . – P.297-301.

7. Калимуллина, Л.Б. Полиморфизм Таq 1A рестрикторного локуса гена  $DRD_2$  и гена  $DAT_1$  у крыс линии WAG/Rij / Л.Б. Калимуллина, А.В. Ахмадеев, А.Ф. Бикбаев // *Медицинская генетика*. - 2005. - №5. - С.198-199.

8. Мусина А.М. Характеристика пик-волновых разрядов второго типа, регистрируемых при абсансной эпилепсии / А.М. Мусина // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 11(часть 2). – С.337-340.

© А.М. Федорова, 2015

УДК 612.66; 612.84

**ПАТТЕРНЫ АБСАНСНОЙ ЭПИЛЕПСИИ НА  
ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЕ ПЕРВИЧНОЙ  
СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ У КРЫС ЛИНИИ WAG/RIJ  
С ГЕНОТИПОМ A1/A1 ПО ЛОКУСУ TAQ 1A ГЕНА DRD2  
НА ФОНЕ ВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА «КОРТЕКСИН»**

**Пилюга М.А., Федорова А.М., Калимуллина Л.Б., Муфазалова Н.А.**

Башкирский Государственный Университет, Уфа,  
marmishka-06@mail.ru

Одной из самых распространенных форм является детская абсансная эпилепсия (ДАЭ) – форма генерализованной эпилепсии, проявляющаяся малыми припадками (petitmal, абсансы) и наличием на ЭЭГ специфического паттерна. В настоящее время в результате исследований, выполненных с использованием признанной модели абсансной эпилепсии – крыс линии WAG/Rij (van Luijtelaa, Coenen, 1986; Midzyanovskaya, Kuznetsova et al., 2001; Meeren et al., 2002), получены доказательства, что абсансная эпилепсия является кортикоталамическим типом эпилепсии. Дофаминергическая система вовлечена в патогенез абсансной эпилепсии у крыс линии WAG/Rij (Warteretal., 1988; DeBruinetal., 2000; Deransartetal., 2000, Midzyanovskaya, Kuznetsova, 2001).

Большую роль в прогнозе ДАЭ играет правильность подбора антиабсансных препаратов. Недостаточная эффективность терапии и побочные действия заставили обратиться к ноотропным препаратам, которые характеризуются многоплановым воздействием и выраженным модулирующим (нормализующим) влиянием. К ним относится отечественный препарат «Кортексин» (Цыган В.Н., и др., 2008).

Целью нашего исследования явилось исследование количественных паттернов абсансной эпилепсии на электроэнцефалограмме периорального поля первичной соматосенсорной коры у крыс линии WAG/Rij с генотипом A1/A1 по локусу Taq 1ADRD2 до и после инъекции препарата «Кортексин».

**Материал и методы.** Исследование проведено на группе половозрелых крыс: гомозиготных крысах линии WAG/Rij с генотипом

A1/A1 по локусу Taq 1A гена рецептора дофамина второго типа (модель абсансной эпилепсии).

Для проведения электрофизиологических исследований использовали стереотаксический метод вживления хронических электродов. Операции на крысах проводили в стерильных условиях, в качестве наркоза использовали хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг. Проводили вживление электрода в первичную соматосенсорную кору с координатами– (AP- +3; L-3) (Paxinos, Watson (1998)). Референтный электрод располагали над мозжечком. Регистрацию электроэнцефалограммы осуществляли на электроэнцефалографе Нейрон-Спектр-1/В (Нейрософт, Россия). Фоновую электроэнцефалограмму регистрировали через 7 дней после операции. Кортиксин вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг один раз в сутки в течение 9 дней, далее регистрировали ЭЭГ. На записях ЭЭГ проводили анализ продолжительности и количества пик-волновых разрядов.

### Результаты собственных исследований и их обсуждение

Согласно новой теории, которая получила название «hotspottheory» (Meerenetal., 2004), кортикальный фокус в первичной соматосенсорной коре является ведущим в распространении пик-волновой активности. Основные положения указанной теории разработаны с использованием электрофизиологических методов на крысах линии WAG/Rij.

В ЭЭГ у всех животных были зарегистрированы разряды пик-волна (ПВР). Разряды появлялись спонтанно. Средняя продолжительность разрядов была равна  $5,6 \pm 0,34$  сек. В записях встречали ПВР, продолжительность которых приближалась к десяти и более секундам. Разряды, продолжительность которых была менее четырех секунд, обнаруживали редко.

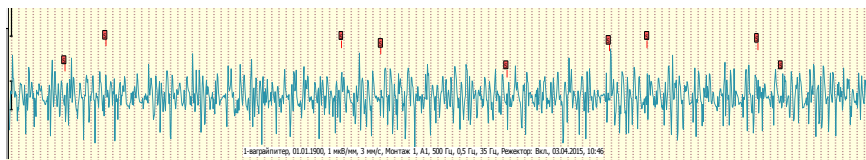


Рис.1. Пик-волновые разряды на ЭЭГ у крыс с генотипом A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>. Калибровка 1с, 300мкВ

Продолжительность пик-волновых разрядов на фоновой ЭЭГ первичной соматосенсорной коры составила  $9,41 \pm 1,03$  сек, их количество было равно  $7,1 \pm 0,9$  шт. При оценке этих же параметров на фоне внутривенного введения кортексина было получено, что продолжительность разрядов составляет  $8,9 \pm 0,9$ сек, а вот количество

разрядов равно  $1,25 \pm 0,23$  шт, что достоверно ниже по сравнению с фоновой записью. Таким образом, мы отметили положительный антиабсансный эффект кортексина при внутрибрюшинном введении крысам линии WAG/Rij, которое проявлялось достоверным снижением количества пик-волновых разрядов на электроэнцефалограмме первичной соматосенсорной коры, являющийся основным фокусом при генерации пик-волновых разрядов.

Оценка структурно – количественных характеристик пик – волновых разрядов (продолжительность, количество), регистрируемых на ЭЭГ первичной соматосенсорной коры у крыс линии WAG/Rij с генотипом A1/A1 по локусу Taq 1A DRD2 до и после инъекции препарата «Кортексин» выявила достоверное снижение количества разрядов в опытной группе ( $7,1 \pm 0,9$  и  $1,25 \pm 0,23$ ;  $p < 0,001$ ), что демонстрирует положительный антиабсансный эффект.

### Список литературы

1. Меерен Х.К.М. Кортикоталамическая теория происхождения генерализованных пик-волновых разрядов / Е. Л. Дж. М. Ван Луителлаар, Ф. Х. Лопес да Сильва, Р. К. Бердиев, Н. Е. Чепурнова, С.А. Чепурнов, А. М. Л. Кунен // Успехи физиологических наук. – 2004. – Т.35, №1. – С. 3-19.
2. Цыган В.Н., Миролубов А.В., Богословский М.М., Федосеев В.М. Эффективность Кортексина при лечении эпилепсии. TERRA MEDICA nova, 2008 - Т. 4. - №4. - С. 20-25.
3. De Bruin N.M. Dopamine characteristics in different rat genotypes: The relation to absence epilepsy / N.M. De Bruin, E. L. van Luijtelaar, S. J. Jansen, A. R. Cools, B. A. Ellenbroek // Journal of Neuroscience Research. – 2000. – V.38. – P.165-173.
4. Deransart C. Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat / C. Deransart, V. Riban, B. Le, C. Marescaux, A. Depaulis // Neuroscience. – 2000. – V.100. – P.335-344.
5. Meeren H.K.M. Cortical focus drives widespread corticothalamic networks during spontaneous absence seizures in rats / H.K.M. Meeren, J.P.M. Pijn, E.L.J.M. Van Luijtelaar, A.M.L. Coenen, F.H. Lopes da Silva // The Journal of Neuroscience. – 2002. – V.22 (4). – P.1480-1495.
6. Midzianovskaia IS, Kuznetsova GD, Coenen AM, Spiridonov AM, van Luijtelaar EL. Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. Brain Res., 2001
7. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986.

8. vanLuijtelaa E.L., Coenen A.M. Two types of electrocortical paroxysms in an inbred strain of rats / E.L. van Luijtelaa, A.M. Coenen // Neuroscience Letters. – 1986. – V.70, №3. – P.393-397.

9. Warter J.M. Effects of drugs affecting dopaminergic neurotransmission in rats with spontaneous petit mal-like seizures / J.M. Warter, M. Vergnes, A. Depaulis, C. Tranchant, L. Rumbach, G. Micheletti // Neuropharmacology. –1988. – V.27. – P.269-274.

© М.А. Пилуога 2015

УДК: 616 — 089.843

## **КОНСТРУИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИЙ НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

**Борисова Е.В., Епифанова Е.А., Салина В.А., Бабасв А.А**

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
Нижний Новгород, borisovakaterina17@gmail.ru

В процессах нейрогенеза, дифференциации нейронов и формировании синаптических контактов принимает участие большое количество различных молекул. Данная работа посвящена конструированию инструментов – вирусных векторов для исследования функций двух белков: белка шипикового аппарата – синаптоподина и нейротрофического фактора BDNF.

Синаптоподин является основным членом нового класса богатых пролином актин-ассоциированных белков с высоким уровнем экспрессии на дендритах телянцезалона и ренальных подоцитах. Синаптоподин экспрессируемый в дендритах зрелых нейронов телянцезалона, обнаруживается в постсинаптических уплотнениях и в шипиковом аппарате. У человека белок синаптоподин кодируется геном SYNPO, и имеет 3 изоформы: нейрональный Synpo-short (685AA), ренальный Synpro-long (903 AA) и Synpo-T (181 AA). Все 3 изоформы специфически взаимодействуют с а-активным и растягивают актиновые филаменты.

Используя данные последних исследований, предполагают, что дендритные шипики, содержащие синаптоподин, сильно отличаются по структурным и функциональным свойствам от соседних шипиков, которые синаптоподина не содержат. Синаптоподинные кластеры в шипиках колокализированы с внутренним функциональным потоком кальция. Таким образом, синаптоподин, играет определенную роль в процессе синаптической пластичности, а также исследование его

функций может дать информацию, связанную с механическим пониманием функционирования синапсов.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) – важная сигнальная белковая молекула, участвующая в регуляции нейрогенеза, роста и выживаемости нейронов в центральной нервной системе. BDNF участвует не только в дифференциации нейронов и формировании синаптических контактов в процессе нейрогенеза, но и может являться активным корректором метаболизма зрелых нейронов. В работах, посвященных исследованиям нейродегенеративных заболеваний, ишемических повреждений и травм ЦНС установлено, что BDNF обладает выраженными нейрозащитными свойствами, угнетает клеточный апоптоз, препятствует гибели нейронов и стимулирует рост холинергических нервных волокон. В период восстановления работы головного мозга необходимо применение инновационных технологий, позволяющих стимулировать способность к эндогенной репарации функционально активных нейронных сетей. Одним из таких подходов может быть терапевтическое повышение уровня нейротрофического фактора BDNF.

Целью работы явилась разработка стратегии и получение аденовирусного вектора для экспрессии в нейронах головного мозга белка шипикового аппарата синаптоподина и аденоассоциированного вектора для экспрессии BDNF. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: подобрать матрицы и условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), сконструировать плазмиды с последовательностью белка синаптоподина и нейротрофического фактора, суперсинапсиновым промотором и флуоресцентным белком mKate2 для котрансфекции, получить аденовирусный и аденоассоциированный векторы, определить их титр и биологическую активность.

Основными методами исследования являлись: полимеразная цепная реакция, плазмидное клонирование. Для проведения ПЦР использовали коммерческий набор реактивов Phusion High-Fidelity PCR Kit и амплификатор Applied Biosystems. Для конструирования плазмиды использовались ферменты NewEnglandBioLabs и Thermo Scientific, компетентные клетки E. coli TopTEN и DH5 $\alpha$ , набор для выделения плазмидной ДНК QIAGEN и программное обеспечение VectorNTI.

В ходе работы была подобрана система праймеров для синтеза последовательности белка синаптоподина (Synpo-HindIII-fw, Synpo-MluI- rev) и установлена оптимальная температура отжига праймеров 65°C, также была подобрана система праймеров для амплификации последовательности гена BDNF (mBDNF-EcoRI-fw и mBDNF-BamHI-noStop-rv) и оптимальная температура отжига - 66°C. В качестве матриц

была использована кДНК, выделенная из коры больших полушарий головного мозга мыши. Была получена последовательность шипикового аппарата синаптоподина и нейротрофического фактора BDNF, что было подтверждено электрофоретически.

В ходе работы была подобрана система ферментов рестриктаз для конструирования плазмидного вектора с нуклеотидной последовательностью синаптоподина, суперсинапсного промотора и флуоресцентного белка mKate2. Первоначально в пламиду-основу, уже содержащую в своем составе белок mKate2, с помощью реакций рестрикции HindIII и MluI и последующей реакции лигирования был встроен фрагмент – последовательность белка синаптоподина (2000 по). На следующем этапе в качестве основы была использована плазида, кодирующая информацию для формирования аденовирусного вектора и энхансер для усиления работы синапсного промотора. В данную плазмиду были встроены последовательности синапсного промотора и последовательности синаптоподина и mKate2, заключенные в одну рамку считывания.

Во время работы была подобрана система рестрикционных ферментов для получения плазмидного вектора с последовательностью нуклеотидов нейротрофического фактора головного мозга BDNF, суперсинапсного промотора и флуоресцентного белка mKate2. В качестве вектора основы был использован вектор, содержащий суперсинапсный промотор, с помощью системы ферментов в него были встроены последовательности BDNF (300 по) и mKate2.

Сконструированные плазмиды были выделены после трансформации с продуктами лигазной реакции и проведено тестирование правильности встраивания последовательностей белков, промотора и флуоресцентного белка.

В последующем для плазмидного вектора для экспрессии синаптоподина будет произведена котрансфекция в HEK293 клетках с полученной плазмидой и плазмидой-помощником (pBHG10), наработка аденовирусного вектора и его выделение. Для плазмидного вектора с последовательностью BDNF будет произведена котрансфекция с данной плазмидой и двумя плазмидами-помощниками (pDP1 и pDP2) в HEK293 клетках, наработка вируса в клетках и его выделение.

Очистка вирусных векторов будет производиться методом ультрацентрифугирования, с последующим определением титра и биологической активности в нейронах головного мозга мышей.

*©Е.В. Борисова, 2015*

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Хисматуллина З.Р., Мочалов С.М.</b> Научное наследие профессора А.С. Дмитриева	3
<b>Лобанов С.А., Хисматуллина З.Р., Шишкин И.В., Насырова Е.В., Азнабаев О.Ф.</b> Влияние стресса на окислительную модификацию белков мозжечка	7
<b>Якимова Е.Г.</b> Динамические карты рецептивных полей ориентационно- избирательных нейронов наружного коленчатого тела	12
<b>СЕКЦИЯ №1. АНАТОМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ. НЕЙРОГЕНЕТИКА</b>	17
<b>Мухамадеев Р.А.</b> Анатомические особенности макулярной области сетчатки человека	17
<b>Хисматуллина З.Р.</b> Локализация CART-пептида в репродуктивных центрах переднего отдела миндалевидного комплекса мозга	20
<b>Сергеева М.С., Пятин В.Ф., Коровина Е.С., Романчук Н.П.</b> Эффекты циркадианной системы в электрической активности головного мозга человека	23
<b>Галиева Л.Ф.</b> Сравнительная характеристика двигательной активности самцов крыс линии WAG/Rij с различиями экспрессии короткой изоформы рецептора дофамина второго типа (D <sub>2</sub> S) в тесте «открытое поле»	28
<b>Гарипова И.Р., Хисматуллина З.Р.</b> Сравнительный анализ морфометрических параметров в ядрах переднего отдела миндалевидного комплекса мозга с учетом фактора пола	32

<b>Полякова З.А., Сварник О.Е.</b> Закономерности активности нейронов ретроспленальной коры крыс в процессе формирования пищевых навыков	36
<b>Канзафарова Р.Ф., Казанцева А.В., Романова А.Р., Башкатов С.А., Галаятдинова С.И., Хуснутдинова Э.К.</b> Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов семейства нейрексинов с уровнем математической тревожности	58
<b>Ахметгалеева А.Ф., Хидиятова И.М., Идрисова Р.Ф., Сайфуллина Е.В., Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К.</b> Новая мутация в гене спастина ( <i>SPG4</i> ) – причина наследственной спастической параплегии у пациентов из республики Башкортостан	62
<b>Шкорбатова П.Ю., Якимова Е.Г., Алексеенко С.В.</b> Метаболическая активность нейронов глазоспецифичных слоев НКТд при депривационной амблиопии	67
<b>Подвигина Д.Н., Якимова Е.Г.</b> Роль ориентационно-избирательных нейронов в восприятии двойственных изображений	73
<b>Воронков Д.Н., Дикалова Ю.В., Шелоухова Л.И.</b> Анализ формы астроцитов nigростриатной системы в норме и при моделировании паркинсонизма	77
<b>СЕКЦИЯ №2. НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ</b>	86
<b>Мусина Л.А., Шангина О.Р., Зайтов И.М.</b> Трансплантация биоматериала Аллоплант в субарахноидальное пространство мозга крыс	86
<b>Соловьева Е.П.</b> Влияние жидкого силикона на структуру сетчатки глаза человека	89
<b>Сысоева М.В., Ситникова Е.Ю., Сысоев И.В.</b> Адаптация метода причинности по грейнджеру для анализа связанности областей мозга при абсансной эпилепсии	93

<b>Одинцова И.А., Слуцкая Д.Р., Гребенюк А.Н., Толкач П.Г.</b> Реактивные изменения нейронов головного мозга при действии оксида углерода	98
<b>Садртдинова И.И.</b> Влияние овариоэктомии на ультраструктуру нейронов переднего кортикального ядра миндалевидного комплекса мозга крыс линии WAG/Rij	100
<b>Насырова Е.В., Шишкин И.В., Азнабаев О.Ф., Хисматуллина З.Р., Лобанов С.А.</b> Морфофункциональные изменения мозжечка при действии алкоголя	104
<b>Шамратова В.Г., Гизатуллин Р.Х., Тимофеева Е.А., Мефтахова Г.В.</b> Метаболические нарушения у детей при гипоксически- ишемических и травматических поражениях центральной нервной системы	110
<b>Великомолова Ю.Б., Каюмова А.Ф., Каюмов Ф.А.</b> Взаимодействие нервной и иммунной систем при воздействии полихлорированных бифенилов на организм крыс	114
<b>Балхиева Л.Х., Мусина Л.А., Хисматуллина З.Р., Байгильдин С.С.</b> Морфо-функциональные особенности радиальных глиоцитов сетчатки глаза крыс линии WAG/Rij с различиями генотипа по локусу Taq 1A DRD <sub>2</sub>	120
<b>Шарафутдинова Л.А., Юсупов А. Федорова А.М.</b> Влияние наночастиц диоксида титана на уровни тревожности и депрессивности крыс	125
<b>Шарафутдинова Л.А.</b> Ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональный статус животных после внутрижелудочного введения нанодисперсного диоксида титана	131
<b>СЕКЦИЯ №3. НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ</b>	134

- Ведунова М.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Шишкина Т.В., Астраханова Т.А., Бабаев А.А., Мухина И.В.**  
Изучение некоторых молекулярных механизмов нейропротекторного действия глиального нейротрофического фактора (GDNF) при моделировании гипоксии *in vitro* 134
- Ахмадеев А.В., Леушкина Н.Ф., Галеева Л.Ф.**  
Влияние фактора пола на уровень тревожности и груминг у крыс линии WAG/Rij с измененной экспрессией короткой изоформы D2 рецептора 139
- Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Хаспеков Л.Г., Мухина И.В.**  
Изучение роли каннабиноидных рецепторов 1 и 2 типов в реализации нейропротективного и антигипоксического действия n-арахидоноилдофамина (N-ADA) при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro* 144
- Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Щелчкова Н.А., Терентьева К.А., Косарева М.А., Халецкая О.В., Мухина И.В.**  
Диагностическое значение определения содержания нейротрофических факторов при гипоксии 149
- Шишкин И.В., Насырова Е.В., Азнабаев О.Ф. Хисматуллина З.Р., Лобанов С.А.**  
Влияние гипоксии на состав и содержание гликозаминогликанов мозжечка 154
- Федорова А.М., Калимуллина Л.Б., Кузнецова Г.Д.**  
Особенности пик-волновых разрядов первичной соматосенсорной коры неокортекса крыс линии WAG/Rij, гомозиготных по аллелю A2 локуса Taq 1A рецептора дофамина второго типа 159
- Пилюга М.А., Федорова А.М., Калимуллина Л.Б., Муфазалова Н.А.**  
Паттерны абсансной эпилепсии на электроэнцефалограмме первичной соматосенсорной коры у крыс линии WAG/Rij с генотипом A1/A1 по локусу Taq 1A гена DRD2 на фоне ведения препарата «кортексин» 165

**Борисова Е.В., Епифанова Е.А., Салина В.А., Бабаев А.А.**  
Конструирование вирусных векторов для исследования функций  
нейронов головного мозга

168

