

Смирнов Кирилл Сергеевич

**Сенсорные факторы развития нервной системы у крыс с генетической
предрасположенностью к абсансным приступам**

1.5.5 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2021

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
науки Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии
Российской академии наук (ФГБУН ИВНД и НФ РАН)**

Научный руководитель: Ситникова Евгения Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроонтогенеза ИВНД и НФ РАН

Официальные оппоненты:

Вольнова Анна Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник кафедры общей физиологии Биологического факультета СПбГУ

Аббасова Кёнул Расим кызы, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ

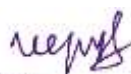
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН

Защита состоится 15 декабря 2021 г., в 15.30 на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте ИВНД: <https://ihna.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Иерусалимский В.Н.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Абсансные приступы (или далее абсансы) - это внезапные, относительно короткие нарушения сознания, связанные с отсутствием произвольных движений и характерными электроэнцефалографическими пик-волновыми разрядами (ПВР) (Blumenfeld, 2005; Crunelli and Leresche, 2002; Matricardi et al., 2014; Panayiotopoulos, 1999). Данные приступы являются генерализованными и бессудорожными и в большинстве случаев имеют генетическую природу (Crunelli and Leresche, 2002). ПВР, сопровождающие абсансы, являются доминирующим типом патологической активности мозга при нескольких патологиях, относимых к генерализованным эпилепсиям (Panayiotopoulos, 2005), а также наблюдаются при других заболеваниях нервной системы (Bhat et al., 2014; Dan, 2009; Pillay et al., 2013; Poothrikovil et al., 2012; Smirnov et al., 2021). Наиболее распространёнными нозологиями, при которых наблюдаются ПВР, являются детская и юношеская абсансные эпилепсии (Crunelli and Leresche, 2002; Grosso et al., 2005; Porter, 1993; Tovia et al., 2006), однако абсансы наблюдаются и у взрослых пациентов, при этом, вероятно, чаще, чем принято считать (Ozdemir et al., 2013; Panayiotopoulos et al., 1992; Trinka, 2005).

В последнее время появляется все большее количество исследований, посвященных изучению психоневрологических нарушений, сопутствующих эпилепсиям с абсансными приступами (Cermignani et al., 2013; Jones et al., 2007; Masur et al., 2013; Vega et al., 2011), которые часто сохраняются даже после эффективной терапии приступов (Wald et al., 2019) и оказывают негативное влияние на качество жизни пациентов, которое часто превосходит негативное влияние самих приступов (Boylan et al., 2004; Gilliam et al., 2003). Для исследования механизмов, лежащих в основе нарушений, сопутствующих абсансам, необходима модель на животных, воспроизводящая данные нарушения.

Существует несколько моделей на животных, воспроизводящих электрофизиологические, поведенческие и фармакологические особенности абсансов (Beyer et al., 2008; Hosford and Wang, 1997; Lakaye et al., 2002; Luijtelaaar et al., 2014). Среди них общепризнанной валидной моделью являются крысы линии WAG/Rij (Coenen and Van Luijtelaaar, 1987; Russo et al., 2016; Sitnikova et al.,

2014), включенные в батарею скрининга противоэпилептических препаратов (Kupferberg, 2001). Крысы линии WAG/Rij генетически предрасположены к ПБР, которые появляются в 2-3 месяца, после чего их число и продолжительность увеличивается. В основе ПБР лежит нарушение взаимодействия коры и таламуса (Lüttjohann and van Luijteleaar, 2015; Meeren et al., 2005). Известно, что область инициации ПБР у крыс линии WAG/Rij находится в проекционной области вибрисс, особого сенсорного органа, обеспечивающего вибротактильное восприятие и являющегося одним из ведущих источников сенсорной афферентации у данных животных (Adibi, 2019; Mehta and Kleinfeld, 2004). Таким образом, изучение факторов, влияющих на возбудимость соматосенсорной коры, может позволить прояснить механизмы, лежащие в основе формирования эпилептического очага.

Несмотря на то, что возникновение ПБР у крыс линии WAG/Rij генетически детерминировано, воздействия на вибротактильную систему в раннем онтогенезе влияют на характеристики ПБР у взрослых животных. Состригание вибрисс в течение первых двадцати постнатальных дней ведет к усилению пик-волновой активности (Sitnikova, 2011). Ранее было показано, что данное воздействие ведет к увеличению возбудимости соматосенсорной коры (Sitnikova, 2000). В течение первых двадцати дней жизни крысы происходит созревание вибротактильной системы, участвующей в передаче и обработке сенсорной информации от вибрисс. Внутри данного временного интервала можно выделить два сензитивных периода созревания вибротактильной системы, которые характеризуются как различными структурными изменениями в мозге (Erzurumlu and Gaspar, 2012), так и переходом поведенческой функции вибрисс от пассивного ощупывания к активному исследованию пространства (Arakawa and Erzurumlu, 2015; Grant et al., 2012). При сравнении влияния двух протоколов ограничения сенсорного притока от вибрисс (включавшего оба периода и включавшего только второй период) было обнаружено, что состригание, включавшее оба периода, вело к более выраженному увеличению возбудимости соматосенсорной коры (Shoykhet et al., 2005). Неизвестно, вызвано ли данное различие эффектом длительности ограничения сенсорного притока или связано со специфической ролью сенсорного притока от вибрисс в течение периода пассивного ощупывания. Мы поставили цель исследовать влияние состригания вибрисс в период пассивного функционирования вибрисс и в период формирования вибротактильных движений

на характеристики ПБР для того, чтобы определить специфическую роль сенсорного притока от вибрисс в каждый из данных периодов.

В течение первого периода вибриссы играют важную роль в питании и поддержании температуры тела крысят (Arakawa and Erzurumlu, 2015; Sullivan et al., 2003), а их состригание ведет к изменению исследовательской активности и социального поведения у взрослых животных (Lee et al., 2009). Количество исследований роли вибрисс в формировании поведения во второй период весьма немногочисленно (Grant et al., 2012; Shishelova, 2006). В течение первого периода вибриссы выполняют пассивную функцию, участвуя в питании и взаимодействии с сиблингами. В течение второго периода с опорой на активные движения вибрисс формируются формы поведения, необходимые для исследования пространства вне гнезда и самостоятельного существования. В данной работе мы исследуем специфическое влияние ограничения сенсорного притока от вибрисс в два сензитивных периода созревания вибротактильной системы на формирование поведения крыс. Работы, выполненные ранее нашими коллегами, исследовали влияние ограничения сенсорного притока от вибрисс в более длительные периоды, включавшие оба сензитивных периода, либо имели другие методологические особенности, не позволяющие разделить эффекты, характерные для каждого из рассмотренных нами периодов.

Помимо воздействий, напрямую влияющих на возбудимость соматосенсорной коры, было показано влияние других факторов раннего онтогенеза на формирование ПБР у крыс линии WAG/Rij (Schridde et al., 2006; Schridde and Luijtelaar, 2004; Schridde and van Luijtelaar, 2005). Было обнаружено, что кратковременные отлучения от матери в течение первых трех недель жизни ведут к уменьшению количества ПБР (Schridde and Luijtelaar, 2004). Известно, что данная процедура, называемая «ранний хэндлинг», также имеет отсроченные последствия на поведение взрослых животных (Levine et al., 1956; Madruga et al., 2006; Weiner et al., 1987). Поскольку первые три недели жизни крысят характеризуются активным созреванием мозга, наличием различных сензитивных периодов созревания сенсорных систем и переходом от полной зависимости от ухода матери к самостоятельному существованию, необходимо сравнение воздействий в различные периоды внутри данного временного интервала, чтобы определить периоды, когда внешние воздействия оказывают наибольшее влияние

на развитие животных. В данной работе помимо эффектов, связанных с типом воздействия (состригание вибрисс/имитация состригания), мы также анализируем эффекты периода, когда воздействие было осуществлено, на формирование ПБР и поведенческие характеристики крыс.

Ранее было обнаружено, что крысы линии WAG/Rij демонстрируют депрессивно-подобное поведение (Sarkisova and van Luijtelaaar, 2011), а также имеют нарушения обучения, вторичные по отношению к абсансам (Leo et al., 2019). Однако в данных работах в качестве контрольной линии к крысам линии WAG/Rij выступают крысы линии Wistar. Однако до 30% крыс линии Wistar демонстрируют ПБР во взрослом возрасте (Vergnes et al., 1990). Расхождение между линиями Wistar и WAG/Rij произошло около 40 лет назад (Coenen et al., 1992). За это время могли сформироваться генетические отличия, которые определяют поведенческие особенности данных линий животных вне зависимости от ПБР. Также затрудняет интерпретацию результатов сравнения крыс линии WAG/Rij с крысами линии Wistar гетерогенность популяций крыс линии Wistar в различных питомниках. У 25% крыс линии WAG/Rij не формируются ПБР (далее называемые «бессимптомный фенотип») (Sitnikova and Smirnov, 2020). Поскольку крысы с симптомным и бессимптомным фенотипом происходят из одной популяции, бессимптомных животных можно рассматривать в качестве «идеального» контроля к животным, имеющим ПБР.

Практически не встречается работ, посвященных изучению нарушений внимания, которые являются основными сопутствующими когнитивными нарушениями при эпилепсиях с абсансными приступами. При исследовании уровня тревожности, которая в форме тревожного расстройства является основным сопутствующим эмоциональным нарушением у пациентов, имеющих абсансы, у крыс линии WAG/Rij в качестве контроля использовались крысы линии Wistar. Как отмечалось ранее, использование в качестве контроля крыс линии Wistar имеет ряд ограничений. Мы поставили задачу сравнить поведение крыс линии WAG/Rij с симптомным и бессимптомным фенотипами для определения связи между ПБР и характеристиками поведения.

Цель работы. Изучить влияние ограничения сенсорного притока от вибрисс у крыс линии WAG/Rij в течение двух сензитивных периодов раннего

онтогенеза на формирование пик-волновой активности и особенностей поведения.

Задачи исследования.

1. Изучить влияние ограничения сенсорного притока от вибрисс в период пассивного ощупывания и период начала вибротактильной активности на формирование эпилептического фенотипа и характеристики пик-волновых разрядов у взрослых крыс линии WAG/Rij;
2. Изучить влияние ограничения сенсорного притока от вибрисс в период пассивного ощупывания и период начала вибротактильной активности на поведение крыс линии WAG/Rij;
3. Сравнить влияние периодов воздействий, связанное с кратковременными отлучениями от матери, сопровождающимися экспериментальными процедурами, и неспецифичное к их типу, на формирование пик-волновых разрядов и поведенческие особенности крыс линии WAG/Rij;
4. Выявить поведенческие особенности крыс линии WAG/Rij с симптомным и бессимптомным фенотипом.

Объектом исследования являются крысы линии WAG/Rij. Предметом – поведенческие характеристики и параметры пик-волновой активности.

Научная новизна. В последнее время в научной литературе все больше внимания уделяется поведенческим и когнитивным особенностям пациентов, имеющим абсансные приступы, а сами приступы описываются для все большего числа нозологий. Повышенный интерес к нарушениям внимания, сопровождающим абсансы, а также эмоциональным особенностям пациентов вызван тем, что их негативное влияние на качество жизни пациентов часто превышает влияние самих приступов и сохраняется даже при медикаментозном контроле эпилептической активности. Тем не менее, до сих пор не было опубликовано исследований, в которых бы изучалась связь между параметрами ПВР и поведенческими характеристиками на валидной животной модели. В данной работе мы впервые проанализировали связь наличия и выраженности ПВР с поведенческими параметрами. У взрослых животных наличие симптомного

фенотипа было связано с пониженной тревожностью и сниженной способностью к обучению. Сниженная способность к обучению у симптомных крыс была связана с более медленным определением связи между условными и безусловными стимулами и повышенной импульсивностью.

Развитие абсансов в животных моделях тесно связано с особенностями соматосенсорной коры, созревание которой зависит от сенсорного притока от вибрисс. В данной работе мы впервые проанализировали влияние ограничения сенсорного притока от вибрисс в различные чувствительные периоды созревания вибротактильной системы на формирования ПВР и обнаружили, что состригание вибрисс ведет к изменению динамики ПВР и увеличению количества ПВР в возрасте 5 месяцев вне зависимости от периода воздействия.

Анализ влияния ограничения сенсорного притока в разные критические периоды созревания вибротактильной системы на сроки формирования различных форм поведения обнаружил, что состригание вибрисс в первый период ведет к задержке открытия глаз и манипуляторной активности передних конечностей, а состригание во второй период приводит к сближению сроков открытия глаз и начала ходьбы, появлению корреляции между ними, а также к исчезновению корреляционных связей между массой тела и сроками появления различных форм поведения. Таким образом, нами впервые было показано, что при ограничении сенсорного притока от вибрисс в период появления вибротактильных движений происходит реорганизация поведения.

Научные положения, выносимые на защиту

1. Периоды созревания вибротактильной системы не играют специфической роли в формировании пик-волновых разрядов. Ограничение сенсорного притока от вибрисс в раннем онтогенезе модифицирует формирование ПВР, ведя к их более раннему созреванию вне зависимости от периода ограничения.

2. Крысы линии WAG/Rij демонстрируют сопутствующие абсансам поведенческие особенности. Пониженная тревожность и сниженная способность к обучению связаны с наличием симптомного фенотипа.

3. У крыс в раннем онтогенезе существуют опорные точки развития, которые являются маркерами физиологического созревания крысят. Ограничение сенсорного притока от вибрисс в период появления их активных движений ведет к сближению сроков открытия глаз и формирования ходьбы и разрушает связь между соматическим развитием и формированием опорных точек развития.

4. Кратковременные отлучения от кормящей самки, сопровождающие экспериментальные процедуры состригания вибрисс и его имитации, влияют на формирование пик-волновых разрядов и поведение крыс линии WAG/Rij во взрослом возрасте.

Практическая значимость и теоретическая ценность полученных результатов. Выделение нами крыс линии WAG/Rij, имеющих бессимптомный фенотип, позволяет использовать их в качестве «идеального» контроля к симптомным животным, поскольку данные животные гораздо ближе генетически, чем крысы других линий. Сравнение эпилептических фенотипов является перспективным направлением при исследовании генетических особенностей и молекулярных путей, ведущих к формированию ПВР, что может привести к обнаружению новых мишеней для фармакологического воздействия.

Когнитивные нарушения у пациентов, имеющих абсансные приступы, негативно отражаются на качестве жизни и не исчезают при подавлении приступов. Обнаружение у крыс с симптомным фенотипом сниженной способности к обучению и повышенной импульсивности, также выявляемых у пациентов, имеющих абсансные приступы, позволяет использовать крыс линии WAG/Rij для исследования механизмов формирования когнитивных нарушений, сопутствующих эпилепсиям с абсансными приступами.

Обнаружение нами неспецифического к периоду воздействия влияния ограничения сенсорного притока от вибрисс на формирование ПВР указывает на то, что сензитивные периоды созревания вибротактильной системы не играют принципиальной роли в развитии эпилептической активности у крыс WAG/Rij. Вероятно, решающую роль в эпилептогенезе ПВР играет не период, а длительность воздействия, поскольку ранее было показано, что более длительное ограничение ведет к более выраженным и устойчивым изменениям характеристик ПВР у взрослых животных.

Степень достоверности результатов подтверждается достаточным количеством экспериментальных животных, большим числом наблюдений. Интерпретация полученных результатов проведена с использованием современных методов статистического анализа. Выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены фактическими данными, представленными в рисунках и таблицах.

Апробация диссертации. Результаты работы были представлены в качестве докладов или стендовых сообщений на Конференциях молодых ученых ИВНДиНФ РАН (Москва, 2017-2019), Всероссийской конференции с международным участием: XXIII съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова (Воронеж, 2017), XIV международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018), Münster Symposium on Seizures and Epilepsy (Мюнстер, Германия, 2018), 3rd Nordic Neuroscience Meeting (Хельсинки, Финляндия, 2019), I онлайн-конференции и школе с международным участием «Эпилепсия: от фундаментальной науки к практике» (онлайн, 2020), 1 Национальном конгрессе по когнитивным исследованиям, искусственному интеллекту и нейроинформатике (онлайн, 2020).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОТР	опорная точка развития
ОП	открытое поле
ПВР	пик-волновой разряд
ПД№	постнатальный день №
ПКЛ	приподнятый крестообразный лабиринт
УРДИ	условная реакция двустороннего избегания
WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo rats from Rijswijk, имбредная линия крыс с генетической предрасположенностью к абсансным приступам

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на самцах крыс линии WAG/Rij (n=63), выращенных и содержавшихся в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН (Москва, Россия).

Ограничение сенсорного притока в раннем онтогенезе. Крысы были разделены на четыре группы: две экспериментальные и две контрольные. Экспериментальные группы были подвергнуты ежедневному двустороннему состриганию вибрисс. Состригание проводилось в течение ПД1-8 в первой экспериментальной группе и в течение ПД9-16 во второй экспериментальной группе. В контрольных группах животные в те же периоды были подвергнуты процедуре имитации состригания вибрисс, в течение которой тупой стороной ножниц прикасались к зоне вибрисс.

Исследование динамики формирования опорных точек развития (ОТР). В течение ПД12-19 мы наблюдали за свободным поведением животных в открытом поле в течение 3 минут. Экспериментатор оценивал достижение той или иной ОТР с опорой на комплексные критерии, созданные на основании работ лаборатории Нейроонтогенеза и литературных данных. Были исследованы следующие ОТР: открытие глаз; ходьба; аутогруминг; вертикальная активность; манипуляторная активность передних конечностей.

Исследование исследовательской активности и тревожности было проведено в методиках «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) в возрасте 2 месяцев и «Открытое поле» (ОП) в возрасте 2.5 месяцев.

Исследование обучения в **методике «ИнтеллиКейдж»**. «ИнтеллиКейдж» является автоматизированной системой оценки поведения и обучения животных. Обучение реализуется путем питьевого подкрепления определённых последовательностей действий внутри оперантных отсеков. Крыс в возрасте 4.5 месяцев помещали в установку «ИнтеллиКейдж» и содержали небольшими группами (по 3 или 4 животных) в течение 8 дней, и в течение этого периода они обучались получать доступ к питьевой воде, совершая тычки носом в специальной области внутри оперантных углов. Было выделено четыре поведенческие последовательности («Успешная», «Импульсивная», «Исследующая», «Проверяющая»), состоящих из следующих действий: заход,

тычок носом, питье и выход. В данной методике участвовали только крысы, подвергнутые состриганию вибрисс и имитации в период ПД9-ПД16.

Методика выработки условной реакции двустороннего избегания (УРДИ).

Тест УРДИ проводился в челночной камере, которая состояла из двух отсеков с аркой между ними. Во время тестирования крысы обучались избегать электрического тока (0,5 мА, безусловный стимул), который следовал за предъявлением звукового тона (70 дБ, 5 с, условный стимул), перемещаясь в соседний (безопасный) отсек. Нами был установлен следующий критерий обучения: при выполнении 5 избеганий в 6 последовательных попытках животное считалось обучившимся и тестирования прекращалось.

Регистрация ЭЭГ проводилась в 5 и 7 месяцев. В возрасте 4.5 м каждому животному были вживлены винтовые электроды для регистрации ЭЭГ (два симметричных электрода над фронтальной областью, электрод над левой затылочной областью, референтный электрод над мозжечком). Регистрацию ЭЭГ проводили у свободно движущихся крыс минимум через 10 дней после операции. Минимальная продолжительность записи ЭЭГ составляла 20.6 ч, максимальная – 25.1 ч. Записи оцифровывались с частотой 400 Гц.

Автоматическое обнаружение пик-волновых разрядов (ПВР). ПВР определялись автоматически по активности правого фронтального отведения с использованием специального программного обеспечения. Алгоритм обнаружения использовал непрерывное вейвлетное преобразование. Результаты автоматического обнаружения были проверены экспертом и при необходимости скорректированы. На Рис. 1 изображён типичный зрелый ПВР и принцип автоматизированного обнаружения данной формы эпилептической активности.

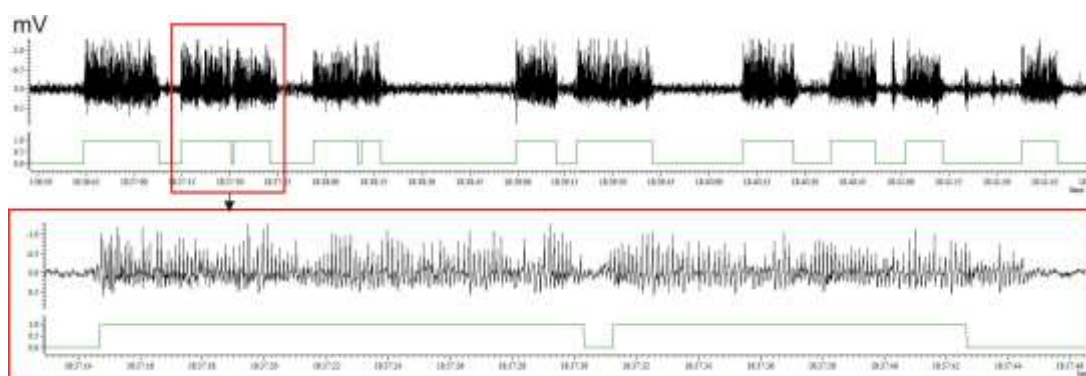


Рисунок 1. Пример ПВР и принцип его обнаружения.

Статистика. Статистические методы были использованы в соответствии с характеристиками распределения данных и дисперсий сравниваемых групп. Тест Стьюдента использовался при сравнении групп с нормальным распределением и равными дисперсиями, при неравенстве дисперсией использовался тест Уэлча. При сравнении эффектов взаимодействия факторов использовался многофакторный анализ ANOVA с корректировкой Бонферрони при наличии множественных сравнений. При наличии нескольких замеров одного и того же параметра взаимодействие эффектов замера и экспериментальных факторов было проанализировано с помощью анализа ANOVA для повторных измерений. Корреляции Спирмена или Пирсона были вычислены в зависимости от характера распределения данных.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Исследование влияния ограничения сенсорного притока от вибрисс в раннем онтогенезе на характеристики пик-волновых разрядов у взрослых животных.

Нами было выявлено, что 30.1% крыс линии WAG/Rij в виварии ИВНДиНФ РАН не демонстрирует выраженных ПВР во взрослом возрасте (бессимптомный фенотип). Сравнение количества животных в группах, подвергнутых состриганию вибрисс и имитации, не выявило значимых различий в соотношении симптомных и бессимптомных животных (Рис. 2). Обнаруженное нами отсутствие влияния ограничения сенсорного притока в раннем онтогенезе на наличие симптомного фенотипа свидетельствует в пользу генетической природы обнаруженного расщепления популяции на два фенотипа.

Нами было обнаружено, что состригание вибрисс влияло на динамику созревания ПВР у симптомных животных, приводя к отсутствию увеличения средней суммарной продолжительности ПВР в час у крыс, подвергнутых состриганию вибрисс, с пяти до семи месяцев, в то время, как у животных, подвергнутых имитации состригания, было обнаружено выраженное увеличение данного параметра (Рис. 2Б).

В возрасте 5 месяцев мы обнаружили значимый эффект фактора «период» на среднюю продолжительность ПВР в час; значимый эффект фактора «состригание» на среднее количество ПВР в час (Рис. 2В); значимый эффект

фактора «период» на среднюю длительность одного ПВР (Рис. 2Г). В возрасте 7 месяцев ни один из факторов не оказывал значимых эффектов на параметры пиково-волновой активности. Парное пост-хок сравнение исследованных групп с поправкой Бонферрони не обнаружило различий между группами ни по одному из параметров, что говорит об отсутствии специфичных для периода состригания эффектов исследованного воздействия. Согласно гипотезе, выдвинутой Люттохан и ван Луйтелааром, за количеством ПВР и их средней длительностью лежат различные нейронные механизмы: количество ПВР определяется возбудимостью коры, средняя длительность разряда – вовлечением ретикулярного ядра таламуса (Lüttjohann and van Luijtelaa, 2015). Увеличение количества ПВР у крыс, повергнутых состриганию вибрисс, может быть объяснено влиянием данного воздействия на генетически предопределенный очаг в соматосенсорной коре. Различия в длительности ПВР у крыс, подвергнутым воздействиям (независимо от их типа) в течение ПД1-8 или ПД9-16 может быть объяснено менее специфичным эффектом на формирование мозга отлучением от кормящей матери.

Более выраженная эпилептическая активность в возрасте 5 месяцев и отсутствие дальнейшего ее развития у крыс, подвергнутых состриганию вибрисс, может свидетельствовать о том, что генотип, определяющий наличие эпилептического фенотипа, также задает «потолок» развития ПВР, максимальную степень их развития, достижение которого происходит раньше при увеличении возбудимости соматосенсорной коры в результате неонатальной сенсорной депривации.

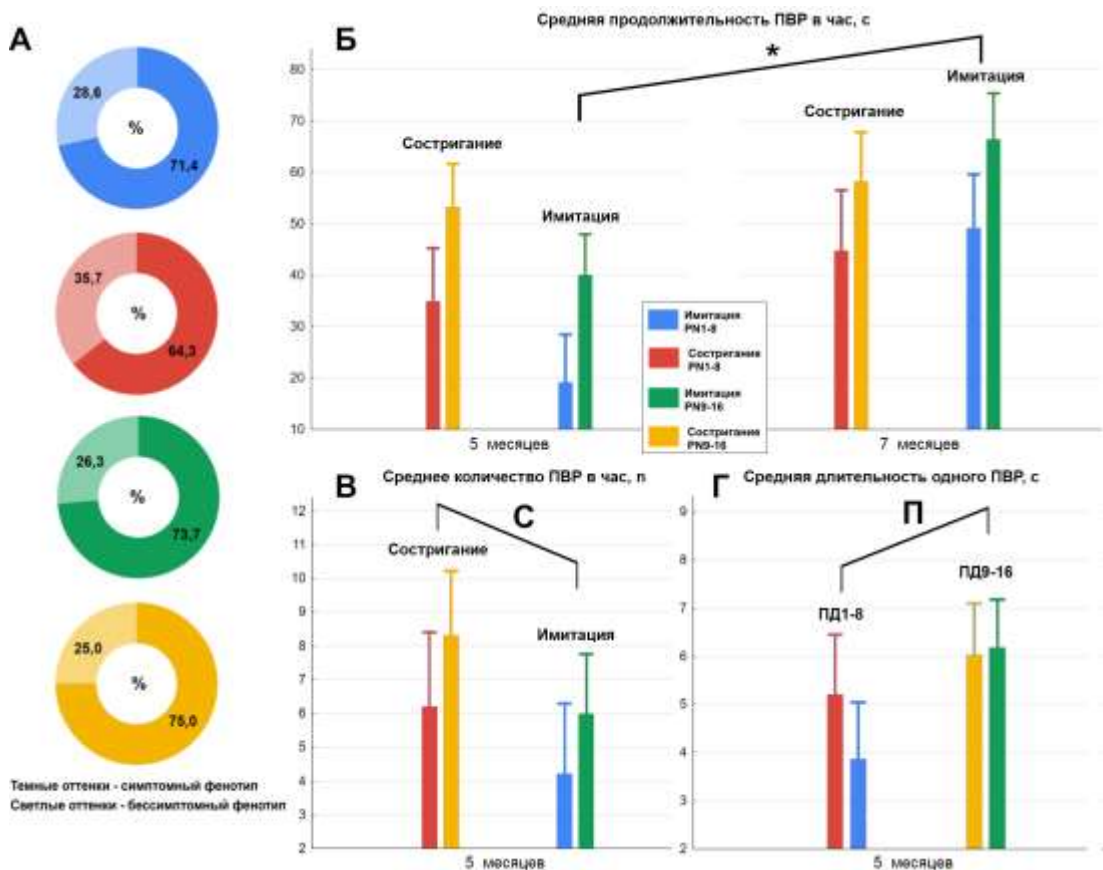


Рисунок 2. Влияние экспериментальных процедур на параметры ПВР. А. Соотношение животных с симптомным и бессимптомным фенотипами в разных экспериментальных группах. Б. Динамика средней продолжительности ПВР в 5 и 7 месяцев. В. Количество ПВР в 5 месяцев. Г. Средняя длительность одного ПВР в 5 месяцев. «*» обозначает статистически значимые различия между крысами, подвергнутыми имитации состригания в возрасте 5 и 7 месяцев. Буква «П» обозначает статистически значимый эффект фактора «период». Буква «С» обозначает статистически значимый эффект фактора «состригание» ($p < 0.05$).

3.2. Исследование влияния ограничения сенсорного притока от вибрисс на раннее развитие поведения.

Мы проанализировали, как воздействия в раннем онтогенезе влияют на разницу между сроками формирования данных ОТР и обнаружили, что у группы, подвергнутой состриганию вибрисс с ПД9 по ПД16, появление зрелой ходьбы и открытие глаз происходило в один день, в то время, как состригание в первый период увеличивало количество дней между сроками их формирования (Рис. 3А). можно предположить, что именно в этот период негативные воздействия на

вибротактильную систему могут вызвать компенсаторную перестройку связей между зрительным анализатором и моторными функциями. Недостаток сенсорного притока может быть компенсирован быстрым созреванием других незрелых сенсорных входов, то есть «актуализацией». Известно, что крысы, лишённые вибрисс, начинают более эффективно использовать визуальные сигналы (Schiffman et al., 1970).

Также мы проанализировали, будут ли воздействия в раннем онтогенезе влиять на связи между общим физическим созреванием крысят и формированием ОТР. Нами было обнаружено, что состригание вибрисс во второй период приводило к уменьшению количества связей между сроками формирования ОТР и массой тела (1 корреляция) по сравнению с другими воздействиями (рис.3Б). При нормальном развитии общее физическое развитие связано с ОТР. Так дети, которые быстрее набирают вес, раньше начинают улыбаться, сидеть и ходить (Flensburg-Madsen and Mortensen, 2017), а у свинохвостых макак низкий вес при рождении является надёжным предиктором задержки в развитии (Kroeger et al., 2007). Вероятно, ограничение сенсорного притока в период, когда крысята начинают активно использовать вибриссы при реализации моторных актов, ведёт к реорганизации поведения, запуская механизмы, компенсирующие отсутствие необходимой афферентации, что может изменять связи между поведением и соматическим ростом.

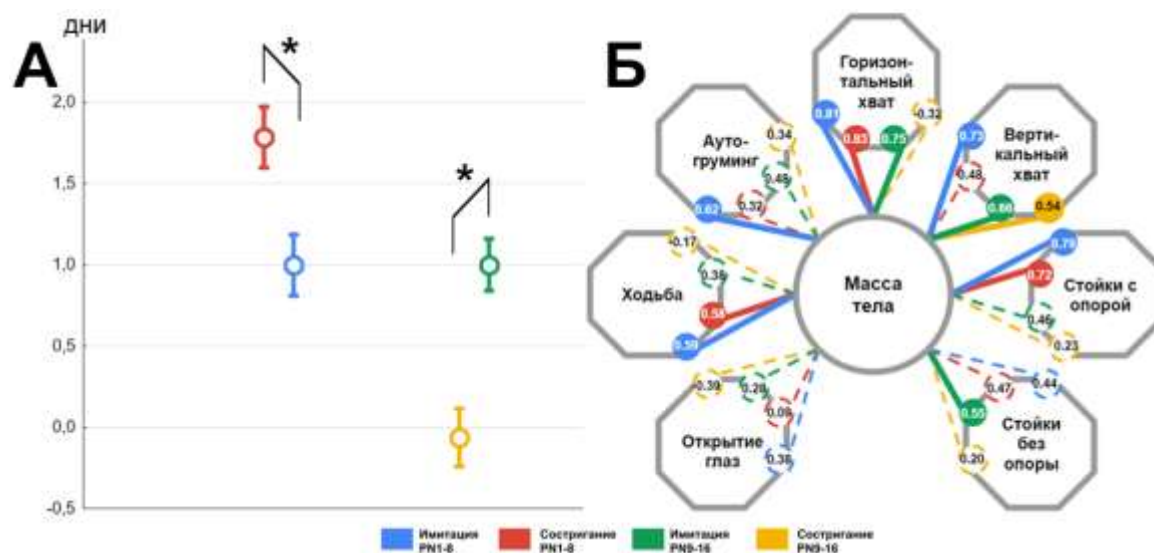


Рисунок 3. Влияние состригания вибрисс на раннее развитие. А. Число дней между сроками созревания ходьбы и открытия глаз. «*» обозначает статистически

значимое различие между группами ($p < 0.05$). Б. Корреляции между массой тела и сроками созревания ОТР. Сплошные линии отражают статистически значимые корреляции ($p < 0.05$), пунктирные – незначимые.

3.3. Исследование влияния эпилептического фенотипа и ограничения сенсорного притока в раннем онтогенезе на тревожность

Симптомные крысы меньше времени проводили в закрытых рукавах ПКЛ и двигались в них с большей средней скоростью, проводили больше времени в открытых рукавах и больше времени в центре ПКЛ, а также больше заходили в центр ОП в течение первых 5 минут и проводили в нем больше времени в течение вторых 5 минут (таблица 1).

ФЕНОТИП

ЗОНА	Параметр	Симптомный (n=34)	Бессимптомный (n=14)
ПРИПОДНЯТЫЙ КРЕСТООБРАЗНЫЙ ЛАБИРИНТ			
ЗАКРЫТЫЕ РУКАВА	Заходы	12.4±0.6	12.4±1.3
	Время	177.4±6.5 *	221.1±6.8
	Средняя скорость	4.5±0.1 *	3.7±0.2
ОТКРЫТЫЕ РУКАВА	Заходы	5.5±0.6	3.5±0.6
	Время	40.6±5.5 *	19.3±2.9
	Средняя скорость	3±0.2	3±0.3
ЦЕНТР	Заходы	17.3±0.8	15±1.2
	Время	76.8±3.3 *	59.5±5.1
	Средняя скорость	2.5±0.1	2.6±0.1
ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ			
ЦЕНТР	Заходы (0-5 мин)	3.5±0.4 *	1.9±0.5
	Время (5-10 мин)	9.2±1.3 *	4.4±1.4

Таблица 1. Влияние эпилептического фенотипа на поведенческие параметры в методиках «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Открытое поле». «*» обозначает значимые различия между фенотипами ($p < 0.05$).

Результаты нашего исследования свидетельствуют об увеличении исследования потенциально опасных зон (открытых рукавов ПКЛ и центральной зоны ОП) у симптомных самцов линии WAG/Rij по сравнению с бессимптомными. Одной из возможных интерпретаций данного результата является наличие низкого уровня тревожности у симптомных крыс. Ранее было показано, что крысы линии WAG/Rij не отличаются по уровню тревожности от крыс линии Wistar в возрасте 6 месяцев (Sarkisova and Kulikov, 2006). Поскольку тестирование в методиках ПКЛ и ОП в рамках нашей работы было проведено в возрасте 2 и 2.5 месяцев, можно предположить, что до появления ПБР крысы линии WAG/Rij имеют сниженную тревожность, которая вместе с развитием ПБР повышается до уровня контрольной линии крыс.

3.4. Исследование влияния эпилептического фенотипа и ограничения сенсорного притока от вибрисс в раннем онтогенезе на обучение

3.4.1. Исследование обучения в экспериментальной парадигме, направленной на оценку импульсивности, в установке «ИнтеллиКейдж»

В нашем исследовании мы определили четыре поведенческих последовательности у крыс WAG/Rij, которые составляли около 95% от всех зарегистрированных в ходе эксперимента: «Успешная», «Исследующая», «Проверяющая», «Импульсивная». Процент посещений, сопровождаемых «Успешной» последовательностью, увеличивался у всех крыс в течение эксперимента, что говорит об усвоении экспериментальной задачи и обучении (Рис. 4А). Нами было обнаружено, что животные с симптомным фенотипом показали более высокий процент посещений, сопровождаемых «Импульсивной» поведенческой последовательностью в ночную фазу восьмого дня эксперимента. Различия между симптомным и бессимптомным фенотипом также проявились при переходе с ночной фазы шестого дня к дневной фазе седьмого дня, когда только бессимптомные крысы показали статистически значимое уменьшение процента «Импульсивной» поведенческой последовательности (Рис. 4Б).

Ограничение сенсорного притока от вибрисс в раннем онтогенезе повлияло на исследовательское поведение в установке «ИнтелиКейдж». Парный t-тест выявил статически значимые отличия между крысами, повергнутыми состриганию вибрисс, и крысами, подвергнутыми имитации состригания, в проценте посещений, сопровождаемых «Исследующей» последовательностью в ночную фазу первого дня, ночную фазу второго дня и дневную фазу четвертого дня, то есть в первой половине эксперимента (Рис. 4В). Можно предположить, что невозможность использовать вибриссы в период созревания вибротактильной системы, когда они начинают участвовать в поведении, привела к меньшей опоре на данный сенсорный вход при исследовании пространства во взрослом возрасте. Данная интерпретация согласуется с литературными данными, указывающими на то, что ограничение сенсорного притока от вибрисс в чувствительный период созревания вибротактильной системы влияет на поведенческую стратегию, но не на общую эффективность выполнения задачи у взрослых животных (Kurzina et al., 2017; Papaioannou et al., 2013).

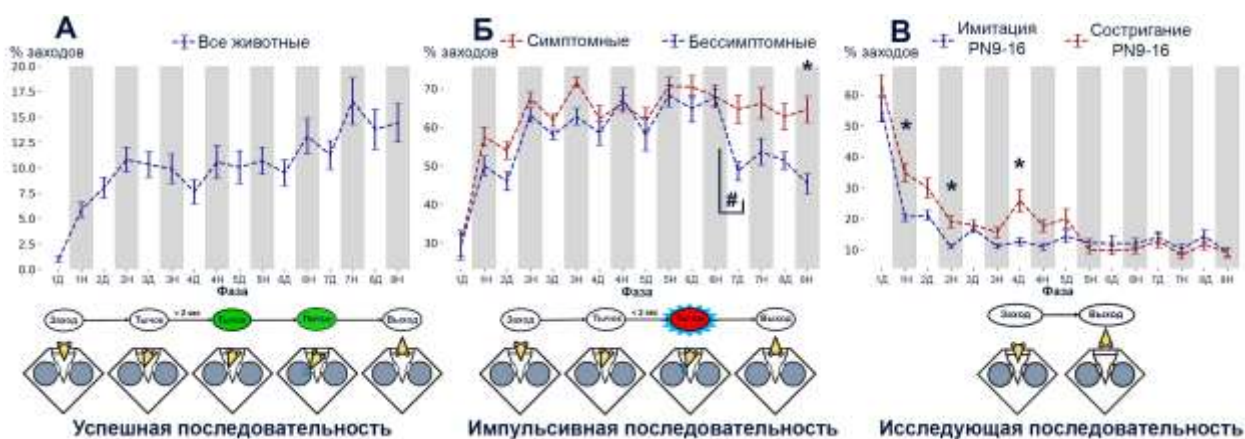


Рисунок 4. Динамика поведенческих последовательностей. А. Динамика успешной последовательности у всех животных. Б. Динамика импульсивной последовательности у животных с разным эпилептическим фенотипом. В. Динамика исследующей последовательности у животных, подвергнутым состриганию вибрисс или имитации в течение ПД9-16. «*» обозначает различия между группами. «#» обозначает различие между последовательными фазами ($p < 0.05$).

3.4.2. Исследование обучения в методике выработки условного рефлекса двустороннего избегания

Нами было проанализировано три параметра, отражающие различные этапы обучения в методике УРДИ. Номер попытки достижения критерия является стандартным параметром, отражающим формирование устойчивой реакции избегания. Номер попытки первого избегания свидетельствует об обнаружении связи между условным и безусловным стимулами. Количество попыток до достижения критерия является признаком того, как быстро животное формирует устойчивую реакцию избегания после обнаружения связи между стимулами.

Нами было обнаружено, что симптомные животные позже достигали критерия обучения за счет более позднего первого избегания, причем количество попыток от первого избегания до достижения критерия не отличалось между симптомными и бессимптомными животными (табл. 2) Нами было обнаружено, что крысы линии WAG/Rij, имеющие выраженные ПВР, позже формируют устойчивую реакцию избегания в результате более медленного обнаружения связи между условным и безусловным стимулами. Вероятно, что данный результат связан с нарушением управляющих функций, обеспечивающих выявление значимых параметров окружающей среды. Данное предположение согласуется с исследованиями на пациентах, имеющих абсансные приступы, в которых было показано, что дефицит управляющих функций наблюдается при выраженных ПВР (D'Agati et al., 2012; Vega et al., 2010; Wald et al., 2019).

<i>Параметр</i>	<i>Симптомный фенотип (n=43)</i>	<i>Бессимптомный фенотип (n=15)</i>
<i>Номер попытки достижения критерия</i>	26.0±1.2 *	19.8±2.0
<i>Количество попыток от первого избегания до достижения критерия</i>	15.7±1.2	12.4±2.1
<i>Номер попытки первого избегания</i>	11.1±1.1 *	7.7±2.0

Таблица 2. Влияние эпилептического фенотипа на параметры обучения. «*» обозначает статистически значимые различия между фенотипами ($p < 0.05$)

Крысы, подвергнутые воздействию в первый период (независимо от типа воздействия) позже достигали критерия обучения за счет большего количества попыток между первым избеганием и достижением критерия рис. 5Б). Предполагается, что сниженная способность к обучению реакции избегания у крыс, подвергнутых раннему хэндлингу, может быть связана со сниженной эмоциональной реактивностью, вызванной уменьшением активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (Plotsky and Meaney, 1993) и увеличением экспрессии рецепторов ГАМКа в миндалине (Caldji et al., 2000).

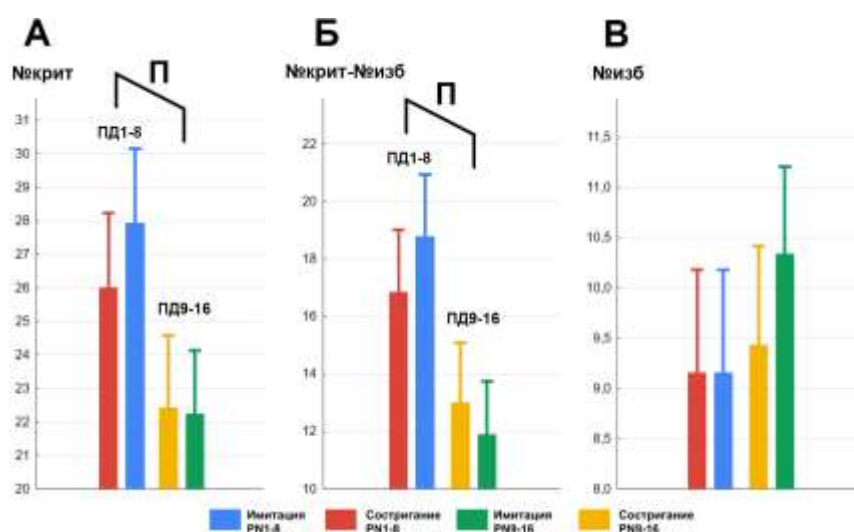


Рисунок 5. Влияние периода воздействия на параметры усвоения условной реакции двустороннего избегания. А. Номер попытки достижения критерия. Б. Количество попыток между первым избеганием и достижением критерия. В. Номер попытки первого избегания. Буква «П» обозначает статистически значимый эффект фактора «период» ($p < 0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Крысы линии WAG/Rij генетически предрасположены к развитию пиково-волновой активности, в поведении сопровождаемой замираниями, что соответствует клинической картине абсансных приступов у человека, обнаруживаемых при генерализованных формах эпилепсии и иных неврологических заболеваниях. Нами было обнаружено, что 30.1% крыс линии WAG/Rij не демонстрирует выраженных ПВР, при этом ограничение сенсорного притока от вибрисс в раннем онтогенезе не влияло на соотношение животных с

симптомным и бессимптомным фенотипом. Состригание вибрисс вне зависимости от периода состригания вибрисс увеличивало количество ПВР у симптомных животных, а воздействия в период появления вибротактильных движений (ПД9-16) вне зависимости от типа воздействия увеличивали длительность разрядов, что свидетельствует о различных механизмах, определяющих данные характеристики ПВР.

Сравнение крыс с симптомным и бессимптомным фенотипами позволило нам обнаружить поведенческие особенности животных, имеющих выраженные ПВР. Крысы с симптомным фенотипом демонстрировали сниженную тревожность, что проявилось в большем времени, проведенном в «опасных» зонах методик «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Открытое поле», а также сниженную способность к обучению в методиках «ИнтеллиКейдж» и УРДИ, связанную с нарушениями внимания. Обнаруженные особенности обучения соответствует данным о когнитивных нарушениях у пациентов, имеющих абсансные приступы. Ограничение сенсорного притока от вибрисс в раннем онтогенезе влияло на поведение животных, причем нами были обнаружены как специфичные для каждого из сензитивных периодов эффекты, так и вызванные самой процедурой состригания без влияния периода. Сближение сроков созревания ходьбы и открытия глаз у крыс, подвергнутых состриганию вибрисс с ПД9 по ПД16, вероятно, отражает реорганизацию функциональной системы, обеспечивающей ходьбу, с большей опорой на зрительную информацию. Кратковременные отлучения от матери, сопровождавшие экспериментальные процедуры, в период с ПД1 по ПД8 вели к более медленному усвоению реакции избегания по сравнению с отлучениями с ПД9 по ПД16.

ВЫВОДЫ

1. Ограничение сенсорного притока у крыс линии WAG/Rij в раннем онтогенезе ведет к усилению пик-волновой активности в возрасте 5 месяцев и, вероятно, ведет к ее более раннему созреванию по сравнению с имитацией состригания.
2. Сензитивные периоды созревания вибротактильной системы не являются специфичными для развития пик-волновой активности.

3. Характеристики пик-волновой активности в период созревания чувствительны к различным параметрам воздействий в раннем онтогенезе. Ограничение сенсорного притока от вибрисс ведет к увеличению числа пик-волновых разрядов, а период воздействия вне зависимости от типа влияет на среднюю длительность разрядов.

4. Ограничение сенсорного притока от вибрисс с первого по восьмой и с девятого по шестнадцатый день разнонаправленно влияет на сроки открытия глаз. Состригание вибрисс во второй период ведет к сближению сроков открытия глаз и формирования ходьбы и исчезновению связи между сроками созревания опорных точек развития и набором массы тела.

5. Крысы линии WAG/Rij с симптомным фенотипом демонстрируют изменения исследовательского поведения, указывающие на сниженный уровень тревожности, в период, предшествующий развитию пик-волновых разрядов.

6. Крысы линии WAG/Rij с симптомным фенотипом демонстрируют сниженную способность к обучению, вызванную нарушением внимания.

7. Воздействия с первого по восьмой постнатальный день вне зависимости от типа ведут к более медленному формированию условной реакции избегания по сравнению с воздействиями с девятого по шестнадцатый день.

Публикации по теме диссертации

1. Smirnov K, Tsvetaeva D, Sitnikova E. Neonatal whisker trimming in WAG/Rij rat pups causes developmental delay, encourages maternal care and affects exploratory activity in adulthood. *Brain Res Bull.* 2018 Jun;140:120-131. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.04.010. Epub 2018 Apr 21. PMID: 29684552.

2. Smirnov K, Sitnikova E. Developmental milestones and behavior of infant rats: The role of sensory input from whiskers. *Behav Brain Res.* 2019 Nov 18;374:112143. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112143. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31398362.

3. Sitnikova E, Smirnov K. Active avoidance learning in WAG/Rij rats with genetic predisposition to absence epilepsy. *Brain Res Bull.* 2020 Dec;165:198-208. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.10.007. Epub 2020 Oct 13. PMID: 33065174.

4. Runnova A, Zhuravlev M, Kiselev A, Ukolov R, Smirnov K, Karavaev A, Sitnikova E. Automatic wavelet-based assessment of behavioral sleep using

multichannel electrocorticography in rats. *Sleep Breath*. 2021 Mar 25. doi: 10.1007/s11325-021-02357-5. Epub ahead of print. PMID: 33768413.

5. Smirnov K, Stroganova T, Molholm S, Sysoeva O. Reviewing Evidence for the Relationship of EEG Abnormalities and RTT Phenotype Paralleled by Insights from Animal Studies. *Int J Mol Sci*. 2021 May 18;22(10):5308. doi: 10.3390/ijms22105308. PMID: 34069993; PMCID: PMC8157853.

6. Ситникова Е.Ю., Смирнов К.С., Грубов В.В., Храмов А.Е. Принципы диагностики незрелой эпилептической (проэпилептической) активности на ЭЭГ у крыс с генетической предрасположенностью к абсанс-эпилепсии. *Информационно-управляющие системы*. 2019. Т. 1. С. 89-97. DOI: 10.31799/1684-8853-2019-1-89-97.