

На правах рукописи

Митрухина Ольга Борисовна

**ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
СОМАТОТОПИЧЕСКИХ ЗОН В КОРЕ ГОЛОВНОГО
МОЗГА КРЫС ВО ВРЕМЯ КРИТИЧЕСКОГО ПЕРИОДА
РАЗВИТИЯ**

03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2017

Работа выполнена в Институте фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Научный руководитель: **Минлебаев Марат Гусманович**
кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты: **Мухамедьяров Марат Александрович**
доктор медицинских наук, доцент кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВО "Казанский государственный медицинский университет"

Мальшев Алексей Юрьевич

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН "Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН", Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Защита состоится «__» _____ 2017 года в «14⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.02 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года и размещён на сайтах <http://www.vak.ed.gov.ru> и <http://www.ksavm.senet.ru>

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



Гильмутдинов Рустам Якубович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Одним из основных вопросов нейробиологии развития является вопрос о том, каким образом огромное количество нейронов устанавливает синаптические связи друг с другом, формируя в результате мыслящий мозг. В то время как основная структура нейрональных сетей в определенной мере закодирована в наших генах, активность нейронов на ранних этапах развития вносит не менее важный вклад в процесс формирования специфических и высокофункциональных нейрональных сетей. Большое количество исследований, посвященных изучению роли нейрональной активности в раннем развитии нервной системы, свидетельствует о принципиальной роли коррелированной активности нейронов и синаптической пластичности в этом процессе (Khazipov R.N., Luhmann H.J. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents // *Trends Neurosci.* - 2006. –V. 29. – P. 414-418). При этом особо значима роль активности в развитии нейрональных сетей во время так называемых «критических» периодов развития (Erzurumlu RS, Gaspar P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex // *Eur.J.Neurosci.* – 2012. – V. 35. – P. 1540-1553). Одной из классических моделей критического периода является формирование соматосенсорных зон в коре головного мозга, которое критически зависит от нейрональной активности в соматосенсорной системе, обеспечиваемой активацией сенсорного входа. Так в определенном участке соматосенсорной коры новорожденных мышей и крыс (так называемом барреле), который получает и перерабатывает информацию от соответствующей вибриссы на мордочке животного, устранение сенсорного входа в первые дни после рождения животного (например, путем хирургического удаления фолликула вибриссы) приводит к практически полному исчезновению депривированного барреля. Аналогичная депривация у более взрослых животных не приводит к исчезновению депривированных баррелей, хотя и сопровождается существенными функциональными перестройками в соматосенсорных зонах (Woolsey T.A., Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units // *Brain Res.* - 1970. – V. 17. – P. 205-242). Однако, физиологические процессы, лежащие в основе критического периода, остаются малоизученными. В частности, остается открытым вопрос о том, какие паттерны нейрональной активности задействуются в коре головного мозга новорожденных животных при активации топографических и нетопографических сенсорных входов (основной и соседних вибрисс в случае баррельной коры).

В настоящее время описаны два основных осцилляторных паттерна активности в баррельной коре новорожденных крыс (в течение первой недели после рождения) – гамма-осцилляции и веретенообразные вспышки с доминирующим осцилляторным компонентом в альфа-бета диапазоне (Khazipov R.N., Luhmann H.J. Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents // Trends Neurosci. - 2006. –V. 29. – P. 414-418). Показано, что гамма-осцилляции возникают в строго топографическом участке соматосенсорной коры при стимуляции соответствующего сенсорного входа – в случае баррельной коры, в соответствующем барреле при стимуляции основной вибриссы. Веретенообразные вспышки характеризуют позднюю часть ответа при стимуляции топографического входа (основной вибриссы), а также являются характерной формой ответа при одновременной стимуляции большого количества сенсорных входов. Важным является то, что гамма-осцилляции вызывают долговременную потенциацию в таламокортикальных синапсах во время критического периода, что предполагает их роль в стабилизации топографически ориентированных таламокортикальных синапсов. В то же время, было показано, что альфа-бета осцилляции вызывают долговременную депрессию, которая считается предшественником последующей элиминации синапсов (Early gamma oscillations synchronize developing thalamus and cortex / M. Minlebaev, M. Colonnese, T. Tsintsadze, A. Sirota, R. Khazipov // Science. – 2011. – V. 334. – P. 226-229). Эти наблюдения рождают гипотезу о том, что эти два типа осцилляторных ответов являются инструментами в конкурентных взаимодействиях при формировании соматосенсорных таламокортикальных зон. Однако в то время как роль гамма-осцилляций в кодировании топографических сенсорных входов была показана, вопрос о роли альфа-бета-осцилляций в кодировании нетопографических входов остается открытым.

Другим немаловажным вопросом является соотношение роли нейрональной активности и генетической программы в развитии нейрональных зон. Являются ли специфические ритмы активности основным инструментом формирования зон мозга или они необходимы лишь для окончательной подстройки уже развивавшихся по своей программе зон? Существуют две основные модели раннего формирования соматосенсорных зон во время критического периода. Модель “tabula rasa” предполагает, что изначально строгого порядка в образующихся синаптических связях нет. При этом количество связей сперва избыточно, а последующее упорядочивание нейрональной сети обусловлено конкуренцией между пресинаптическими нейронами за клетки-мишени с подавлением и устранением нетопографических связей, а также усилением и стабилизацией топографических связей. Альтернативная модель предполагает, что с самого начала нейрональные связи

устанавливаются строго упорядоченным образом, с помощью специальных молекулярных гидов, обеспечивающих прорастание аксонов в строго заданные участки нервной системы и формирование специфических контактов с клетками-мишенями. При этом нейрональной активности отводится роль функциональной проверки изначально топографически собранных сетей (Erzurumlu R.S., Gaspar P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex // Eur.J.Neurosci. – 2012. – V. 35. – P. 1540-1553). Интересно, что обе эти модели имеют существенную экспериментальную доказательную базу, опирающуюся в основном на морфологические данные. Однако, какая из этих двух моделей применима в случае формирования соматотопических зон в коре головного мозга во время критического периода, остается неизвестным. Центральным для решения этой проблемы остается вопрос о том, какова изначальная организация соматотопических зон в самом начале критического периода – строго топографическая, как в случае модели генетической предопределенности, либо диффузная, как в случае модели “*tabula rasa*”.

Цель исследования – изучить процессы и инструменты формирования функциональных соматотопических зон в коре головного мозга новорожденных крыс во время критического периода развития таламокортикальных связей.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Определить, является ли функциональное состояние соматосенсорных зон в самом начале критического периода, т.е. в первые дни после рождения, строго топографичным или диффузным.
2. Охарактеризовать возрастные изменения в уровне топографичности функциональных соматосенсорных зон во время критического периода и сравнить эти изменения с формированием морфологических соматосенсорных зон.
3. Охарактеризовать паттерны электрографической сенсорно-вызванной активности в соматосенсорной коре головного мозга новорожденных крыс в области представительства вибрисс во время критического периода формирования соматосенсорных зон – первой недели после рождения.
4. Описать различия в паттернах активности, вызываемых топографическим и нетопографическим сенсорными входами у новорожденных крыс.

Научная новизна работы

Впервые охарактеризовано функциональное состояние соматосенсорной коры головного мозга крыс во время раннего критического периода. Показано, что ответы, вызываемые стимуляцией соседних вибрисс, значительно перекрываются, что является доказательством изначально диффузной функциональной организации соматосенсорной коры и свидетельствует о конкурентных механизмах в формировании топографических соматосенсорных

зон. Впервые показано, что формирование функциональных соматотопических зон в коре головного мозга крыс во время критического периода происходит параллельно с формированием морфологических соматосенсорных зон. Впервые показано, что во время позднего критического периода топографические и нетопографические сенсорные входы кодируются соответственно гамма- и альфа-бета-осцилляциями, что предполагает противоположную роль этих осцилляций в синаптической пластичности – стабилизации топографических таламокортикальных синапсов и устранении нетопографических синапсов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Основное значение результатов проведенных исследований состоит в получении новых данных о физиологических процессах, лежащих в основе формирования соматосенсорных зон в коре головного мозга во время критического периода их развития. Обнаруженная диффузная организация ответов, вызываемых стимуляцией вибрисс, и значительное перекрытие этих ответов в самом начале критического периода свидетельствует об изначально диффузной функциональной организации соматосенсорных зон. Обнаруженное частотное кодирование топографических и нетопографических сенсорных входов во время позднего критического периода предполагает различную роль осцилляций, в зависимости от их частоты, в процессах синаптической пластичности – потенциации топографических синапсов гамма-осцилляциями и подавлении нетопографических синапсов альфа-бета-осцилляциями. В совокупности, полученные результаты подтверждают модель развития соматосенсорной коры, в которой нейрональная активность, вызываемая сенсорной стимуляцией, обеспечивает условия для формирования топографических соматосенсорных зон посредством конкурентных взаимодействий между сенсорными входами в их борьбе за кортикальные территории во время критического периода. Поскольку в естественных условиях сенсорная стимуляция, как это было показано ранее, обеспечивается в значительной степени посредством сенсорной реафферентации, возникающей в результате спонтанных движений, полученные результаты также являются свидетельством важной физиологической роли спонтанной двигательной активности в развитии соматосенсорного анализатора. Этот механизм может быть наиболее значимым в процессе развития нервной системы у человека, поскольку соответствующий описанному в настоящем исследовании период развития у человека происходит внутриутробно, в условиях практически полной соматосенсорной депривации.

Методология и методы исследования

Мы исследовали электрическую активность *in vivo*, возникающую в кортикальных колонках соматосенсорной коры (баррелях) головного мозга новорожденных крысят в ответ на стимуляцию вибрисс на мордочке животных в первую неделю после рождения (P0-7). Для регистрации внеклеточной электрической активности использовались многоканальные электроды на кремниевой подложке, а для внутриклеточной регистрации от отдельных нейронов использовались стеклянные пипетки (метод пэтч-клампа).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В соматосенсорной баррельной коре крыс во время раннего критического периода новорожденных (P0-1) сенсорная стимуляция вибрисс вызывает диффузные ответы в виде дельта-волн с обширными проекционными полями одиночных вибрисс и со значительным перекрытием зон, активируемых соседними вибриссами.
2. Переход от диффузного состояния функциональной организации зон в соматосенсорной баррельной коре к строго топографической организации происходит прогрессивно в течение первой недели после рождения параллельно с формированием морфологических соматосенсорных зон.
3. Во время позднего критического периода развития таламо-кортикальных сетей (P3-7) сенсорно-вызванные ответы характеризуются вспышками осцилляторной активности в гамма- и альфа-бета-частотных диапазонах, при этом гамма-осцилляции специфически кодируют активность топографических сенсорных входов, а альфа-бета-осцилляции кодируют интегративную активность нетопографических сенсорных входов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных данных основана на большом объеме результатов экспериментальных исследований с использованием адекватных методических подходов и статистической обработки полученных результатов (с помощью программ, разработанных в нашей лаборатории на основе пакета Matlab).

Материалы работы представлены на Международной научной конференции Средиземноморского института нейробиологии «Journées Inmed» (Сент-Рафаэль, Франция, 2012); Международном симпозиуме "Молекулярные механизмы регуляции синаптической передачи" (Киев, Украина, 2012); Всероссийской с международным участием школе-конференции «Физиологические механизмы адаптации растущего организма» (Яльчик, 2012); Международном форуме нейробиологии FENS (Милан, Италия, 2014). Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ № 13-04-01237, грантом Правительства РФ ведущим ученым №11.G34.31.0075, а также программой конкурентного развития Казанского федерального университета.

Реализация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на белых лабораторных крысах обоих полов разных возрастов начиная со дня рождения (P0) и заканчивая 7м днем после рождения (P7). Эксперименты выполнялись в соответствии с этическими требованиями по работе с лабораторными животными (протоколы экспериментов одобрены Французским национальным институтом здоровья и медицинских исследований (INSERM, N007.08.01), а также Локальным этическим комитетом Казанского медицинского университета (N9-2013)).

Хирургическое вмешательство производилось с использованием изофлюрановой анестезии. В ходе хирургической операции обнажался участок черепа животного с последующим убиением надкостницы с обнаженной кости. Ориентируясь по координатам относительно анатомических точек пресечения саггитального шва с корональным (брегма) и затылочным (гамма) швами, мы отмечали участок черепа размером 4-9 мм² над баррельной корой левого полушария. Обнаженная и подсушенная область черепа вокруг этого участка покрывалась последовательно цианакрилатным клеем и зубным цементом быстрой фиксации, с помощью последнего голова животного закреплялась на кольцевой держатель со множеством степеней свободы, что позволяло в дальнейшем удобно располагать поверхность головы животного относительно микроскопа и манипулятора с регистрирующим электродом. После хирургической операции животное помещалось в установку и неподвижно фиксировалась в области головы к стереотаксу с помощью вышеописанного крепления. Для обеспечения комфортных условий животное обкладывалось ватой, для поддержания постоянной температуры тела новорожденного крысенка под ним располагался термоковрик с постоянным контролем поддержания температуры в пределах 35-37⁰С. В качестве референтного электрода использовалась хлорсеребряная проволока, имплантированная в мозжечок или зрительную кору животного.

Для локализации специфического барреля в соматосенсорной коре использовался *метод регистрации внутреннего оптического сигнала*, суть которого заключается в том, что активная нейрональная ткань поглощает больше кислорода, и при повторной стимуляции определенной вибриссы с помощью высокоскоростной и высокочувствительной системы регистрации

видеосигнала можно отследить локальное изменение концентрации кислорода в активной зоне.

Для последующей регистрации активности нейронов в черепе над областью идентифицированного барреля высверливалось небольшое отверстие, твердая мозговая оболочка осторожно надсекалась. Электроды располагались в центре кортикальной колонки.

В ряде экспериментов регистрация внутреннего оптического сигнала не производилась, и основная вибрисса идентифицировалась по короткой временной задержке между моментом подачи стимула и появления активности в регистрируемом барреле. Одиночные вибриссы стимулировались пьезодефлексией или короткими узкими толчками воздуха.

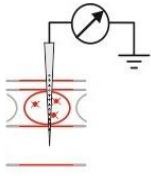
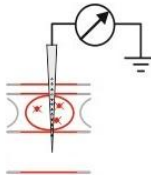
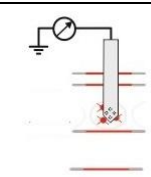
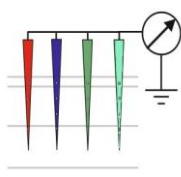

В экспериментах с *регистрацией внеклеточной активности нейронов* от целой кортикальной колонки использовались многоканальные линейные электроды на кремниевой подложке. Электроды погружались в основную колонку на глубину от 0 до 1500 мкм для того, чтобы одновременно регистрировать активность от всех слоев основной кортикальной колонки. В экспериментах с одновременной регистрацией активности от нескольких кортикальных колонок мы использовали 4-х плечевые многоканальные электроды. В этих экспериментах наиболее глубокие электроды размещались на глубине 800 мкм от поверхности коры. Таким образом, как минимум один электрод каждого плеча находился на уровне гранулярного и субгранулярного слоев. Регистрация единичных ПД производилась путем кластеризации сигналов, зарегистрированных с помощью 4-х канальных электродов, расположенных в виде ромба на кремниевой подложке, т.н. тетродов. Для животных возрастной группы младше 4-х дней значения глубины для гранулярного и субгранулярного слоев определялось как глубина, на которой регистрировался ответ с минимальной задержкой вызванных потенциалов действия и 200-300 мкм ниже, соответственно.

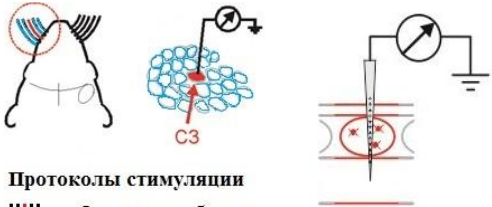
Глутаматергические возбуждающие постсинаптические токи (ВПСТ) в нейронах внутренней части кортикальной пластинки (или 4 слое) записывались на потенциале реверсии ГАМК(A)-Р опосредованных токов (-70мВ) с помощью *внутриклеточной регистрации активности нейронов* в режиме фиксации потенциала (voltage-clamp) стеклянными пипетками, заполненными раствором цезий-глюконата CsGluconate (мМ: 130 Cs-Gluconate, 13 CsCl, 0.1 CaCl₂, 1 ethylene glycol tetraacetic acid [EGTA], и 10 4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid [HEPES], pH 7.25) или калий-глюконата KGluconate(мМ: 130 K-Gluconate; 10 Na-Gluconate; 4 NaCl; 4 Mg-ATP; 4 Phosphocreatine; 10 HEPES [K]; 0.3 Na₂GTP, pH 7.25).

Анализ данных производился с помощью разработанных в нашей лаборатории функций на основе пакета программ Matlab.

Общая схема исследования для удобства приведена в форме сводной таблицы (Таблица 1), где указаны названия серий экспериментов, использованный метод и размер выборки.

Таблица 1- Общая схема исследований

Формирование функциональных соматотопических зон в коре головного мозга новорожденных крыс во время критического периода развития таламокортикальных связей		
<p>Характеристика рецептивных полей в баррельной коре новорожденных крыс (P0-1)</p>		<p>Многоканальное линейное внеклеточное отведение от отдельной кортикальной колонки</p> <p>N = 8 крысят</p>
<p>Постнатальная сегрегация рецептивных полей в течение первой недели после рождения (P0-7)</p>		<p>Многоканальное линейное внеклеточное отведение от отдельной кортикальной колонки</p> <p>N = 29 крысят</p>
		<p>Внеклеточное отведение от клеток IV слоя одной кортикальной колонки (тетродный электрод)</p> <p>N = 4 крысенка</p>
<p>Постнатальная сегрегация проекционных полей вибрисс в баррельной коре у новорожденных крысят (P0-7)</p>		<p>Многоканальное внеклеточное отведение от нескольких кортикальных колонок</p> <p>N = 29 крысят</p>
<p>Сегрегация синаптических входов в процессе развития (P0-7)</p>		<p>Внутриклеточное отведение от отдельных нейронов</p> <p>N = 19 клеток</p>

<p>Частотное кодирование в баррельной коре новорожденных крыс (P2-7)</p>	<p>Многоканальное линейное внеклеточное отведение от отдельной кортикальной колонки</p>  <p>Протоколы стимуляции</p> <ul style="list-style-type: none"> Основная вибрисса Соседняя вибрисса Все вибриссы Все-кроме-основной вибриссы 	<p>N = 78 крысят</p>
--	--	----------------------

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика рецептивных полей в баррельной коре новорожденных крыс

Чтобы определить первоначальное состояние функциональной организации зоны представительства вибрисс на мордочке животного в соматочувствительной коре, т.е. выяснить, является ли она точной, когда каждая кортикальная колонка получает вход только от одного периферического рецептивного поля - вибриссы, или диффузной, когда рецептивные поля в соматосенсорной коре пересекаются и кортикальные нейроны получают вход от нескольких рецептивных полей, мы исследовали рецептивные поля кортикальных нейронов с помощью метода внеклеточной регистрации *in vivo* многоканальными электродами на кремниевой подложке у крысят (в возрасте P0-1, где P0 – это день рождения крысенка; n=8 крысят).

Механическая стимуляция вибрисс на мордочке новорожденных крысят (с помощью трубочки пьезодефлектора либо узконаправленного толчка воздуха) во время первых двух дней после рождения вызывала в баррельной коре электрический ответ в виде дефлексии локального полевого потенциала (ЛПП), организованного в осцилляции в виде дельта волн и веретенообразных всплесков и ассоциированного с множественной нейрональной активностью (МНА), в одном и том же участке регистрации, тогда как на более поздних возрастах (P2-P7), ответ в регистрируемой области баррельной коры возникал на стимуляцию только одного, максимум двух вибрисс, и отклонение соседних вибрисс никакого ответа в данной области не вызывало (Рисунок 1).

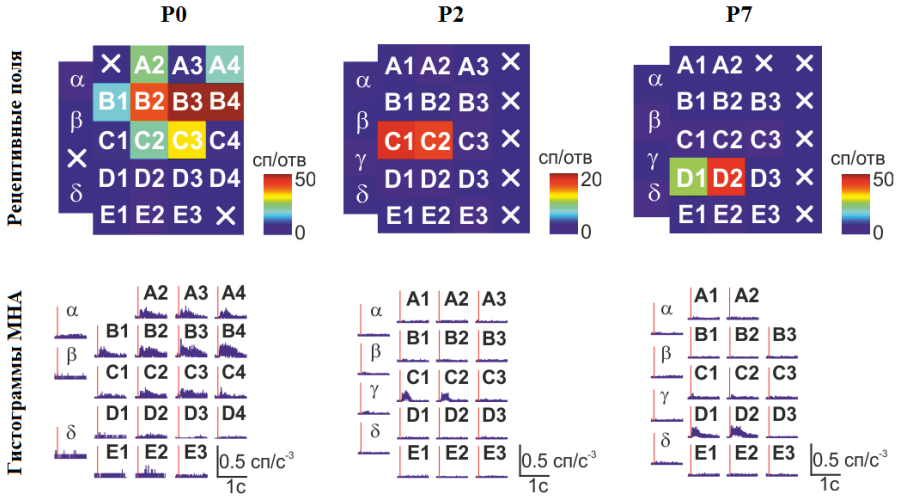


Рисунок 1 – Рецептивные поля и гистограммы распределения множественной нейрональной активности (МНА), отцентрированной по моменту стимула отдельной вибриссы

Примечание: Каждая ячейка матрицы рецептивных полей вибрисс представляет суммарное значение МНА, вызванной стимуляцией отдельной вибриссы; крестиком отмечены ячейки вибрисс, не подвергавшихся тестированию; сп/с⁻³ - количество спайков (внеклеточных потенциалов действия) в секунду, сп/отв - количество спайков в одном вызванном ответе.

Несколько типов сравнения показало, что в возрасте P0-1 рецептивные поля нескольких рядом расположенных вибрисс перекрываются в одном кортикальном участке, т.е. рецептивные поля носят диффузный характер. Средние значения МНА в соотношениях СВ1/ОВ и СВ2/ОВ составили $0,43 \pm 0,05$ и $0,23 \pm 0,03$, соответственно (Рисунок 2А). Общее количество вибрисс, дефлексия которых вызывала значительное ($p < 0,05$) увеличение МНА, составило $8,7 \pm 1,7$. В среднем, $4,8 \pm 0,8$ СВ вызывало МНА, по величине превышавшую половину ответа, вызываемого стимуляцией ОВ (Рисунок 2Б)

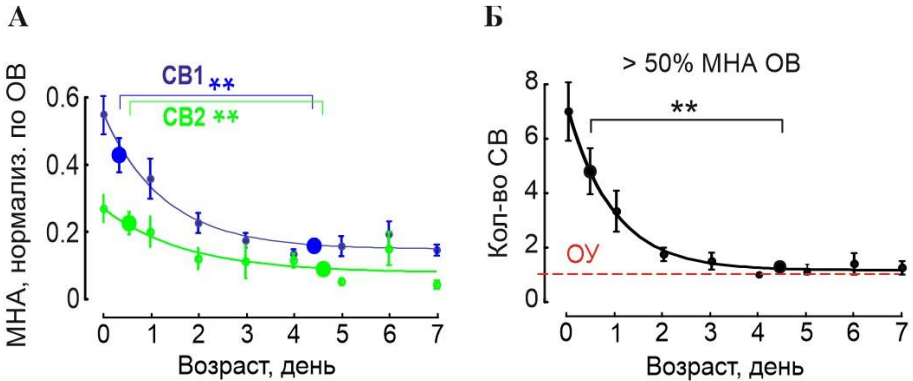


Рисунок 2 – Возрастная зависимость силы ответа при стимуляции основной вибриссы (ОВ) и соседних вибрисс первого (CB1) и второго (CB2) порядка

А – Возрастная зависимость МНА, нормализованной по ОВ (CB1/ОВ обозначено синим цветом, CB2/ОВ – зеленым), а также модельная функция экспоненциального спада, описывающая данную возрастную зависимость соотношений. Крупными символами обозначено усреднение значений в двух возрастных диапазонах P0-1 и P2-7, при этом отрезки сверху указывают на сравниваемые значения и достоверную разницу между ними ($n = 29$ крыс, $**p < 0.01$).

Б – Возрастная зависимость количества СВ, ответы на стимуляцию которых составляли по мощности более половины от ответов, вызванных стимуляцией ОВ. Крупными символами обозначено усреднение значений в двух возрастных диапазонах P0-1 и P4-5, при этом отрезок сверху указывает на сравниваемые значения и достоверную разницу между ними. ($n = 29$ крыс, $**p < 0.01$).

Постнатальная сегрегация рецептивных полей

Диффузные проекции, когда несколько вибрисс проецируют в один кортикальный участок, наблюдаются только в первые два дня после рождения. Начиная с P2-3, проявляется взрослый тип вызванного ответа - сегрегированный тип рецептивных полей (Simons D.J. Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex // J.Neurophysiol. – 1978. – V. 41. – P. 798-820; Armstrong-James M., Fox K. Spatiotemporal convergence and divergence in the rat S1 "barrel" cortex // J.Comp Neurol. – 1987. – V. 263. – P. 265-281; Roy N.C., Bessaih T., Contreras D. Comprehensive mapping of whisker-evoked responses reveals broad, sharply tuned thalamocortical input to layer 4 of barrel cortex // J.Neurophysiol. – 2011. – V. 105. – P. 2421-2437), где одна вибрисса проецирует лишь в свое представительство в баррельной коре. Во-первых, это выражается в уменьшении МНА в соотношениях CB1/ОВ и CB2/ОВ до $0,17 \pm 0,01$ и $0,1 \pm 0,02$, соответственно (Рисунок 2А), при этом в ответах наблюдается большая предпочтительность к стимуляции соседних вибрисс по

ряду (по горизонтали), нежели по арке (по вертикали). Во-вторых, общее количество вибрисс, вызывающих МНА, уменьшается до $6,4 \pm 0,5$. В-третьих, практически полностью элиминируются ответы от СВ, которые составляли бы по величине более половины от МНА ответов, вызванных стимуляцией ОВ ($n=21$; крысы P2-7; Рисунок 2Б).

Регистрация единичных ПД с помощью тетродов показала сходную картину развития рецептивных полей в постнатальный период: рецептивные поля кластеров единичных потенциалов действия в возрасте P0 оказались шире, чем в более позднем возрасте P5. У крысят в возрасте P0-1 ответы, вызываемые стимуляцией ОВ, достоверно не отличались от ответов, вызываемых стимуляцией СВ1 ($0,7 \pm 0,2$ ПД/ответ; $n=6$ ПД от 2 крысят P0-1; $p > 0,05$). У крысят в возрасте P4-5 ответы, вызываемые стимуляцией ОВ ($1,9 \pm 0,9$ ПД/ответ), становились достоверно сильнее, чем ответы, вызываемые стимуляцией СВ1 ($0,37 \pm 0,1$ ПД/ответ; $n=10$ ПД от 2 крысят P4-5; $p < 0,001$) (Рисунок 4).

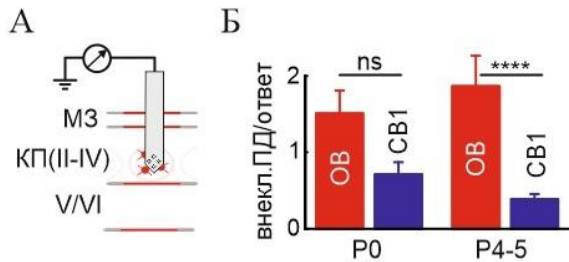


Рисунок 3 – Регистрация единичных ПД с помощью тетродов при стимуляции ОВ, СВ1 и СВ2

А – Схема внелеточной регистрации МНА в кортикальной пластинке (или IV слое коры) 4-канальным электродом тетродной конфигурации.

М3 - маргинальная зона, КП(II-IV) - область формирующихся 2-4 слоев в кортикальной пластинке, V/VI - 5/6 слои коры.

Б – Усредненное количество единичных ПД, возникавших в ответ на стимуляцию ОВ и СВ1 для возрастных групп P0 ($n=6$ кластеров, $p > 0,05$) and P4-5 ($n=10$ кластеров, $p < 0,001$). центре - гистограмма усредненных единичных ПД для возрастных групп P0 ($n=6$ кластеров, $p > 0,05$) and P4-5 ($n=10$ кластеров, $p < 0,001$).

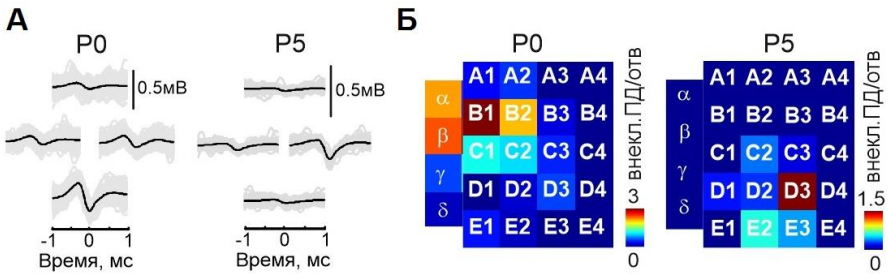


Рисунок 4 – Единичные ПД, зарегистрированные с помощью тетродов при стимуляции OB, CB1 и CB2.

А – Примеры форм единичных ПД, принадлежащих одному кластеру, в кортикальной пластинке (P0) и в IV слое баррельной коры (P5) у крыс.

Б – Цветовые матрицы рецептивных полей кластеров единичных ПД, приведенных слева.

Таким образом, рецептивные поля в баррельной коре в процессе развития проходят через стадию диффузной организации, характеризующейся широкой настройкой, когда кортикальный нейрон получает сенсорный вход от нескольких вибрисс, однако через 2-3 дня после рождения диффузная организация сменяется сегрегированным состоянием, когда нейроны преимущественно настроены на одну основную вибриссу.

Постнатальная сегрегация проекционных полей вибрисс в баррельной коре у новорожденных крысят

Активация кортикальных нейронов стимуляцией различных вибрисс подразумевает, что у новорожденных крыс сенсорный вход от одной вибриссы активирует большую кортикальную территорию. Чтобы проверить эту гипотезу, для регистрации ответов при стимуляции одной вибриссы использовались многоплечевые многоканальные электроды с расстоянием 200 мкм между плечами (Рисунок 5А).

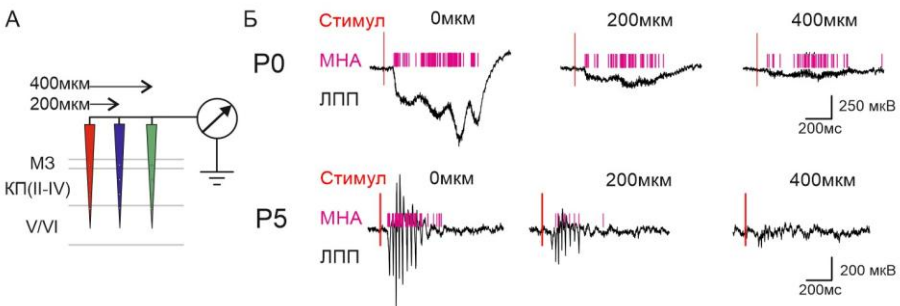


Рисунок 5 - Кортикальные проекционные поля вибрисс в баррельной коре у новорожденных крысят

А – Схема регистрации МНА с помощью внеклеточных многоплечевых многоканальных электродов (горизонтальное расстояние между плечами 200 мкм). МЗ - маргинальная зона, КП(II-IV) - область формирующихся 2-4 слоев в кортикальной пластинке, V/VI - 5/6 слои коры.

Б – Примеры ответов, зарегистрированных подобными электродами в кортикальной пластинке у крысенка в возрасте P0 (наверху) и в гранулярном слое баррельной коры у крысенка в возрасте P5 (внизу) при стимуляции вибриссы ВЗ (момент отклонения вибриссы обозначен красной вертикальной линией). Черным цветом представлены отклонения ЛПП, а малиновые штрихи над линией ЛПП отображают МНА (каждый штрих соответствует одному зарегистрированному внеклеточному ПД).

Сначала мы анализировали рецептивные поля для каждого плеча электрода в отдельности, как описано выше, а затем сравнивали ответы, вызываемые стимуляцией одной вибриссы на разных плечах электрода.

У крысят в возрасте P0-1 МНА, вызванная стимуляцией одной вибриссы, наблюдалась в множестве участков баррельной коры (Рисунок 5Б). Кортикальное проекционное поле одной вибриссы оценивалось как расстояние, на котором наблюдался половинный от максимального ответ (ПП50) и составило 240 ± 22 мкм у крысят P0-1 ($n=8$). В ходе созревания проекционное поле вибриссы сжимается до 159 ± 6 мкм в возрасте P2-7 ($n=21$). (Рисунок 6А). Таким образом, в соответствии с теорией диффузной настройки кортикальных нейронов одного кортикального участка коры на множество вибрисс, в раннем постнатальном периоде входы от отдельных вибрисс представляют собой широкие кортикальные проекционные поля. Более того, сходные профили развития характерны как для проекционных (Рисунок 6Б), так и для рецептивных полей (Рисунок 2).

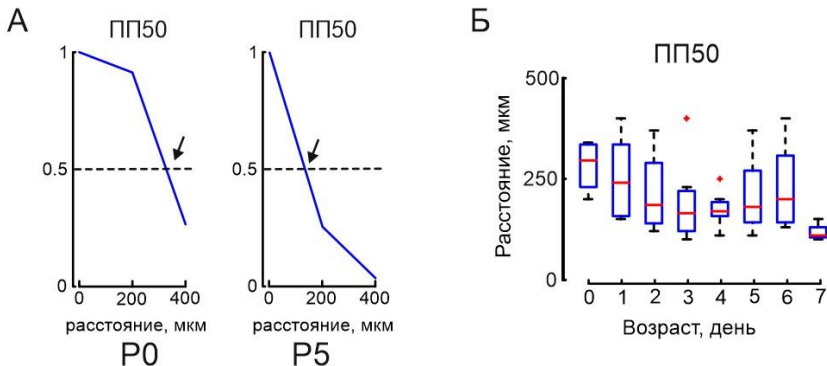


Рисунок 6 – Постнатальная сегрегация проекционных полей вибрисс в баррельной коре у новорожденных крысят

(А) Кортикальные проекционные поля у крысят в возрасте P0 и P5. Размер проекционных полей (ПП50) оценивался пересечением кривой нормализованной плотности МНА ответов с пороговым уровнем, равным 50% от максимального ответа (обозначено стрелкой). (Б) Возрастная зависимость размеров проекционных полей, представленная в виде диаграммы размаха, где медианы обозначены красным цветом (n=29 крысят).

Сегрегация синаптических входов в процессе развития

Чтобы исследовать синаптические механизмы, лежащие в основе генерации диффузных ответов у новорожденных крыс, мы применили метод whole-cell регистрации кортикальных нейронов в плотной кортикальной пластинке (Рисунок 7А).

В возрасте P0-1 стимуляция ОВ вызывала всплески глутаматергических возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) (Рисунок 7Б). Общий перенос заряда во время синаптических ответов, вызванных стимуляцией ОВ, составил $-5,9 \pm 3,6$ ПКл на потенциале фиксации -70 мВ (n=6; Рисунок 7В). Как и в случае внеклеточной регистрации, стимуляция соседних вибрисс у крысят P0-1 выявила широкие рецептивные поля возбуждающих синаптических ответов, при этом интегральный ответ, вызванный стимуляцией СВ1, составил $-1,4 \pm 0,6$ ПКл ($34 \pm 10\%$ от ответа, вызванного стимуляцией ОВ; n=6). У животных постарше задержка синаптических ответов, вызванных стимуляцией ОВ, сократилась до 49 ± 3 мс, тогда как интегральный синаптический ответ, вызванный стимуляцией ОВ, увеличился до $-17,1 \pm 2,3$ ПКл, а ответы, вызванные стимуляцией СВ1, составили $-2,2 \pm 0,6$ ПКл (n= 13 клеток; крысы P4-7, Рисунок 7В).

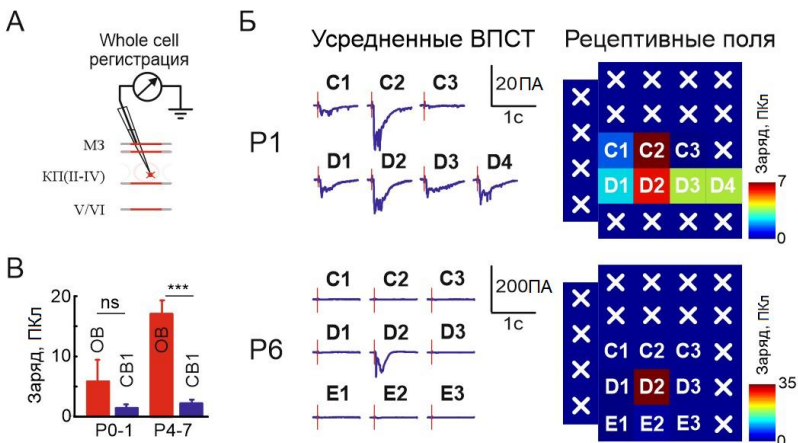


Рисунок 7 - Сегрегация синаптических входов в процессе развития

А – Схема внутриклеточной регистрации электрических токов в конфигурации whole cell. МЗ - маргинальная зона, КП(II-IV) - область формирующихся 2-4 слоев в кортикальной пластинке, V/VI - 5/6 слою коры.

Б – Усредненные вызванные возбуждающие постсинаптические токи (ВПСТ), зарегистрированные методом whole-cell регистрации электрической активности нейронов кортикальной пластинки или гранулярного слоя баррельной коры (потенциал фиксации -70 мВ), и соответствующие им цветовые матрицы рецептивных полей у крысят в возрасте P1 и P6.

В – Усредненные значения ВПСТ, вызванных стимуляцией ОВ и СВ1 для двух возрастных групп крысят: P0–1 (n=6 клеток) and P4–7 (n=13 клеток).

Таким образом, для синаптических рецептивных полей единичного кортикального нейрона тоже характерен переход от диффузного состояния на P0-1, характеризующегося мощными возбуждающими синаптическими ответами одного нейрона на стимуляцию разных вибрисс, к состоянию сегрегации, характеризующемуся преобладанием ответов, вызванных стимуляцией ОВ, перед ответами, вызванными стимуляцией СВ.

Частотное кодирование в баррельной коре новорожденных крыс

Чтобы охарактеризовать частотную составляющую электрической активности, возникающей при стимуляции вибрисс на мордочке новорожденных крысят, мы исследовали ответы, вызываемые в отдельной кортикальной колонке соматосенсорной коры новорожденных крысят (в представительстве вибрисс) стимуляцией топографических (основной вибриссы) и нетопографических (соседних вибрисс) входов с помощью метода внеклеточной регистрации *in vivo* многоканальными электродами на кремниевой подложке (n=44 крысенка в возрасте P2-P7) (Рисунок 8).

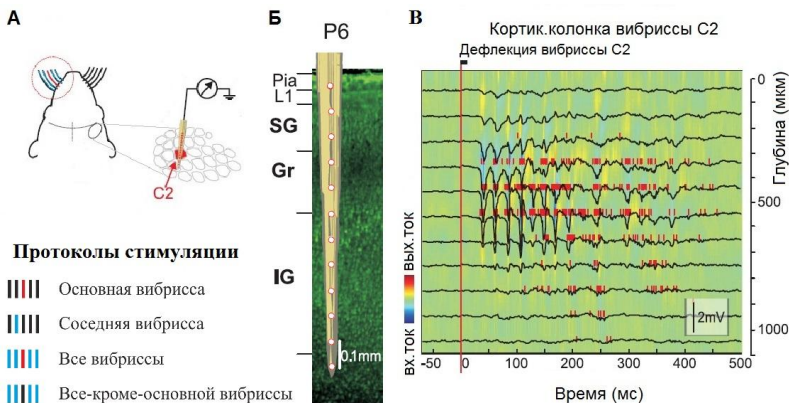


Рисунок 8 – Внеклеточная регистрация нейрональной активности в отдельной кортикальной колонке

(А) Схема эксперимента и протоколы стимуляции: красным обозначена стимуляция ОВ, синим – СВ, чёрным – вибрисс, не подвергавшихся стимуляции. (Б) Изображение регистрирующего линейного 16-канального электрода, наложенного на Stir2-окрашенный срез соматосенсорной коры. (В) Сенсорный ответ, вызываемый стимуляцией основной вибриссы С2 на разной глубине кортикальной колонки С2. Локальные полевые потенциалы (ЛПП) показаны черными линиями на фоне цветовой кодировки плотности источника токов. Потенциалы действия (ПД) обозначены красными штрихами. P_{ia} – мягкая мозговая оболочка, L1 – I слой коры, SG – супрагранулярный слой (II и III слои), Gr – гранулярный слой (IV слой), IG – инфрагранулярный слой (V и VI).

После размещения 16-канального электрода (расстояние между электродами 100 мкм) перпендикулярно поверхности коры на глубину 1,5 мм мы производили регистрацию активности, вызываемой механической дефлексией различных вибрисс (с помощью пьезодефлексии либо коротких толчков воздуха через миниатюрную трубку). Протоколы стимуляции приведены на рисунке 8А, а на рисунке 9 показаны примеры ответов при разных протоколах стимуляции. В ходе одной сессии мы снимали по 50-100 ответов на каждый вид стимуляции. В соответствии с результатами предыдущих исследований (*Early gamma oscillations synchronize developing thalamus and cortex* / M. Minlebaev, M. Colonnese, T. Tsintsadze, A. Sirota, R. Khazipov // *Science*. – 2011. – V. 334. – P. 226-229), стимуляция основной вибриссы вызывала гамма-осцилляции, которые длились несколько сотен миллисекунд.

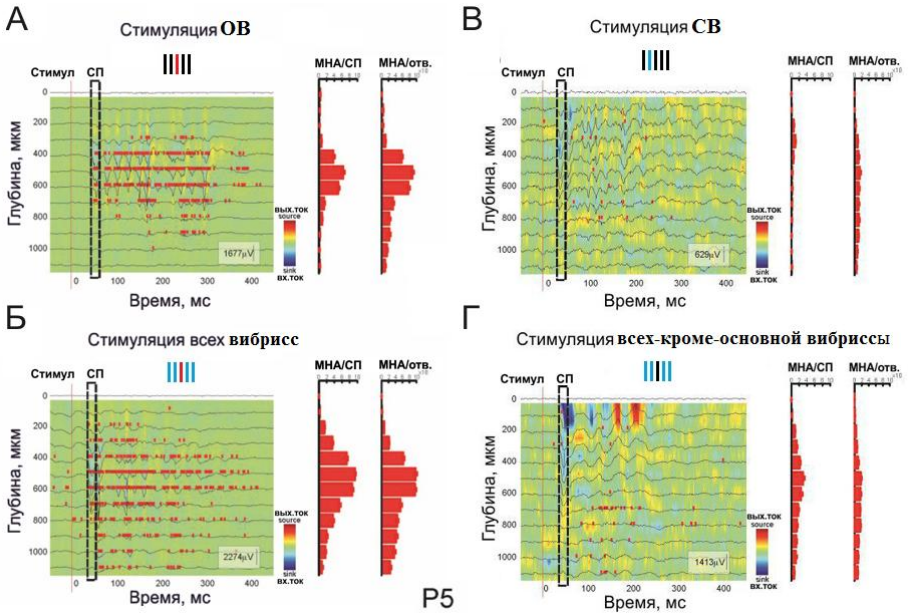


Рисунок 9 – Примеры ответов СЗ-кортикальной колонки, регистрируемых 16-канальным электродом, при разных протоколах стимуляции: основной вибриссы СЗ (А), всех вибрисс (Б), одной из соседних вибрисс (В), всех-кроме-основной вибрисс (Г) – вибрисса СЗ при этом спрятана от потока воздуха в стеклянную трубочку.

Примечание: Локальные полевые потенциалы (ЛПП) показаны черными линиями на фоне цветовой кодировки плотности источника токов. Потенциалы действия (ПД) обозначены красными штрихами. Вертикальные гистограммы отражают плотность МНА во время сенсорного потенциала (СП, обведён пунктирной линией на записях слева) и за время всего ответа (500 мс после подачи стимула)

Потенциалы действия клеток гранулярного слоя этой колонки были строго привязаны во времени к негативным плечам гамма-осцилляции. Непрерывный частотно-временной анализ (вейвлет) локальных потенциалов показал, что вызванные стимуляцией основной вибриссы ответы имеют доминантную частоту в гамма-диапазоне во время всего ответа (Рисунок 10).

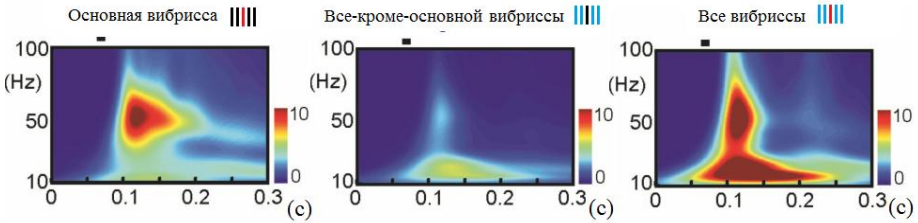


Рисунок 10 – Непрерывный частотно-временной анализ (вейвлет) сенсорных ответов в гранулярном слое одной кортикальной колонки при стимуляции различных сенсорных входов

Эта гамма-осцилляция перемежалась с более слабой осцилляторной активностью в более низких (альфа/бета) частотах. Дефлекции одиночных смежных вибрис вызвала лишь пассивно проводящиеся гамма-осцилляции и слабую низкочастотную активность. Стимуляция всех вибрисс толчком воздуха, направленным на все вибриссы (в том числе и на основную), приводила к появлению осцилляторной активности, имеющей пики как в гамма-, так и в альфа/бета-диапазонах. Возбуждение нейронов было максимальным при стимуляции основной вибриссы и при стимуляции всех вибрисс и значительно ниже при стимуляции соседнего и всех-кроме-основной вибрисс (Рисунок 10).

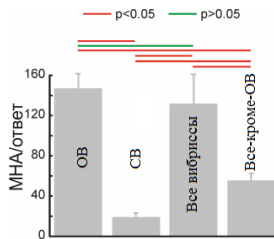


Рисунок 11 - Возбуждение нейронов слоя 4 одной кортикальной колонки в ответ на различные виды сенсорной стимуляции

Примечание: Статистические данные представляют усреднение (\pm стандартную девиацию) по 44 животным (P2-P7) для стимуляции основной и соседней вибрисс (ОБ и СВ, соответственно), 27 со стимуляцией всех вибрисс и 7 со стимуляцией всех-кроме-основной вибрисс. Достоверность различий между различными условиями показана над колонками.

Нами также был проведен анализ когерентности между МНА нейронов гранулярного слоя и локальным внеклеточным потенциалом (Рисунок 12), который выявил удивительную закономерность: в тех случаях, когда производилась стимуляция топографического входа (основной вибриссы), пик когерентности

между внеклеточным потенциалом и внеклеточно зарегистрированными ПД нейронов находился в гамма-диапазоне, в то время как при стимуляции соседних вибрисс (по отдельности или в режиме все-кроме-основной вибриссы) максимальная когерентность наблюдалась преимущественно в альфа/бета-диапазонах.

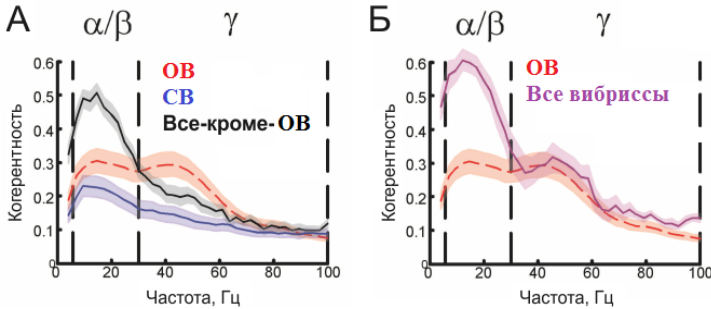


Рисунок 12 – Когерентность между локальным полевым потенциалом и потенциалами действия нейронов в 4-м слое кортикальной колонки при различных режимах стимуляции

Примечание: Статистические данные представляют усреднение (\pm стандартная девиация Джекнайфа) по 44 животным (P2—P7) для стимуляции основного и соседнего вибрисс, 27 со стимуляцией всех вибрисс и 7 со стимуляцией всех-кроме-основного вибрисс.

Стимуляция всех вибрисс сопровождалась наличием пиков высокой когерентности как в альфа/бета-, так и в гамма-частотах, по-видимому, в результате наложения двух процессов - топографической гамма- и нетопографической альфа/ бета-осцилляций. В результате когерентность в гамма-диапазоне специфично возрастала при стимуляции OB, тогда как она была наивысшей в альфа/бета- диапазоне при стимуляции множественных СВ. Эти наблюдения также поднимают вопрос о том, каким образом гамма- и альфа/бета-осцилляции взаимодействуют друг с другом, и в частности, каким образом происходит модуляция гамма-активности более медленными частотами в контексте обработки информации при стимуляции OB и СВ.

Данные результаты указывают на то, что сенсорный вход от вибрисс на морде к кортикальным колонкам у P2-P7 крысят уже топографически ограничен и вызывает специфичную активность в отдельных колонках посредством осцилляций в гамма-диапазоне. Напротив, альфа/бета-осцилляции, широко наблюдающиеся в соматосенсорной и зрительной коре, свидетельствуют о межколонковой интеграции множественных сенсорных входов. Эти наблюдения чрезвычайно интересны в плане синаптической пластичности, поскольку ритмическая стимуляция в гамма-диапазоне приводит

к долговременной потенциации таламокортикальных синапсов во время первой недели после рождения, а стимуляция в альфа/бета-диапазоне приводит к долговременной депрессии [Minlebaev et al., 2011]. Таким образом, можно предположить, что развитие топографических связей между таламусом и корой обеспечивается этими двумя типами осцилляций: гамма-осцилляциями, которые специфично вызываются при активации топографического входа и способствуют его потенциации с последующей консолидацией этих топографических таламокортикальных синапсов, и альфа/бета-осцилляциями, которые активируются при стимуляции нетопографических входов (от соседних вибрисс) и приводят к депрессии и последующему устранению этих аберрантных нетопографических синапсов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Во время первых двух дней после рождения (P0-1) стимуляция разных вибрисс вызвала в кортикальной пластинке электрический ответ в виде характерных дефлекций локального полевого потенциала, ассоциированных с множественной нейрональной активностью, в одном и том же участке регистрации, тогда как на более поздних возрастах (P2-7), ответ в регистрируемой области баррельной коры возникал на стимуляцию только одной, максимум двух вибрисс, и отклонение соседних вибрисс никакого ответа в данной области не вызывало.

2. В возрасте P0-1 рецептивные поля нескольких рядом расположенных вибрисс перекрываются в одном кортикальном участке, т.е. рецептивные поля носят диффузный характер, при этом в ответах наблюдается большая предпочтительность к стимуляции соседних вибрисс по горизонтали, чем по вертикали.

3. Начиная с P2-3, проявляется взрослый тип вызванного ответа – сегрегированный, где одна вибрисса проецирует лишь в свое представительство в баррельной коре: уменьшается общее количество вибрисс, вызывающих множественную нейрональную активность, практически полностью элиминируются ответы от соседних вибрисс, которые составляли бы по величине более половины от множественной нейрональной активности, вызванной стимуляцией основной вибриссы.

4. У крысят в возрасте P0-1 множественная нейрональная активность, вызванная стимуляцией одной вибриссы, наблюдалась во множестве участков баррельной коры, т.е. в раннем постнатальном периоде сенсорные входы от отдельных вибрисс представляют собой широкие перекрывающиеся кортикальные проекционные поля. В ходе созревания проекционные поля вибрисс уменьшаются и не перекрываются друг с другом.

5. Для синаптических рецептивных полей единичного кортикального нейрона тоже характерен переход от диффузного состояния на P0-1, характеризующегося мощными возбуждающими синаптическими ответами одного нейрона на стимуляцию разных вибрисс, к состоянию сегрегации, характеризующемуся преобладанием ответов, вызванных стимуляцией основной вибриссы, перед ответами, вызванными стимуляцией соседних вибрисс.

6. Вызванные стимуляцией основной вибриссы ответы имели вид гамма-осцилляции, перемежавшейся с более слабой осцилляторной активностью в более низких (альфа/бета) частотах. Дефлекции одиночных соседних вибрисс вызвала лишь пассивно проводящиеся гамма-осцилляции и слабую низкочастотную активность. Стимуляция всех вибрисс толчком воздуха, направленным на все вибриссы (в том числе и на основную), приводила к появлению осцилляторной активности, имеющей пики как в гамма-, так и в альфа/бета-диапазонах. Возбуждение нейронов было максимальным при стимуляции основной вибриссы и при стимуляции всех вибрисс и значительно ниже при стимуляции соседней вибриссы и всех вибрисс, кроме основной.

7. При стимуляции топографического сенсорного входа (основной вибриссы), пик когеренции между локальным полевым потенциалом и внеклеточными потенциалами действия нейронов находился в гамма-диапазоне, в то время как при стимуляции соседних вибрисс (по отдельности или в режиме все-кроме-основной) максимальная когерентность наблюдалась преимущественно в альфа/бета-диапазонах. Стимуляция всех вибрисс сопровождалась наличием пиков высокой когерентности как в альфа/бета-, так и в гамма-частотах. В результате когерентность в гамма-диапазоне специфично возрастала при стимуляции основной вибриссы, тогда как она была наивысшей в альфа/бета-диапазоне при стимуляции множества соседних вибрисс.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Mitrukhnina, O. Somatosensory thalamocortical connections in the newborn rat during the critical developmental period / O. Mitrukhnina, M. Minlebaev, R. Khazipov // «Journées Inmed»: abstract – St. Raphael, Valescure, France. - September 26-28 - 2012. - P.44.
2. Mitrukhnina, O. Development of topographical thalamocortical connections in the barrel system of newborn rat in vivo / O. Mitrukhnina, M. Minlebaev, R. Khazipov // II International Symposium "Molecular mechanisms of synaptic transmission regulation": abstract. - Kyiv, Ukraine. - October 6-9 – 2012. - P. 22-23.
3. Митрухина, О.Б. Частотное кодирование в соматосенсорной коре головного мозга новорожденных крысят / О.Б. Митрухина, Д.С. Сучков, Г.Ф. Ситдикова

- ва, Р.Н. Хазипов, М.Г. Минлебаев // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. - 2012.-Т. 154. - Кн. 2. - С.85-96. *
4. Митрухина, О.Б. Стереотаксический атлас мозга крысы в онтогенезе / О.Б. Митрухина, О.В. Яковлева, Р.Н. Хазипов // Материалы Всероссийской с международным участием школы-конференции. - Яльчик. – 2012. - С. 136-137.
 5. Mitrukhnina, O.B. Imprecise Whisker Map in the Neonatal Rat Barrel Cortex / O.B. Mitrukhnina, D.S. Suchkov, R.N. Khazipov, M.G. Minlebaev // Cerebral Cortex, Oxford University Press. – 2014. - V.24(8). *
 6. Suchkov, D. Postnatal emergence of topographic whisker map in the rat barrel cortex / D. Suchkov, O. Mitrukhnina, M. Minlebaev, R. Khazipov // Abstract at the 9th FENS Forum of Neuroscience – Milan, Italy – 2014.
 7. **Митрухина, О. Б.** Генетические и эпигенетические механизмы формирования соматосенсорных карт в коре головного мозга / О.Б. Митрухина, М. Минлебаев, Р. Хазипов // Гены и клетки. - 2015 - Т. X. - № 3. - С.1-6. *
 8. Khazipov, R. Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / R. Khazipov, D. Zaynutdinova, E. Ogievetsky, G. Valeeva, **O. Mitrukhnina**, J.B. Manent, A. Represa // Frontiers in Neuroanatomy. – 2015. – V. 9. – P. 161. *

* - Издания, рекомендованные ВАК РФ.