

УДК 612.82

ВЛИЯНИЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ АСИММЕТРИЧНОЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ЗРИТЕЛЬНОЙ АФФЕРЕНТАЦИИ НА АКТИВАЦИЮ НЕЙРОНОВ КАУДОМЕДИАЛЬНОГО МЕЗОПАЛЛИУМА ПРИ РЕАКЦИИ ЗАТАИВАНИЯ У НЕЗРЕЛОРОЖДАЮЩИХСЯ ПТЕНЦОВ

© 2021 г. Е. В. Корнеева^{1,*}, А. А. Тиунова², Л. И. Александров¹, Т. Б. Голубева³

Представлено академиком РАН М.В. Угрюмовым

Поступило 29.07.2020 г.

После доработки 09.11.2020 г.

Принято к публикации 09.11.2020 г.

Работа заключалась в исследовании влияния асимметричной пренатальной зрительной стимуляции на активацию нейронов каудомедиального мезопаллиума (СММ) у 9-суточных птенцов мухоловки-пеструшки во время аудионаправляемого затаивания. Исследовали 4 группы птенцов: 1 и 2 группы, соответственно, зрячие и незрячие птенцы, эмбриональный период и вылупление которых проходили при свете; 3 и 4 группы – зрячие и незрячие птенцы, эмбриональный период и вылупление которых проходили в темноте. Незрячим птенцам за 2 ч до начала эксперимента заклеивали глаза светонепроницаемыми колпачками. Исследовали экспрессию белка c-Fos. Показано, что только в группе вылупившихся при свете незрячих птенцов плотности активированных при затаивании нейронов в правом и левом СММ были различными. Это свидетельствует о том, что наличие или отсутствие асимметричной эмбриональной зрительной афферентации может приводить к формированию различных стратегий использования зрительного обеспечения оборонительного поведения.

Ключевые слова: птицы, птенцы, зрительная афферентация, оборонительное поведение, каудомедиальный мезопаллиум, c-Fos

DOI: 10.31857/S268673892102013X

Сенсорная стимуляция является важнейшим фактором, определяющим развитие нервной системы любого организма. Особое значение этот фактор приобретает в период пренатального онтогенеза [1, 2]. Птицы являются уникальной моделью для исследования влияния эмбриональной сенсорной стимуляции на онтогенетическое формирование как самой сенсорной системы, так и последующего поведения организмов. Это связано с наличием в эмбриогенезе птиц периода естественной асимметрии зрительной стимуляции.

На последних сроках эмбриогенеза голова эмбрионов повернута таким образом, что правый глаз располагается непосредственно под скорлупой яйца и может получать световую афферентацию. Исследования показали, что эмбрионально обусловленная асимметрия зрительной афферентации в сочетании с полным зрительным перекрестом приводит у птиц к различному формированию морфофункциональных проекций правого и левого глаз [3, 4]. Целью данной работы было выяснение вопроса о том, влияют ли особенности пренатальной сенсорной стимуляции на формирование паттернов активации нейронов при реализации постнатального поведения. Известно, что изменения зрительной афферентации в раннем онтогенезе могут в значительной степени модулировать развитие нейрональной активности в слуховых областях [5, 6]. Ранее нами было показано, что акустически направляемое оборонительное поведение у птенцов мухоловки-пеструшки (*Ficedula hypoleuca*) с появлением предметного зрения на 9-е сутки становится более выраженным [7]. Картирование нейрональной активности путем детекции транскрипционного фактора

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: eko.ihna@mail.ru

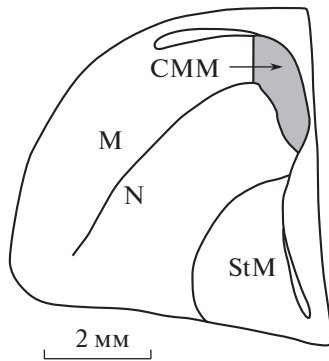


Рис. 1. Рисунок фронтального среза правого полушария 9-суточного птенца мухоловки-пеструшки на уровне каудомедиального мезопаллиума. Серым цветом выделена область, в которой производили подсчет *c-Fos*-позитивных клеток. М — мезопаллиум, СММ — каудомедиальный мезопаллиум, N — нидопаллиум, StM — медиальный стриатум. Масштаб — 2 мм.

c-Fos в теленцефалических слуховых структурах показало, что исключение зрительной афферентации из обеспечения оборонительного поведения незадолго перед экспериментом вызывает снижение его индукции в структурах правого полушария [8]. Мы предположили, что такая особенность связана с пренатальной асимметричной световой стимуляцией. Задача данной работы заключалась в проверке этой гипотезы, а именно в сравнении нейронального ответа слуховых структур 9-суточных птенцов, получивших или не получивших асимметричную пренатальную зрительную стимуляцию при акустически направляемом оборонительном поведении. В качестве маркера нейрональной активности использовали транскрипционный ответ раннего гена *c-Fos*, неоднократно использовавшийся для картирования нейрональной активности мозга в различных поведенческих ситуациях [9].

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными по протоколу, утвержденному этической комиссией ИВНД и НФ РАН. Исследования проведены на 4 группах 9-суточных птенцов мухоловки-пеструшки, по 5 птенцов в каждой группе. Птенцы 1 и 2 групп воспитывались в условиях нормальной зрительной среды. Их вылупление проходило в естественных условиях высиживания самкой, и в дальнейшем на протяжении всего времени эти птенцы находились в естественной среде обитания. Вылупление птенцов 3 и 4 групп проходило в темноте. С этой целью за 2 сут до предполагаемого срока вылупления птенцов яйца забирали из естественных гнезд и переносили в неосвещенный инкубатор. Физические и сенсорные условия инкубирования (за исключением освещенности) были максимально приближены к естественным. После вы-

лупления птенцов забирали из инкубатора и переносили в родные гнезда, где они находились до начала эксперимента. Половине птенцов, вылупившихся при каждом из условий освещенности, за 2 ч до начала эксперимента глаза заклеивали светонепроницаемыми колпачками (группы незрячих птенцов темнового и светового вылупления). Две оставшиеся группы оставались зрячими (группы зрячих птенцов темнового и светового вылупления). Таким образом были сформированы группы птенцов: 1 — зрячие птенцы светового вылупления, 2 — незрячие птенцы светового вылупления, 3 — зрячие птенцы темнового вылупления и 4 — незрячие птенцы темнового вылупления. На 9-е сутки птенцам всех групп, находящимся в стандартных дуплянках, в течение 15 мин проигрывали видоспецифический сигнал тревоги. Через 90 мин после начала эксперимента птенцов декапитировали, их мозг замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -70°C . Иммуногистохимическую детекцию белков *c-Fos* проводили на серийных фронтальных криостатных срезах толщиной 20 мкм по стандартной методике [8, 10]. Осуществляли панорамное сканирование срезов и в каудомедиальном мезопаллиуме (СММ), структуре, связанной с восприятием видоспецифической вокализации, проводили количественный анализ паттернов экспрессии. Ядра иммунопозитивных клеток считали с использованием программы анализа изображений Image Pro Plus. Порог минимальной оптической плотности, выделяющий меченые клетки, но исключаящий фоновую окраску, устанавливали вручную. Проводили тотальный подсчет иммунопозитивных клеток в выделенной области (рис. 1).

Определяли плотность *c-Fos* позитивных нейронов в правых и левых структурах СММ как количество иммунопозитивных нейронов на единицу площади исследуемых структур на каждом из срезов. Для определения соотношения плотностей *c-Fos*-позитивных нейронов в правом и левом СММ был введен коэффициент симметрии как отношение плотности *c-Fos*-позитивных нейронов в правом СММ к таковой в левом СММ. Для проверки отличия коэффициентов симметрии от 1 (1 соответствовала полной симметрии) проводилась статистическая обработка по *t*-критерию для одной выборки.

Статистический анализ влияний факторов освещенности в разные периоды проводился при использовании факторного анализа ANOVA, различия между группами оценивались при помощи LSD-теста. Достоверными считались отличия при $p < 0.05$.

Визуальное исследование срезов мозга на уровне СММ показало выраженную иммунореактивность нейронов данной области.

Таблица 1. Плотности с-Fos-положительных нейронов в правом и левом СММ, $n/1 \text{ мм}^2$

	зрячие птенцы светового вылупления	незрячие птенцы светового вылупления	зрячие птенцы темнового вылупления	незрячие птенцы темнового вылупления
Правый СММ	368.2 ± 211.2	261.5 ± 91.5	705.6 ± 157.4	401.3 ± 198.8
Левый СММ	330.9 ± 201.9	322.3 ± 91.7	831.4 ± 242.1	376.2 ± 186.8

Анализ плотностей с-Fos-положительных нейронов в правом и левом СММ выявил, что этот показатель на разных срезах ощутимо различался, что давало очень большой разброс значений (табл. 1).

В этой связи статистический анализ не выявил значимых различий плотностей иммунопозитивных нейронов в разных группах, что не позволило использовать показатель плотности для статистического анализа.

Исследование коэффициентов симметрии плотностей иммунопозитивных нейронов в СММ в разных экспериментальных группах выявило, что этот показатель достоверно отличается от 1 только в группе незрячих птенцов светового вылупления ($t = -2.87422$, $p = 0.04528$) (рис. 2).

Факторный анализ не обнаружил значимой разницы между влияниями как фактора освещенности в позднем эмбриогенезе, так и фактора наличия или отсутствия зрительной афферентации

во время эксперимента. Однако он показал значимость эффекта взаимодействия между анализируемыми факторами ($F = 8.1935$, $p = 0.011287$).

Индивидуальные сравнения между группами выявили достоверно более низкие показатели коэффициента симметрии плотностей иммунопозитивных нейронов в СММ в группе незрячих птенцов светового вылупления по сравнению с группой зрячих птенцов светового вылупления ($p = 0.015137$) и группой незрячих птенцов темнового вылупления ($p = 0.049872$) (рис. 2).

Таким образом, наши данные показали, что содержание яиц в темноте на поздних сроках инкубационного периода, устраняющее световую стимуляцию правого глаза эмбрионов, не приводит к изменению соотношения нейронов правого и левого СММ, активирующихся при реализации оборонительного поведения у 9-суточных птенцов. Однако тестирование вклада зрительной афферентации путем ее исключения незадолго до начала эксперимента выявило существенные различия между птенцами, вылупление которых проходило в темноте и на свету. Только у птенцов, развивающихся и вылупившихся при нормальном световом режиме, мы наблюдали асимметричный вклад зрительной афферентации в активацию нейронов правого и левого СММ. Нейроанатомические исследования продемонстрировали, что в пределах зрительных ядер среднего и промежуточного мозга птиц наблюдается асимметричное распределение разных фракций нейронов, а инкубирование яиц в темноте нарушает такой паттерн распределения. [11]. Таким образом, асимметрию зрительного вклада в оборонительную интеграцию можно связать с асимметрией эмбриональной световой стимуляции, а исключение этой стимуляции меняет паттерн активирующихся при оборонительном поведении нейронов. Иными словами, наличие или отсутствие асимметричной эмбриональной зрительной афферентации у птенцов мухоловки-пеструшки может приводить к формированию различных стратегий использования сенсорного обеспечения оборонительного поведения.

Плотность с-Fos справа/слева

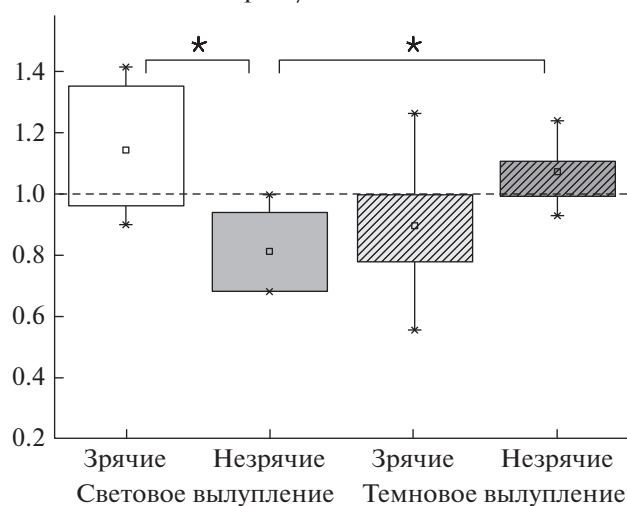


Рис. 2. Коэффициент симметрии плотностей с-Fos-положительных нейронов в правом и левом СММ. По вертикали – отношение количества с-Fos-положительных клеток на 1 мм^2 в правом СММ к левому СММ. По горизонтали – группы птенцов. Нижняя и верхняя границы прямоугольников соответствуют первому и третьему квартилю, точка в прямоугольнике – среднему арифметическому, разбросы – минимальному и максимальному наблюдаемому выборочному значению. * – значимые различия коэффициентов симметрии между группами птенцов при $p < 0.05$.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены за счет средств Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 20-013-00176.

КОНФЛИКТОВ ИНТЕРЕСОВ

Конфликтов интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами работы с лабораторными животными, а именно Конвенции ЕС 2010 г. (Директива 2010/63 / ЕС) по протоколу, утвержденному этической комиссией ИВНД и НФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lickliter R.* The Role of Sensory Stimulation in Perinatal Development: Insights From Comparative Research for Care of the High-Risk Infant // *Journal of developmental and behavioral pediatrics*. 2000. V. 21. № 6. P. 437–447.
2. *Шишелова А.Ю., Раевский В.В.* Влияние пре- и постнатальных факторов на формирование ранних поведенческих реакций // Доклады Российской академии наук. 2018. Т. 479. № 3. С. 351–353. <https://doi.org/10.7868/S0869565218090268>
3. *Rogers J.* A Matter of Degree: Strength of Brain Asymmetry and Behaviour // *Symmetry*. 2017. V. 9. № 57. <https://doi.org/10.3390/sym9040057>
4. *Schmitz J., Güntürkün O., Ocklenburg S.* Building an Asymmetrical Brain: The Molecular Perspective // *Frontiers in Psychology*. 2019. V. 10. Article 982.
5. *Mowery T.M., Kotak V.C., Sanes D.H.* The onset of visual experience gates auditory cortex critical periods // *Nature Communications*. 2016. V. 7. Article 10416
6. *Huber E., Chang K., Alvarez I.* Early Blindness Shapes Cortical Representations of Auditory Frequency within Auditory Cortex // *The Journal of Neuroscience*. 2019. V. 39. № 26. P. 5143–5152.
7. *Корнеева Е.В., Александров Л.И., Голубева Т.Б. и др.* Роль зрительной афферентации в формировании ранних форм оборонительного поведения птенцов мухоловки- // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2005. Т. 55. № 3. С. 353–359.
8. *Корнеева Е.В., Тиунова А.А., Александров Л.И., и др.* Зрительная афферентация влияет на экспрессию ранних генов c-fos и zenk в слуховых теленцефалических центрах птенцов мухоловки-пеструшки при акустически направляемой реакции // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2014. Т. 64. № 3. С. 324–333.
9. *Jaworski J., Kalita K., Knapska E.* C-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory // *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2018. V. 78. № 4. P. 287–296.
10. *Корнеева Е.В., Тиунова А.А., Александров Л.И., и др.* Активация WULST у птенцов мухоловки пеструшки при пищевом поведении, вызываемом оформленным зрительным стимулом // *Журнал высшей нервной деятельности*. 2016. Т. 66. № 1. С. 74–78.
11. *Letzner S., Manns M., Güntürkün O.* Light-dependent Development of the Tectorotundal Projection in Pigeons // *The European journal of neuroscience*. 2020. May 9. <https://doi.org/10.1111/ejn.14775>

INFLUENCE OF NATURAL ASYMMETRIC EMBRYONIC VISUAL AFFERENTATION ON THE NEURONAL ACTIVATIONS IN CAUDOMEDIAL MESOPALLIUM DURING THE FREEZING RESPONSE IN ALTRICIAL NESTLING

E. V. Korneeva^{a, #}, A. A. Tiunova^b, L. I. Alexandrov^a, and T. B. Golubeva^c

^a *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Moscow, Russian Federation*

^b *P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Moscow, Russian Federation*

^c *Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russian Federation*

[#] *e-mail: eko.ihna@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS M.V. Ugryumov

The study was designed to investigate the role of asymmetric prenatal visual stimulation on the activation of caudomedial mesopallium (CMM) neurons in 9-day-old pied flycatcher nestlings during auditory-guided freezing. Four groups of nestlings were studied: groups 1 and 2 – nestlings with normal vision and visually deprived, respectively, who were incubated and hatched in normal light environment; groups 3 and 4 – nestlings with normal vision and visually deprived, respectively, who were incubated and hatched in the dark. Eyes of visually deprived nestlings were covered with non-transparent cups 2 hours before experiment. Expression of c-Fos was studied. It was shown that densities of neurons activated during freezing response differed in right vs left CMM only in the group of visually deprived nestlings incubated under light. This suggests that the presence or absence of the asymmetric embryonic visual afferentation may result in the development of different strategies of integration of the visual system into defense behavior.

Keywords: Birds, nestlings, visual afferentation, defense behavior, caudomedial mesopallium, c-Fos