

Сенсорная пластичность нейронов обонятельного эпителия мыши при ассоциативном обучении

А.В. Ромащенко^{1, 2}✉, П.Е. Киреева¹, М.Б. Шарапова², Т.А. Запара¹, А.С. Ратушняк¹

¹ Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Традиционно основными структурами мозга, участвующими в запоминании информации, считаются отделы, которые осуществляют вторичную обработку сенсорной информации. Однако в последнее время появились данные о роли сенсорной пластичности в реализации процессов запоминания. В настоящей работе методом марганец-усиленной МРТ исследовано влияние обонятельного ассоциативного обучения на функциональную активность нейронов обонятельного эпителия в ответ на индифферентный стимул, в качестве которого выступало апельсиновое масло. Обнаружено, что такая периферическая структура обонятельной системы взрослых мышей, как обонятельный эпителий (ОЭ), демонстрирует зависимость от опыта пластичность. В нашем эксперименте условное кондиционирование привело к изменению паттернов накопления Mn^{2+} , агониста кальциевых каналов, в клетках ОЭ в ответ на запах апельсинового масла в сравнении с контрольной группой и животными, которым был предложен запах без подкрепления. Для интерпретации полученных результатов сопоставлялось распределение контраста по зонам обонятельной луковицы в ответ на условный запах у обученных животных и у контрольных животных, которым предоставляли апельсиновое масло в трех концентрациях: исходной (использовалась при кондиционировании), в 4 раза большей и в 4 раза меньшей. Поскольку в группе обученных животных и контрольных, которым предъявляли стимул в 4 раза большей концентрации, полученные паттерны активации ОЭ совпали, можно заключить, что ассоциативное кондиционирование увеличило чувствительность нейронов ОЭ к условному стимулу, что согласуется с проведенными на тех же животных поведенческими тестированиями. Наблюдаемое усиление ответа ОЭ на запах апельсинового масла может, с одной стороны, быть результатом нейрогенеза, т. е. образования новых обонятельных нейронов, реагирующих на данный стимул, а с другой – следствием увеличения интенсивности ответа каждой отдельной клетки. Основываясь на данных по накоплению МРТ-контраста в обонятельных нейронах, можно говорить о более вероятном увеличении чувствительности ОЭ за счет сенсорной пластичности, а не за счет нейрогенеза. Таким образом, сенсорная пластичность ОЭ играет значимую роль в формировании нейронального ответа на предоставление изначально индифферентного запаха и является частью приспособительных реакций животного к изменяющимся условиям среды.

Ключевые слова: обонятельное обучение; сенсорная пластичность; обонятельный эпителий; марганец-усиленная магнитно-резонансная томография.

Learning-induced sensory plasticity of mouse olfactory epithelium

A.V. Romashchenko^{1, 2}✉, P.E. Kireeva¹,
M.B. Sharapova², T.A. Zapara¹, A.S. Ratushnyak¹

¹ Institute of Computational Technologies, SB RAS,
Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Traditionally, studies of the neurobiology of learning and memory focus on the circuitry that interfaces between sensory inputs and behavioral outputs, such as the amygdala and cerebellum. However, evidence is accumulating that some forms of learning can in fact drive stimulus-specific changes very early in sensory systems, including not only primary sensory cortices but also precortical structures and even the peripheral sensory organs themselves. In this study, we investigated the effect of olfactory associative training on the functional activity of olfactory epithelium neurons in response to an indifferent stimulus (orange oil). It was found that such a peripheral structure of the olfactory system of adult mice as the olfactory epithelium (OE) demonstrates experience-dependent plasticity. In our experiment, associative learning led to changes in the patterns of OE cell activation in response to orange oil in comparison with the control group and animals that were given odor without reinforcement. To interpret the results obtained, we compared the distribution of MRI contrast across the zones of OE in response to a conditioned odor in trained animals and in control animals that were given orange oil at three concentrations: original (used for conditioning), 4-fold higher and 4-fold lower. Since the OE activation patterns obtained coincided in the group of trained animals and controls, which were stimulated with orange oil at the 4-fold higher concentration, it can be concluded that associative conditioning increased the sensitivity of the OE to the conditioned stimulus. The observed increase in OE response to orange oil may be the result of neurogenesis, i. e. the maturation of new olfactory neurons responsive to this stimulus, or the consequence of an increase in individual sensitivity of each OE neuron. Based on data of MRI contrast accumulation in mouse OE, the sensory plasticity way in learning-induced increase in sensitivity of OE to conditioned stimulus is more possible. Thus, the sensory plasticity of the OE plays a significant role in the formation of the neuronal response to the provision of an initially indifferent odor and is part of the adaptive responses to the environmental changing.

Key words: olfactory learning; sensory plasticity; olfactory epithelium; manganese-enhanced magnetic resonance imaging.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Ромащенко А.В., Киреева П.Е., Шарапова М.Б., Запара Т.А., Ратушняк А.С. Сенсорная пластичность нейронов обонятельного эпителия мыши при ассоциативном обучении. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8):1070-1077. DOI 10.18699/VJ18.452

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Romashchenko A.V., Kireeva P.E., Sharapova M.B., Zapara T.A., Ratushnyak A.S. Learning-induced sensory plasticity of mouse olfactory epithelium. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1070-1077. DOI 10.18699/VJ18.452(in Russian)

УДК 591.185.34:616-073.756.8

Поступила в редакцию 03.09.2018

После доработки 23.10.2018

Принята к публикации 23.10.2018

© АВТОРЫ, 2018

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

Запахи играют важнейшую роль в жизни млекопитающих, предоставляя особи сведения о положении в пространстве пищи и хищников. Поэтому способность к запоминанию новой запаховой информации, которая так или иначе может оказать влияние на выживаемость особи, является одним из необходимых адаптивных свойств организма. В большой части нейробиологических исследований, посвященных механизмам обучения и памяти, в качестве основной гипотезы рассматривают различные схемы взаимодействия между сенсорным входом и структурами, ответственными за реализацию поведенческой программы, такими как гиппокамп, миндалина и мозжечок (Gao, Suga, 2000; Weinberger, 2011). Однако в целом ряде исследований показано, что при некоторых формах обучения стимул-специфические изменения могут происходить не только в кортикальных структурах обработки информации, но и непосредственно в сенсорных клетках (McGann, 2015). При этом конкретные механизмы реализации структурной пластичности сенсорного входа до сих пор слабо изучены. В данной работе на модели ассоциативного ольфакторного обучения были проведены исследования функциональных изменений в обонятельных нейронах мыши, индуцированных кондиционированием с помощью запахового стимула.

В состав обонятельного эпителия входят три вида клеток: опорные, обонятельные рецепторные и базальные. Базальные клетки являются стволовыми и способны делиться и дифференцироваться как в опорные, так и в рецепторные обонятельные клетки (Moulton, Beidler, 1967; Schwob et al., 1995). Опорные клетки несут функции изоляции рецепторных клеток, выработки мукополисахаридов (Getchell, 1986). Рецепторные клетки представляют собой биполярные нейросенсорные клетки, расположенные между опорными и базальными клетками, аксоны которых идут из носовой полости в мозг через решетчатую кость и образуют синапсы с митральными клетками в гломерулярном слое обонятельной луковицы (ОЛ).

Обонятельная информация первоначально представляется паттернами нейронной активности нейронов ольфакторного эпителия (ОЭ) – обширной и функционально разнообразной популяции возбудимых клеток с рецепторами запаховых стимулов на поверхности, которых у мышей около 1300 типов (Zhang, Firestein, 2002). В каждом нейроне ОЭ экспрессируется какой-то один тип ольфакторного рецептора (ОР). Нейроны с одинаковым типом ОР на поверхности, несмотря на то, что равномерно распределены по носовой полости, иннервируют одну и ту же гломерулу в ОЛ. Таким образом, сенсорные нейроны представляют обонятельную информацию в мозг в форме стимул-специфичных комбинаций входных сигналов к клубочкам ОЛ. Эти паттерны гломерулярного ввода служат основой для всей последующей обработки обонятельной информации (Carey et al., 2009).

Магнитно-резонансная томография (МРТ) включает в себя целый ряд методов, которые позволяют исследовать не только морфологию различных структур, но и динамику разных процессов. Один из функциональных методов на основе ядерного магнитного резонанса – марганец-усиленная МРТ (МУ МРТ). Ионы Mn^{2+} являются агонистами потенциал-зависимых кальциевых каналов

и через них способны проникать внутрь клетки (Aoki et al., 2004). Благодаря этому свойству ионов марганца, возможно применять МУ МРТ для оценки функциональной активности нейронов, в частности ольфакторных (Pautler, Koretsky, 2002). Поскольку марганец является парамагнетиком, ионы марганца (II) способны сокращать время спин-решетчатой релаксации протонов в постоянном магнитном поле при воздействии радиочастотной последовательности (T1 релаксация), т.е. могут выступать в качестве позитивного МРТ-контраста. Поэтому с помощью МРТ можно оценивать накопление Mn^{2+} в исследуемой ткани. В первом приближении уровень активности клеток ткани в ответ на стимул будет прямо пропорционален уровню МРТ-сигнала, который зависит от уровня активности кальциевых каналов. Данный метод не требует использования наркоза и напрямую отражает активность Ca^{2+} -каналов. Кроме того, он позволяет *in vivo* оценивать скорость аксонального транспорта (Smith et al., 2007).

Таким образом, цель настоящей работы состояла в том, чтобы исследовать роль сенсорной пластичности в формировании ольфакторной памяти. Для этого *in situ* мы провели оценку влияния ассоциативного кондиционирования на функциональную активность нейронов ОЭ в ответ на условный запаховый стимул методом МУ МРТ.

Материалы и методы

Животные. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Эксперименты поставлены на самцах мышей SPF-статуса инбредной линии BALB/C в возрасте 8–10 нед. (25–28 г). После отсадки в трехнедельном возрасте и до исследования мышей содержали группами по пять особей одного пола в стандартных клетках ($35 \times 25 \times 12$ см) при температуре $22\text{--}24^\circ\text{C}$ и искусственном световом режиме 14С:10Т. Брикетированный корм («Чара», Павловский Посад) и воду до начала обучения мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала использовали обеспыленные древесные опилки. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с биоэтическими нормами (Протокол биоэтической комиссии № 16-02-020 от 15.08.2016).

Ольфакторное обучение проводили, используя в качестве индифферентного запахового стимула апельсиновое масло (1 % водный раствор). В процессе обучения животных содержали в условиях ограниченного доступа к корму. Предоставление гранул еды служило подкрепляющим стимулом. Исходная выборка была разделена на три группы: животные, у которых предоставление еды было совмещено с воздействием запаховым стимулом (стимул с кондиционированием, СК+, $n = 6$); животные, у которых предоставление еды и запахового стимула были разнесены на 30 мин во времени (стимул без кондиционирования, СК–, $n = 6$); контрольная группа, которым запаховый стимул не предъявлялся, как и в других группах, животные получали корм два раза в день (Контроль, $n = 6$). В процессе обучения клетку в течение 2 мин продували воздухом, содержащим запах апельсинового масла, по окончании чего животное получало гранулы корма. Обучение проводили 2 раза в сутки в течение

14 дней, при этом животных содержали индивидуально. Для подачи стимула использовали ольфактомер следующей конструкции: воздушный насос (Barbus SB-348A) с помощью силиконового шланга и пластикового носика на 1 мл соединялся с закрытой клеткой, в которой находилась тестируемая особь. В пластиковый носик, вставленный в отверстие для поилки в крышке клетки, помещали кусок фильтровальной бумаги (0.5×2 см), на которую наносили 20 мкл 1 % апельсинового масла. Во время предъявления запахового стимула носик от автопипетки продували воздухом со скоростью 200 мл/мин.

Ольфакторный тест. Поведенческое тестирование проводили через двое суток после МРТ-сканирования и наркотизации. На две противоположные стенки клетки, в которой содержалось животное, прикрепляли с помощью скотча два куса фильтровальной бумаги (2×2 см). Далее тестируемому животному давали свободно перемещаться по клетке в течение 5 мин, после чего, не вынимая мышь из клетки, на фильтровальную бумагу наносили 20 мкл раствора апельсинового масла или дистиллированной воды (рис. 1, б). Затем в течение 3 мин с помощью цифровой камеры регистрировали поведение животного. Для оценки поведенческого ответа животного на предоставляемые запаховые стимулы на полученных видеозаписях подсчитывали время обнюхивания каждого куса фильтровальной бумаги и время исследования кормушки. Обнюхиванием считалось вставание на задние лапки рядом с запаховым стимулом (см. рис. 1, б).

Марганец-усиленная МРТ. При исследовании активности нейронов ОЭ мышей в ответ на предъявление запахового стимула методом МУ МРТ критерием оценки выступал уровень МРТ-сигнала в гломерулярном слое основной ОЛ, который зависел от локальной концентрации марганца. Исходя из наших экспериментов и данных литературы, накопление ионов марганца (Mn^{2+}) в нейронах основной ОЛ высокостатистически коррелирует с уровнем активности кальциевых каналов клеток обонятельного эпителия (Aoki et al., 2004). Локальную концентрацию Mn^{2+} в гломерулярном слое ОЛ выражали как отношение уровня МРТ-сигнала в исследуемых областях к уровню МРТ-сигнала в референсе, которым служила микропипетка с фосфатным буфером (0.5 мл), помещенная вдоль головы мыши. МРТ-сканирование проводили через 2 ч после предъявления запахового стимула.

Для оценки паттернов активации нейронов ОЭ в ответ на запаховый стимул, мышам интраназально вводили 10 мкл 10 мМ раствора хлорида марганца, после чего животное помещали обратно в клетку и давали запаховый стимул сериями по 4 мин (1 мин стимул ON + 3 мин стимул OFF). Каждый запах экспонировался 4 раза. Чтобы снизить концентрацию стимула и предотвратить сенситизацию нейронов ОЭ, между предоставлениями клетку, в которой животное содержалось не менее суток до начала эксперимента, продували чистым воздухом. При каждом предъявлении использовали новый кусок фильтровальной бумаги с нанесенным на него тестируемым веществом.

Накопление ионов марганца в ОЛ мыши было исследовано с помощью магнитно-резонансной томографии на сверхвысокопольном томографе BioSpec 117/16 USR (Bruker, Германия) – 11.7 Тл.

За 3 мин до исследования мышей обездвигивали газовой смесью (4 %) изофлюрана (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., США) и воздуха при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Мальта). Температуру животных поддерживали с помощью водного контура в томографическом столике-кроватьке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., США), что позволяло контролировать глубину наркоза.

Информация о распределении ионов марганца в пределах обонятельной луковицы мыши была получена с помощью T1-взвешенных изображений с использованием метода RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement). Параметры импульсной последовательности метода: TE = 10 мс, TR = 400 мс. Параметры изображения: размер 1.8×1.8 см; матрица 256×256 точек; толщина среза 0.5 мм; размеры вокселя $75 \mu m \times 75 \mu m \times 0.5$ мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 9; ориентация срезов коронарная. Общее время сканирования составляло 7 мин.

Предварительную обработку МРТ-сканов выполняли в программе ImageJ. Обработка состояла из нескольких этапов: выравнивание изображений по горизонтали, выделение границ мозга мыши, изменение размеров изображения. Выравнивание геометрии и размеров мозга позволило сравнить уровень МРТ-сигнала в отдельных областях основной ОЛ у разных особей. Для анализа полученных результатов глобулярный слой обонятельных луковиц на каждом срезе был условно разделен на 12 областей. Всего на ОЛ приходилось пять срезов. Таким образом, исходное разрешение МРТ-скана было уменьшено до $250 \mu m \times 250 \mu m \times 0.5$ мм. В пределах этих 12 областей уровень МРТ-сигнала усреднялся, после чего проводили различные межгрупповые сравнения и, таким образом, оценивали изменения нейрональной активности в ответ на запаховый стимул. Далее для визуализации полученных результатов использовали двухмерную «карту» ольфакторной луковицы, где по оси абсцисс располагали номер области (1–12), а по оси ординат – номер среза (1–5), с помощью псевдоокрашивания кодировали значение *t*-критерия Стьюдента, характеризующего достоверность отличий двух групп по накоплению контраста в данной зоне ОЛ.

Статистика. Для оценки взаимосвязи двух паттернов активации ОЭ использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмана, для множественных сравнений средних – LSD-тест (Least Significant Difference). Данные выражали как среднее $\pm$ SE.

Результаты

Поведенческий ответ мышей на условный запаховый стимул

Для исследования роли сенсорной пластичности в реализации механизмов ольфакторной памяти мы на первом этапе провели оценку формирования поведенческой реакции на условный запаховый стимул в процессе обучения. Поскольку применяемая нами схема предполагала использование в качестве положительного подкрепления

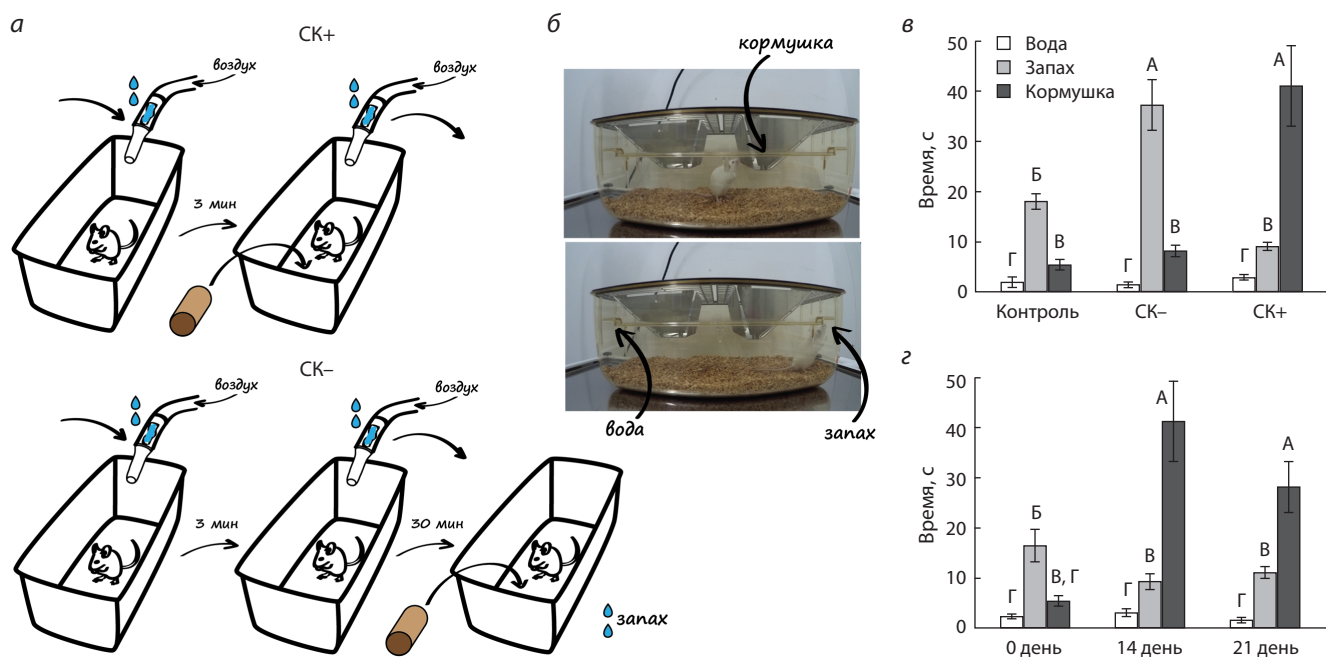


Рис. 1. Влияние ассоциативного обучения на поведенческий ответ особи на индифферентный запаховый стимул.

а – схема обучения: условное кондиционирование (верхняя схема, СК+) проводили, продувая клетку с животным с помощью воздушного потока (250 мл/мин), в который подмешивали запаховый стимул (20 мкл 1 % апельсинового масла, нанесенного на кусок фильтровальной бумаги), в течение 3 мин, после чего предоставляли корм; кондиционирование без подкрепления (нижняя схема, СК-) проводили так же, как в группе СК+, но еду предоставляли не по окончании экспозиции запаха апельсина, а через 30 мин; **б** – обонятельный тест: животное обнюхивает источник запаха (сверху), мышь исследует кормушку (снизу). Стимул наносили на фильтровальную бумагу, прикрепленную к стенке клетки. На противоположной стенке прикрепляли кусок фильтровальной бумаги того же размера, на который наносили растворитель; **в** – распределение времени обнюхивания фильтровальной бумаги с дистиллированной водой/запахом апельсина и времени исследования кормушки у животных разных групп, группа СК+ исследована на 14-е сутки обучения; **2** – динамика изменения поведенческого ответа на условный запаховый стимул (апельсиновое масло) животных группы СК+. Приведены параметры поведенческого ответа особей СК+ перед началом эксперимента (0 неделя) и после окончания обучения (14 дней и 21 день). *а-2* – достоверные отличия по LSD-тесту ($p < 0.05$).

предоставление еды животным, содержащимся в условиях с ограниченным доступом к корму (см. рис. 1, *а*), то в качестве критериев поведенческого ответа на условный стимул мы рассматривали время обнюхивания особью источника запаха или фильтровальной бумаги с водой и время, проведенное ей рядом с кормушкой (см. рис. 1, *б*). Исходя из полученных результатов, только в группе СК+ через 14 дней после начала эксперимента наблюдалось достоверное увеличение времени исследования кормушки при предъявлении запаха апельсинового масла, при этом время обнюхивания источника стимула статистически значимо снижалось по сравнению как с мышами группы СК-, так и с контрольными животными (см. рис. 1, *в*). Этот эффект сохранялся по меньшей мере в течение недели после окончания обучения, что свидетельствует о стабильности сформированной поведенческой реакции на условный запаховый стимул (см. рис. 1, *2*). Мыши группы СК- достоверно больше времени тратили на обнюхивание запахового стимула в обонятельном тесте по сравнению с особями контрольной и СК+ групп (см. рис. 1, *в*).

Исследование активности нейронов обонятельного эпителия мышей в ответ на условный запаховый стимул

В настоящей работе для оценки изменения активности нейронов ОЭ была использована МУ МРТ. Данный метод позволяет оценить накопление в ткани ионов марганца,

которые являются агонистами кальциевых каналов. Кроме того, показано, что перемещение марганца по внутриклеточному пространству происходит за счет аксонального транспорта, что позволяет исследовать данный процесс с помощью МУ МРТ (Smith et al., 2007). Таким образом, интенсивность и скорость накопления марганца в ткани дают возможность охарактеризовать различные аспекты нейрональной активности.

Процесс обработки получаемых Т1-взвешенных МРТ-изображений схематично представлен на рис. 2, *а*. На каждом скане ОЛ условно выделены 12 зон, в пределах которых усредняли МРТ-сигнал, всего луковица была видна на пяти срезах. Таким образом, всю луковицу разделяли на 60 зон, по которым проводили межгрупповые сравнения, визуализировавшиеся в виде «тепловых» карт (рис. 2 и 3).

Исходя из полученных результатов, во всех трех исследуемых группах накопление марганца в глобулярном слое ОЛ мыши при предъявлении запаха апельсинового масла достоверно отличалось от распределения МРТ-сигнала в ОЛ без запаха, что свидетельствует о наличии реакции ОЭ животных на данный стимул (см. рис. 2, *б*, верхний ряд). При этом паттерны накопления Mn^{2+} в ОЛ в ответ на условный стимул высокостатистически коррелировали во всех экспериментальных группах. Дальнейший анализ показал наличие достоверных отличий в зональном распределении МРТ-сигнала в ОЛ при межгрупповых сравнении

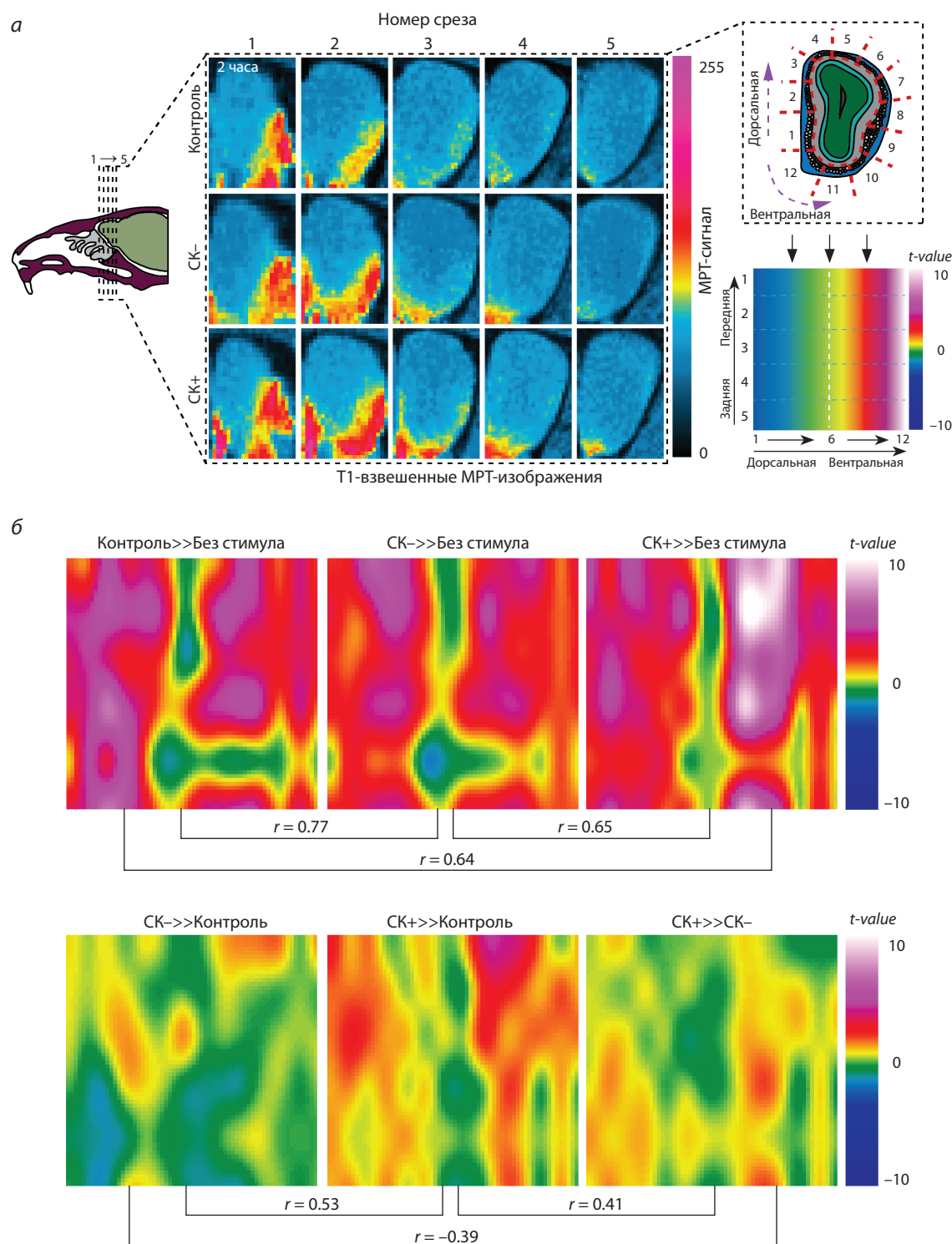


Рис. 2. Влияние ассоциативного обучения на паттерны накопления ионов марганца в обонятельных луковицах мышей в ответ на предъявление запаха апельсинового масла.

a – схема обработки T1-взвешенных MPT-срезов и генерации «тепловых» карт. Сканы ОЛ мышей различных экспериментальных групп сделаны через 2 ч после предоставления апельсинового масла и интраназальной аппликации хлорида марганца. На T1-взвешенных срезах с помощью псевдоокрашивания обозначены паттерны и интенсивность накопления контраста в ОЛ мышей в ответ на экспозицию запаха апельсинового масла. Красная штриховая линия на схеме обозначает границы каждой из 12 зон глобулярного слоя на срезе; **б** – влияние кондиционирования со стимулом/без стимула на паттерны накопления ионов марганца в различных ОЛ самцов BALB/C в ответ на предъявление запаха апельсинового масла. Псевдоокрашивание отражает достоверность увеличения ($t > 0$) или уменьшения ($t < 0$) уровня MPT-сигнала в различных отделах ОЛ в ответ на ольфакторный стимул по сравнению с особями, которым в нос вводили только ионы марганца, без запаха (верхний ряд). В нижнем ряду представлены «тепловые» карты, полученные в результате межгрупповых сравнений.

Здесь и на рис. 3 и 4 представлены коэффициенты корреляции (r) паттернов распределения марганца в ОЛ. >> – t -критерий > 0 , если накопление контраста в данной области ОЛ у животных группы слева от знака выше, чем у особей правой группы, и t -критерий < 0 , если наоборот.

ях. В группах СК+ и СК– достоверно большее количество марганца накапливалось в областях передней части ОЛ по сравнению с контролем. У животных группы СК+ по сравнению с контролем и СК– также достоверно возрастает уровень МРТ-сигнала в зонах задней части ОЛ (см. рис. 2, б, нижний ряд). Мыши группы СК– достоверно не отличаются от группы СК+ по уровню МРТ-сигнала в зонах передней части ОЛ и от контрольных животных по аккумуляции марганца в гломерулярном слое задней части ОЛ (см. рис. 2, б). Поэтому паттерны, полученные в результате межгрупповых сравнений СК+>>контроль и СК+>>СК–, находятся в обратной зависимости друг от друга (см. рис. 2).

Для интерпретации полученных результатов мы оценили распределение ионов марганца в ОЛ у контрольных животных, которым предоставляли запах апельсинового масла в 4 раза большей (АМ×4) и в 4 раза меньшей (АМ/4) концентрации относительно использованной при условном кондиционировании (см. рис. 3). Группы СК+ и АМ×4 достоверно не отличаются по распределению МРТ-сигнала в глобулярном слое ОЛ. Паттерны, полученные при сравнении групп СК+ и АМ×4 с группами СК– и АМ/4, высокодостоверно коррелируют друг с другом (см. рис. 3). При сравнении распределения контраста в ОЛ через 12 ч после экспозиции условного запаха и введения $MnCl_2$ достоверных различий между экспериментальными группами обнаружено не было (рис. 4).

Обсуждение

Центральная нервная система способна быстро устанавливать связь между конкретными стимулами и последующими аверсивными и аттрактивными событиями. Считается, что обучение включает установление ассоциаций между нейтральными и эмоциональными стимулами в областях коры головного мозга и лимбической системы мозга. На сегодняшний день имеются свидетельства стимул-специфичных структурно-функциональных изменений уже на уровне сенсорных клеток в процессе ассоциативного обучения. В частности, в статье (Jones et al., 2008) показано, что после трех недель ассоциа-

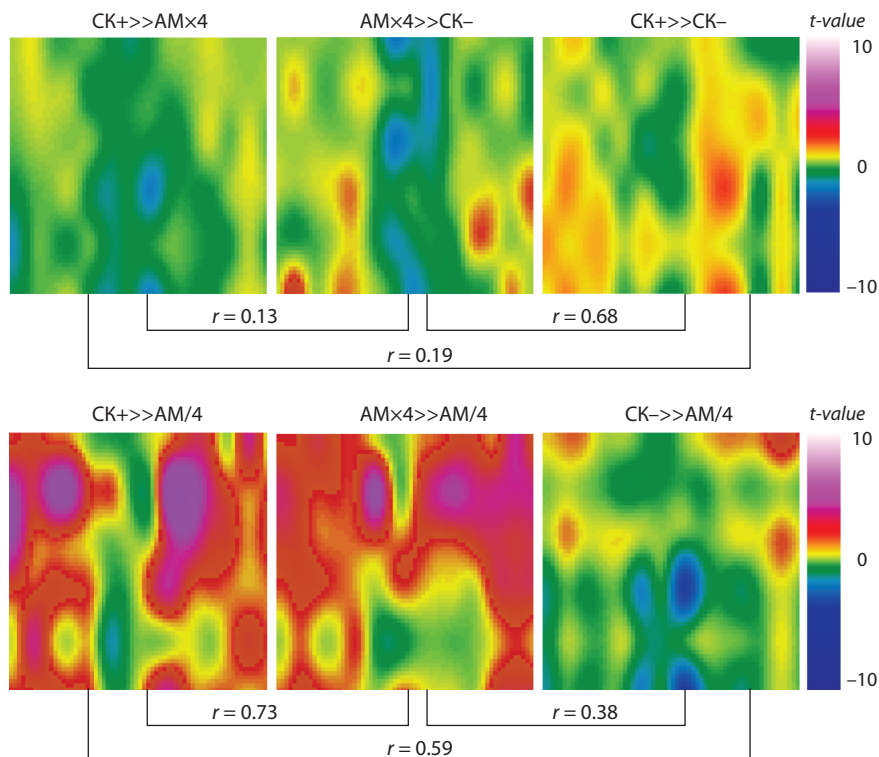


Рис. 3. Влияние концентрации запаха апельсинового масла на паттерны накопления марганца в ОЛ мышей.

Псевдоокрашивание на «тепловых» картах отражает достоверность увеличения ($t > 0$) или уменьшения ($t < 0$) интенсивности накопления контраста в различных отделах ОЛ в ответ на ольфакторный стимул у животных групп СК+ и СК– относительно особей, которым предоставляли запах апельсинового масла в 4 раза большей (АМ×4) или в 4 раза меньшей (АМ/4) концентрации по сравнению с использованной в процессе кондиционирования.

тивного кондиционирования с использованием ацетофенона в качестве условного запахового стимула у мышей увеличивается количество нейронов в ОЭ, экспрессирующих рецептор M71, наиболее интенсивно реагирующий на ацетофенон. В работе (Kass et al., 2013) ассоциативное кондиционирование с помощью ацетофенона уже через три дня вызывало увеличение количества нейромедиатора, выделяемого обонятельными нейронами, экспрессирующими рецептор M71, в ответ на условный стимул. Наличие сенсорной пластичности было продемонстрировано для рецепторных нейронов слуховой (Polley et al., 2004; Bieszczad, Weinberger, 2012; Zhang et al., 2013) и зрительной систем (Headley, Weinberger, 2013).

В нашем исследовании мы наблюдали изменение нейрональной активности обонятельных нейронов ОЭ в процессе ассоциативного ольфакторного обучения в ответ на индифферентный запаховый стимул. Как было показано в поведенческих экспериментах, использованная нами схема обучения приводила к формированию у мышей специфического поведенческого ответа на условный стимул. Далее с помощью МУ МРТ мы охарактеризовали параметры нейрональной активности у животных, подвергавшихся и не подвергавшихся ассоциативному кондиционированию. Обучение животных, содержащихся в условиях ограниченного доступа к пище, с использованием в качестве позитивного подкрепления предоставления корма, привело как к достоверному увеличению интенсивности, так и к изменению паттернов накопления марганца в глобулярном слое ОЛ по сравнению с контрольной группой и группой особей, которым стимул давали без подкрепления.

Ранее отмечалось также, что ассоциативное обучение увеличивает чувствительность особи к условному запаховому стимулу (McGann, 2015). Механизм этого феномена до сих пор до конца не ясен: увеличивается ли чувствительность ольфакторных нейронов (Kass et al., 2013), или возрастает их количество

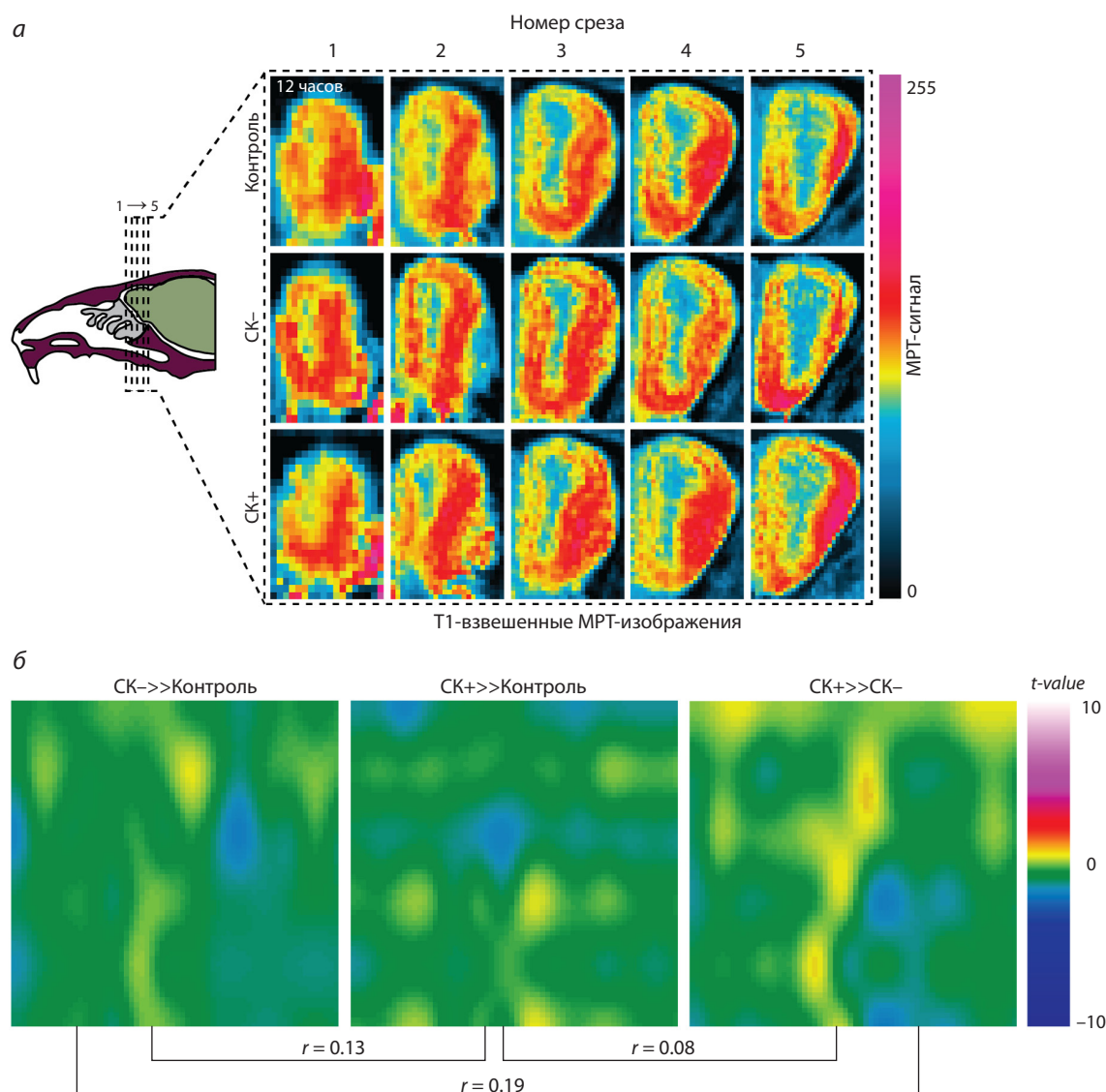


Рис. 4. Сравнение паттернов распределения ионов марганца в ОЛ мышей через 12 ч после экспозиции запаха апельсинового масла.

а – примеры T1-взвешенных МРТ-срезов обонятельной луковицы мышей различных экспериментальных групп, сделанных через 12 ч после предоставления апельсинового масла и интраназальной аппликации хлорида марганца; *б* – псевдоокрашивание отражает достоверность увеличения ($t > 0$) или уменьшения ($t < 0$) интенсивности накопления контраста в различных отделах ОЛ в ответ на ольфакторный стимул.

(Jones et al., 2008). Если бы за счет нейрогенеза увеличилось количество обонятельных нейронов, реагирующих на условный стимул, возросло бы и максимальное накопление МРТ-сигнала (через 12 ч после введения (Aoki et al., 2004)) в специфических зонах ОЛ. В нашей работе мы показали, что достоверные различия в интенсивности накопления марганца в различных зонах ОЛ между обученными и контрольными животными наблюдаются через 2 ч (но не через 12 ч) после экспозиции стимула и введения контраста. Кроме того, отсутствие различий в активности ОЭ животных группы CK+ и контрольных особей, которым предъявляли запах апельсинового масла в большей относительно использованной при кондиционировании концентрации, свидетельствует об увеличении чувствительности нейронов ОЭ к индифферентному стимулу в процессе обучения.

Некоторые авторы сообщают, что кондиционирование с подкреплением увеличивает интенсивность электрической активности в ответ на индифферентный стимул по сравнению с контролем, что соотносится с полученными нами результатами (Kass et al., 2013; Abraham et al., 2014). Поскольку марганец является агонистом кальциевых каналов и проникает во внутриклеточное пространство при их активации, можно заключить, что их активность в ответ на предъявление условного стимула в процессе обучения не меняется. Изменяется при этом скорость транспорта контраста из носовой полости в ОЛ. Учитывая значимый вклад аксонального транспорта в процесс внутриклеточной логистики Mn^{2+} (Pautler, 2004; Smith et al., 2007), можно заключить, что ассоциативное обучение, в частности, приводит к интенсификации метаболизма в ответ на условный стимул. Это может быть обусловлено

выделением большого количества нейротрансмиттера, что подтверждается рядом исследований (Kass et al., 2013).

Итак, в данной работе нам удалось *in situ* продемонстрировать, что, во-первых, ассоциативное обучение стимул-специфично влияет на уровень нейрональной активности рецепторных клеток ОЭ, из чего следует, что формирование ольфакторной памяти начинается не с подкорковых структур ЦНС, а на этапе рецепции запахового стимула; а во-вторых, в процессе положительного пищевого кондиционирования возрастает чувствительность ОЭ в ответ на предоставление условного ольфакторного стимула, что говорит об увеличении адаптивной значимости данного запаха. Оба эти феномена являются частью приспособительной стратегии животного к изменяющимся условиям среды.

Благодарности

В работе использованы материалы, полученные при выполнении государственного задания ИВТ СО РАН IV.35.2.6 и гранта РФФИ № 17-04-01440. Исследования выполнены с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Abraham N.M., Vincis R., Lagier S., Rodriguez I., Carleton A. Long term functional plasticity of sensory inputs mediated by olfactory learning. *Elife*. 2014;(3):e02109. DOI 10.7554/eLife.02109.
- Aoki I., Wu Y.J.L., Silva A.C., Lynch R.M., Koretsky A.P. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*. 2004;22(3):1046-1059. DOI 10.1016/j.neuroimage.2004.03.031.
- Bieszcza K.M., Weinberger N.M. Extinction reveals that primary sensory cortex predicts reinforcement outcome. *Eur. J. Neurosci*. 2012; 35(4):598-613. DOI 10.1111/j.1460-9568.2011.07974.x.
- Carey R.M., Verhagen J.V., Wesson D.W., Pirez N., Wachowiak M. Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J. Neurophysiol*. 2009;101(2):1073-1088. DOI 10.1152/jn.90902.2008.
- Gao E., Suga N. Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: role of the corticofugal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(14):8081-8086. DOI 10.1073/pnas.97.14.8081.
- Getchell T.V. Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. *Physiol. Rev*. 1986;66(3):772-818. DOI 10.1152/physrev.1986.66.3.772.
- Headley D.B., Weinberger N.M. Relational associative learning induces cross-modal plasticity in early visual cortex. *Cerebral Cortex*. 2013;25(5):1306-1318. DOI 10.1093/cercor/bht325.
- Jones S.V., Choi D.C., Davis M., Ressler K.J. Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. *J. Neurosci*. 2008; 28(49):13106-13111. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4465-08.2008.
- Kass M.D., Rosenthal M.C., Pottackal J., McGann J.P. Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. *Science*. 2013;342(6164):1389-1392. DOI 10.1126/science.1244916.
- McGann J.P. Associative learning and sensory neuroplasticity: how does it happen and what is it good for? *Learn. Mem*. 2015;22(11):567-576. DOI 10.1101/lm.039636.115.
- Moulton D.G., Beidler L.M. Structure and function in the peripheral olfactory system. *Physiol. Rev*. 1967;47(1):1-52. DOI 10.1152/physrev.1967.47.1.1.
- Pautler R.G. *In vivo*, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed*. 2004;17(8):595-601. DOI 10.1002/nbm.942.
- Pautler R.G., Koretsky A.P. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2002;16(2):441-448.
- Polley D.B., Heiser M.A., Blake D.T., Schreine C.E., Merzenich M.M. Associative learning shapes the neural code for stimulus magnitude in primary auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(46):16351-16356. DOI 10.1073/pnas.0407586101.
- Schwob J.E., Youngentob S.L., Mezza R.C. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol*. 1995;359(1):15-37. DOI 10.1002/cne.903590103.
- Smith K.D.B., Kallhoff V., Zheng H., Pautler R.G. *In vivo* axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2007;35(4):1401-1408. DOI 10.1016/j.neuroimage.2007.01.046.
- Weinberger N.M. Reconceptualizing the Primary Auditory Cortex: Learning, Memory and Specific Plasticity. In: Winer J.A., Schreiner C.E. (Eds.). *The Auditory Cortex*. N. Y.: Springer, 2011;465-491. DOI 10.1007/978-1-4419-0074-6_22.
- Zhang X., Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci*. 2002;5(2):124-133. DOI 10.1038/nm800.
- Zhang Y., Zhao Y., Zhu X., Sun X., Zhou X. Refining cortical representation of sound azimuths by auditory discrimination training. *J. Neurosci*. 2013;33(23):9693-9698. DOI 10.1523/JNEUROSCI.0158-13.2013.

ORCID ID

A.V. Romashchenko orcid.org/0000-0002-0674-0574
T.A. Zapara orcid.org/0000-0002-8144-9090
A.S. Ratunshnyak orcid.org/0000-0001-5198-8926