ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 18
4/3
Декабрь 2014

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 18
4/3
December 2014

«Вавиловский журнал генетики и селекции» / «Vavilov Journal of Genetics and Breeding» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС» / «The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists».

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (по биологическим наукам).
(Редакция 17 июня 2011 г.: http://vak.ed.gov.ru)

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен в федеральный почтовый Объединенный каталог «ПРЕССА РОССИИ».
Персональный подписной индекс № 42153.

Адрес редакции:
«Вавиловский журнал генетики и селекции»,
ИЦиГ СО РАН,
Проспект Академика Лаврентьева, 10,
Новосибирск, 630090

Факс: (383) 3331278
e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Ответственный секретарь редакции:
С.В. Зубова,
тел. 363-4977 *5415

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2014
© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014
© Сибирское отделение Российской академии наук, 2014

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 18
4/3
Декабрь 2014

Содержание

И.Е. Пристяжнюк, Т.А. Шнайдер, В.С. Фишман, Н.М. Матвеева, О.Л. Серов

ПРЯМАЯ КОНВЕРСИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ 1055

А.Г. Мензоров

ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ 1067

С.Н. Речкунов, А.В. Принц, В.А. Селезнев, С.В. Голод, Р.А. Соотс, А.И. Иванов, А.С. Ратушняк, В.Я. Принц

НЕЙРОИНТЕРФЕЙСЫ: ОБЗОР, РАЗРАБОТКА 1077

Т.А. Запара, С.О. Вечкапова, А.Л. Проскура, А.С. Ратушняк

СИНЕРГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ИОНОВ МАГНИЯ И АМИДА ЛАМБЕРТИАНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НМДА ТИПА ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА 1090

Т.В. Козырева, И.П. Воронова

ВОВЛЕЧЕНИЕ НЕЙРОГЕНОМНОГО УРОВНЯ РЕГУЛЯЦИИ В ПРОЦЕССЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА ОРГАНИЗМА НА ХОЛОДЕ 1100

А.С. Цыбко, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко

ВЛИЯНИЕ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (GDNF) НА УРОВЕНЬ мРНК ГЕНОВ АПОПТОЗА Bax И Bcl-xl В МОЗГЕ МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ПАТОЛОГИЧЕСКОМУ ПОВЕДЕНИЮ 1110

Г.Т. Шишкина, Т.С. Калинина, В.В. Булыгина, Е.В. Баблюк, Н.Н. Дыгало

ЭКСПРЕССИЯ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 И Bcl-xl В МОЗГЕ КРЫС ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ И ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ 1117

Н.Н. Дыгало, М.Ю. Степаничев, Н.В. Гуляева, Г.Т. Шишкина

ЭКСПРЕССИЯ В МОЗГЕ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОЯВЛЕНИЯМИ ДЕПРЕССИИ 1124

Н.Н. Кудрявцева, А.Л. Маркель, Ю.Л. Орлов

АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ: ГЕНЕТИКО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ 1133

Н.И. Путинцев, О.В. Вишневский, Е.Е. Витяев

РАЗРАБОТКА ИСКУССТВЕННЫХ КОГНИТИВНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МОДЕЛЕЙ МОЗГА ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ 1156

Е.Е. Витяев

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОСТЬ КАК ПРИНЦИП РАБОТЫ МОЗГА 1172

Н.И. Путинцев, О.В. Исупов, Е.Е. Витяев

АДАПТИВНАЯ СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ МОБИЛЬНЫМ АГЕНТОМ В ФИЗИЧЕСКОЙ СРЕДЕ, ОСНОВАННАЯ НА ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ 1184

О.В. Вишневский, Н.И. Путинцев, Т.А. Запара, А.С. Ратушняк

АНАЛИЗ КОГНИТИВНЫХ СВОЙСТВ НЕЙРОННЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ..... 1195

А.Л. Проскура, С.О. Вечкапова, Т.А. Запара, А.С. Ратушняк

РЕКОНСТРУКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИНТЕРАКТОМА В СИСТЕМЕ ГЛУТАМАТНЫХ СИНАПСОВ 1205

М.П. Пономаренко, В.В. Суслов, К.В. Гунбин, П.М. Пономаренко, О.В. Вишневский, Н.А. Колчанов

ВЫЯВЛЕНИЕ СВЯЗИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА СО СРОДСТВОМ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА К ПРОМОТОРАМ ЭТИХ ГЕНОВ 1219

П.Н. Меньшанов, Н.Н. Дыгало

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАРТИРОВАНИЯ РИДОВ И СБОРКИ ТРАНСКРИПТОМА ДЛЯ ТКАНЕЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ *RATTUS NORVEGICUS* 1231

А.Ю. Пальянов, С.С. Хайрулин

SIBERNETIC: ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС НА БАЗЕ АЛГОРИТМА PCI SPH, ОРИЕНТИРОВАННЫЙ НА ЗАДАЧИ МОДЕЛИРОВАНИЯ В ОБЛАСТИ БИОМЕХАНИКИ ЖИВЫХ СИСТЕМ 1239

А.Ю. Пальянов, А.С. Ратушняк

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СИГНАЛОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ *C. ELEGANS* 1248

Н.С. Юдин, Т.М. Мишакова, Е.В. Игнатьева, В.Н. Максимов, В.В. Гафаров, С.К. Малютина, М.И. Воевода

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *DRD4* С НЕКОТОРЫМИ ФАКТОРАМИ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 1259

А.Н. Савостьянов, В.С. Науменко, Н.А. Синякова, М.Н. Львова, Е.А. Левин, М.С. Залешин, У.Н. Кавай-оол, В.А. Мордвинов, Н.А. Колчанов, Л.И. Афтанас

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ТРЕВОЖНОСТИ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНА СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА У РУССКИХ И ТУВИНЦЕВ 1268

Е.Д. Петровский, А.Н. Савостьянов, А.А. Савелов, В.С. Науменко, Н.А. Синякова, Е.А. Левин, С.С. Таможников, А.А. Тулупов, В.А. Мордвинов, Н.А. Колчанов, Л.И. Афтанас

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА АЛЛЕЛЕЙ СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА НА ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОЗГОВОЙ ГЕМОДИНАМИКИ У ЛЮДЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАРАДИГМЫ «СТОП-СИГНАЛ» 1281

С.А. Лашин, Е.А. Мамонтова, Ю.Г. Матушкин, Н.А. Колчанов

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ СОЦИАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ И ДИНАМИКИ ПОВЕДЕНИЯ 1289

В.А. Соколов

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВЛАДИМИРА АЛЕКСАНДРОВИЧА СТРУННИКОВА 1299

80 ЛЕТ АКАДЕМИКУ РАН СЕРГЕЮ ВАСИЛЬЕВИЧУ ШЕСТАКОВУ 1303

VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 18
4/3
December 2014

Content

I.E. Pristyazhnyuk, T.A. Shnayder, V.S. Fishman, N.M. Matveeva, O.L. Serov

DIRECT CONVERSION OF SOMATIC CELLS TO NEURONAL PRECURSORS: PROBLEMS AND OUTLOOKS 1055

A.G. Menzorov

DERIVATION OF NEURONS FOR CELL THERAPY 1067

S.N. Rechkunov, A.V. Prinz, V.A. Seleznev, S.V. Golod, R.A. Soots, A.I. Ivanov, A.S. Ratushnyak, V.Ya. Prinz

NEUROINTERFACES: REVIEW AND DEVELOPMENT 1077

T.A. Zapara, S.O. Vechkapova, A.L. Proskura, A.S. Ratushnyak

SYNERGISTIC EFFECT OF MAGNESIUM IONS AND LAMBERTIANIC ACID AMIDE IN THE REGULATION OF GLUTAMATE RECEPTORS OF NMDA-TYPE IN PYRAMIDAL NEURONS OF THE HIPPOCAMPUS 1090

T.V. Kozyreva, I.P. Voronova

INVOLVEMENT OF NEUROGENOMIC REGULATION IN THE MAINTENANCE OF TEMPERATURE HOMEOSTASIS IN THE COLD 1100

A.S. Tsybko, T.V. Il'chibaeva, V.S. Naumenko

THE EFFECT OF GLIAL CELL-LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF) ON mRNA LEVEL OF APOPTOTIC GENES Bax AND Bcl-xl IN BRAIN OF MICE GENETICALLY PREDISPOSED TO PATHOLOGICAL BEHAVIOR 1110

G.T. Shishkina, T.S. Kalinina, V.V. Bulygina, E.V. Babljuk, N.N. Dygalo

TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 AND Bcl-xl IN THE RAT RAPHE NUCLEUS AFTER ACUTE AND CHRONIC FORCED SWIM STRESS 1117

N.N. Dygalo, M.Yu. Stepanichev, N.V. Gulyaeva, G.T. Shishkina

DEPRESSION-RELATED GENE EXPRESSION IN THE BRAIN 1124

N.N. Kudryavtseva, A.L. Markel, Yu.L. Orlov

AGGRESSIVE BEHAVIOR: GENETIC AND PHYSIOLOGICAL MECHANISMS 1133

N.I. Putincev, O.V. Vishnevsky, E.E. Vityaev

DEVELOPMENT OF ARTIFICIAL COGNITIVE SYSTEMS BASED ON MODELS OF THE BRAIN OF LIVING ORGANISMS 1156

E.E. Vityaev

PURPOSEFULNESS AS THE PRINCIPLE OF BRAIN ACTIVITY AND FUNCTIONAL SYSTEMS THEORY .. 1172

N.I. Putintsev, O.V. Isupov, E.E. Vityaev

ADAPTIVE CONTROL SYSTEM FOR A MOBILE AGENT IN PHYSICAL ENVIRONMENT BASED ON THE FUNCTIONAL SYSTEMS THEORY 1184

O.V. Vishnevsky, N.I. Putincev, T.A. Zapara, A.S. Ratushnyak

ANALYSIS OF THE COGNITIVE PROPERTIES OF NEURAL SYSTEMS BASED ON BIOFEEDBACK 1195

A.L. Proskura, S.O. Vechkapova, T.A. Zapara, A.S. Ratushnyak

RECONSTRUCTION OF THE MOLECULAR INTERACTOME IN THE SYSTEM OF GLUTAMATERGIC SYNAPSES 1205

M.P. Ponomarenko, V.V. Suslov, K.V. Gunbin, P.M. Ponomarenko, O.V. Vishnevsky, N.A. Kolchanov

IDENTIFICATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE VARIABILITY OF THE EXPRESSION OF SIGNALING PATHWAY GENES IN THE HUMAN BRAIN AND AFFINITY OF TATA-BINDING PROTEIN TO THEIR PROMOTERS 1219

P.N. Menshanov, N.N. Dygalo

METHODOLOGICAL ASPECTS OF READ MAPPING AND ASSEMBLY OF TRANSCRIPTOMES DERIVED FROM BRAIN TISSUE SAMPLES OF *RATTUS NORVEGICUS* 1231

A.Yu. Palyanov, S.S. Khayrulin

SIBERNETIC: A SOFTWARE COMPLEX BASED ON THE PCI SPH ALGORITHM AND ORIENTED TO PROBLEMS OF SIMULATIONS IN BIOMECHANICS 1239

A.Yu. Palyanov, A.S. Ratushnyak

SOME DETAILS OF SIGNAL PROPAGATION IN THE NERVOUS SYSTEM OF *C. ELEGANS* 1248

N.S. Yudin, T.M. Mishakova, E.V. Ignatieva, V.N. Maksimov, V.V. Gafarov, S.K. Malyutina, M.I. Voevoda

ASSOCIATION OF DOPAMINE RECEPTOR D4 (*DRD4*) GENE POLYMORPHISM WITH CARDIOVASCULAR DISEASE RISK FACTORS 1259

A.N. Savostyanov, V.S. Naumenko, N.A. Sinyakova, M.N. L'vova, E.A. Levin, M.S. Zaleshin, U.N. Kavay-ool, V.A. Mordvinov, N.A. Kolchanov, L.I. Aftanas

ASSOCIATION OF ANXIETY LEVEL WITH POLYMORPHIC VARIANTS OF THE SEROTONIN TRANSPORTER GENE IN RUSSIANS AND TUVINIANS 1268

E.D. Petrovskiy, A.N. Savostyanov, A.A. Savelov, V.S. Naumenko, N.A. Sinyakova, E.A. Levin, S.S. Tamozhnikov, A.A. Tulupov, V.A. Mordvinov, N.A. Kolchanov, L.I. Aftanas

EFFECTS OF SEROTONIN TRANSPORTER ALLELE POLYMORPHISM IN HUMANS ON THE INDIVIDUAL CHARACTERISTICS OF CEREBRAL HEMODYNAMICS IN THE STOP-SIGNAL PARADIGM 1281

S.A. Lashin, E.A. Mamontova, Yu.G. Matushkin, N.A. Kolchanov

MECHANISMS OF THE FORMATION AND PROPAGATION OF SOCIOBIOLOGICAL INTERACTIONS: A COMPUTER SIMULATION STUDY 1289

V.A. Sokolov

VLADIMIR ALEXANDROVICH STRUNNIKOV BIRTH CENTENNIAL 1299

80 YEARS OF THE BIRTH OF ACADEMICIAN OF THE RAS SERGEY VASILYEVICH SHESTAKOV 1303

ПРЕДИСЛОВИЕ

После успешной реализации глобального проекта «Геном человека» на передовую позицию в современной биологии вышла нейронаука, нацеленная на глубокое понимание работы мозга. Механизмы регуляции центральной нервной системы являются особенно актуальными, поскольку у примерно четверти населения в разные периоды жизни обнаруживается тот или иной вид ментальных расстройств, связанных с нарушениями в работе специализированных систем мозга, обеспечивающих реализацию программ полноценного когнитивного и аффективного функционирования, социального взаимодействия и психического здоровья в целом.

Для современной нейробиологии характерно бурное развитие высокопроизводительных экспериментальных методов, позволяющих проводить исследования на разных уровнях: от молекул и рецепторов до молекулярно-генетических и нейробиологических механизмов функционирования нервной системы в норме и патологии. Настоящий выпуск журнала прекрасно иллюстрирует данную тенденцию. В него вошли статьи, выполненные на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях, поскольку эти подходы являются неотъемлемой частью современной генетики и селекции, а также статьи, описывающие современные высокотехнологичные методики исследования в области нейронауки, в том числе получение нейронов из клеточных культур, получение мультипотентных пациент-специфичных нейрональных клеток из соматических клеток, формирование нейроинтерфейсов, включая создание интерфейсов «мозг–компьютер», разработку искусственных когнитивных систем на основе моделей мозга живых организмов, особенности картирования ридов и сборки транскриптома для тканей нервной системы.

Представлены также обзорные статьи, посвященные важным вопросам нейробиологии и нейрогенетики, таким как особенности экспрессии в мозге генов, ассоциированных с проявлением депрессии; генетико-физиологические механизмы агрессивного поведения; целенаправленность как принцип работы мозга; особенности распространения сигналов в нервной системе *C. elegans*. Кроме того, читатель обнаружит оригинальные исследования сибирских ученых в области функциональной интеграции глутаматных и немедиаторных рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа; вовлеченности нейрогеномного уровня в процессы поддержания температурного гомеостаза теплокровного организма на холоде; антиапоптотической активности нейротрофического фактора GDNF; выявления связи вариабельности экспрессии генов путей передачи сигналов в мозге человека со сродством TATA-связывающего белка к промоторам этих генов; возможности предсказания генов-маркеров агрессивности глиомы по экспрессионным данным TCGA; взаимосвязи полиморфных вариантов гена, кодирующего транспортер серотонина, с уровнем личностной тревожности или индивидуальными особенностями мозговой гемодинамики; ассоциации полиморфизма гена DRD4 с факторами риска заболеваний кардиоваскулярной системы.

Надеемся, что данный выпуск журнала окажется важным элементом стратегии междисциплинарного развития современной экспериментальной и клинической нейронауки.

Академик РАН Л.И. Афтанас

Приглашенный редактор номера: **О.В. Вишневский**

УДК 57.017.642:576.364

ПРЯМАЯ КОНВЕРСИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2014 г. **И.Е. Пристяжнюк, Т.А. Шнайдер, В.С. Фишман, Н.М. Матвеева, О.Л. Серов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: serov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 20 октября 2014 г. Принята к публикации 7 ноября 2014 г.

Получение мультипотентных пациент-специфичных нейрональных клеток-предшественников из фибробластов человека является перспективной задачей регенеративной медицины. Недавно для ее решения был предложен инновационный подход, позволяющий осуществлять прямую конверсию фибробластов человека и мыши в индуцированные нейрональные клетки-предшественники (ИНП) за счет введения в геном одного транскрипционного фактора Sox2. В данной работе нами был проведен анализ генерируемых таким образом ИНП и оценена перспектива применения данной методики в медицине. Как в случае клеток мыши, так и в случае клеток человека мы обнаружили значительные изменения морфологии фибробластов, обработанных вирусом: полученные культуры ИНП мыши и человека соответствовали нейрональным предшественникам, полученным из головного мозга эмбрионов мыши. Нами было показано присутствие маркеров нейральных предшественников (НП) в культурах ИНП мыши и человека. Однако индуцированная дифференцировка ИНП мыши не приводила к формированию различных типов нейрональных клеток, в частности, эти клетки не способны были давать начало зрелым нейронам. Кроме того, в дополнение к *Sox2*, мы обрабатывали человеческие фибробласты *c-Myc* и либо *Ascl*, либо *Brn2*. Одна из полученных линий имела низкий пролиферативный потенциал, остальные активно делились, однако цитогенетический анализ показал, что они характеризовались аномальным кариотипом. Выявленные особенности как ИНП человека, так и мыши, ставят существенное ограничение на использование описанной методики получения ИНП в медицине. Таким образом, полученные культуры не являются полноценными аналогами НП. В результате чего мы предполагаем, что опубликованный протокол получения ИНП путем экзогенной экспрессии *Sox2* обладает низкой воспроизводимостью.

Ключевые слова: репрограммирование, трансдифференцировка, нейрональные предшественники, *Sox2*.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время человечество столкнулось с рядом заболеваний, в основе которых лежит необратимое разрушение клеток пациента. Деградация клеток может быть связана с воздействием тех или иных неблагоприятных факторов или с естественным процессом старения. Зачастую единственным путем к лечению таких заболеваний является восполнение пула погибших клеток новыми. К сожалению, способности человека к клеточной регенерации ограничены и снижаются с возрастом (Jessberger, Gage, 2014). Особенно остро эта проблема стоит в области нейродегенеративных заболеваний, поскольку нервная система имеет крайне низкий потенциал к восстановлению (Mouhieddine *et al*., 2014). Решению данной проблемы могло бы способствовать создание технологии получения нервных клеток из других типов клеток пациента (Mouhieddine *et al*., 2014). Так, соединительная ткань человека обладает достаточной способностью к регенерации, а методики получения от пациента материала биопсии, содержащего

достаточное количество клеток соединительной ткани (фибробластов), хорошо отработаны в клинике (Villegas, McPhaul, 2005). Решая проблему превращения одних типов клеток в другие, в 2006 г. группа японских ученых совершила выдающийся прорыв, показав, что экзогенное введение четырех транскрипционных факторов, *Oct4*, *Sox2*, *cMyc* и *Klf4*, способно вызвать превращение фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые (ИПС) клетки (Takahashi, Yamanaka, 2006). Эти клетки способны неограниченно делиться и при дифференцировке в культуре давать начало производным всех трех зародышевых листков, и в частности всем типам нейрональных клеток (Wernig *et al*., 2007). Однако существующие протоколы дифференцировки ИПС клеток имеют ряд существенных недостатков. Во-первых, многие из них характеризуются низким выходом целевых клеток (Keller, 2005). Во-вторых, использование практически всех протоколов приводит к получению смешанной популяции клеток, содержащей наряду с целевыми другие типы клеток (Keller, 2005). В-третьих, после дифференцировки в культуре может оставаться некоторое количество плюрипотентных клеток, которые могут дать начало опухолям при трансплантации человеку (Marión *et al*., 2009; Zhong *et al*., 2011). Таким образом, использование ИПС клеток в медицине на сегодняшний день лимитировано рядом вышеперечисленных факторов.

Альтернативным подходом, используемым при конверсии одного типа клеток в другой, является прямая трансдифференцировка (Heinrich *et al*., 2010; Ieda *et al*., 2010; Vierbuchen *et al*., 2010; Sekiya, Suzuki, 2011). Этот процесс так же, как и получение ИПС клеток, связан с введением в клетки-мишени транскрипционных факторов, однако продуктом трансдифференцировки является популяция специализированных клеток, не способных делиться и, следовательно, не представляющих угрозу формирования новообразований (Vierbuchen *et al*., 2010). Однако данный подход также имеет ряд ограничений: низкая эффективность трансдифференцировки и неспособность полученных клеток делиться в культуре лимитируют количество клеточного материала, а необходимость индивидуального подбора транскрипционных факторов для каждого типа целевых клеток делает задачу их получения крайне сложной.

Недавно альтернативный подход был предложен для получения нейрональных клеток из соматических клеток мыши и человека (Vierbuchen *et al*., 2010; Ring *et al*., 2012). Суть этой методики заключалась в прямой конверсии специализированных клеток в нейрональные клетки-предшественники под действием одного или нескольких транскрипционных факторов. Такие клетки могли продолжительно делиться в культуре, что решило проблему получения большого количества материала, но в отличие от ИПС клеток они не обладали способностью к формированию опухолей. При дифференцировке такие клетки могли давать начало различным нейрональным производным, олигодендроцитам и глиальным клеткам, что открывает большие потенциальные возможности для использования данной технологии в регенеративной медицине нейрологических болезней (Ring *et al*., 2012). Однако для использования таких клеток в медицине необходима их детальная характеризация. В данной работе мы использовали различные подходы для прямой конверсии клеток мыши и человека в нейрональные предшественники и провели детальную характеристику полученных клеточных линий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры клеток

В работе использовали следующие культуры клеток человека: фибробласты, полученные из кожи взрослого человека (TAF2), предоставленные доктором биологических наук И.Н. Лебедевым (Институт медицинской генетики СО РАМН, г. Томск); фибробласты крайней плоти человека (ФКПЧ), предоставленные Национальным центром биотехнологии республики Казахстан; линию клеток эмбриональной почки человека HEK293T (Phoenix), предоставленную профессором С.Л. Киселевым (г. Москва). В работе также использованы линия m5S эмбриональных фибробластов мыши, приобретенная из банка клеточных культур JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) (Sasaki, Kodama, 1987), и культура первичных

эмбриональных фибробластов мыши линии c57BL/6J, полученная в соответствии с протоколом, описанным ранее (Kruglova *et al*., 2008).

Культивирование клеток

Фибробласты, а также клетки линии HEK293T (Phoenix) культивировали в ростовой среде DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Sigma, Германия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (Gibco, Великобритания), с добавлением 100 мкг/мл смеси антибиотиков 1 : 1 пенициллина и стрептомицина (GibcoBRL, Великобритания). Культивирование индуцированных нейрональных предшественников (ИНП) человека проводили в среде ReNCell++ (среда ReNcell (Millipor) с добавлением человеческих рекомбинантных ростовых факторов FGF2 и EGF в концентрации 20 нг/мл). Культивирование ИНП мыши проводили в среде Mouse NSC expansion medium (Millipor) с добавлением факторов FGF2, EGF и гепарина, поставляемых в комплекте со средой (Millipore) в соответствии с руководством производителя.

Наработка лентивирусных векторов

Клетки HEK293T (Phoenix) высаживали в культуральный матрас в количестве 6×10^4 клеток на см^2, используя соответствующую среду для культивирования. На следующий день, когда плотность посаженных клеток составляла около 80 %, их трансформировали плазмидами, содержащими один из целевых генов (pLeGO-Ascl1, pLeGO-cMyc, pLeGO-Brn2, pLeGO-Sox2, pLeGO-G2), и упаковочными плазмидами (pMDLg/pRRE, pRSV/Rev, pCMV-VSVG). Трансфекцию проводили с помощью липофектамина (Lipofectamine^{TM} LTX Reagent) в соответствии с руководством производителя (Invitrogen, США). Через 12 ч после трансфекции собирали культуральную среду, содержащую наработанные вирусы, а клеткам добавляли 5 мл свежей ростовой среды. Через 24 и 36 ч после трансфекции повторно собирали культуральную среду, содержащую наработанные вирусы. Полученную культуральную среду, содержащую вирусы, фильтровали с помощью фильтра BioFIL (размер пор 0,45 мкм) и использовали для трансдукции фибробластов.

Трансдукция фибробластов мыши лентивирусами для получения ИНП

В качестве покрытия для лунок использовали поли-L-орнитин (Invitrogen, Германия) и ламинин (Invitrogen, Германия). На подготовленные таким образом 6-ячеечные планшеты рассаживали фидер, в качестве которого использовали клеточную линию STO, предварительно обработанную митомицином С (Sigma, Германия), в концентрации 10 μг/мл в течение двух часов. Фидер рассаживали в количестве 100 000 клеток на 1 см^2. На следующий день на подготовленный фидер рассаживали ЭФМ линии C57BL в количестве 15 000 клеток на 1 см^2. Через 24 ч проводили вирусную трансдукцию фибробластов, используя один вирус, несущий ген Sox2. На следующий день среду, содержащую вирус, удаляли и заменяли ростовой средой для ЭФМ. Через сутки ростовую среду для ЭФМ заменяли средой для культивирования нейральных стволовых клеток, которую ежедневно заменяли свежей. Через 10–14 дней проводили снятие образовавшихся колоний с помощью Cell Celector (AVISO, Германия) или с помощью стеклянных капилляров. Снятые колонии перемещали в лунки, которые предварительно (не менее чем за 2 ч) были обработаны сывороткой крови телят (Invitrogen, Германия) или желатином (0,1 %) в течение 10 мин при температуре +4 °С. Культивирование снятых колоний продолжали на среде для нейральных стволовых клеток. Пассирование культур полученных клеток проводили с интервалом 3–7 дней.

Трансдукция фибробластов человека лентивирусами для получения ИНП

Трансформацию фибробластов человека в нейральные предшественники при помощи единственного транскрипционного фактора *Sox2* проводили согласно предложенному протоколу (Ring *et al*., 2012) с модификациями. В соответствии с этим протоколом фидер из мышиных фибробластов линии мышей ICR, обработанных митомицином С, высаживали либо на пластик, либо на покровные стекла, покрытые лизином и поли-L-орнитином, в концентрации 15 000 клеток/см^2. На следующий день на подготовленный фидер высаживали человеческие

фибробласты в концентрации 1×10^5 клеток/см^2. Трансдукцию фибробластов осуществляли лентивирусным вектором, содержащим кДНК *Sox2*. Среду с вирусом разбавляли наполовину средой DMEM+10 % эмбриональной сыворотки коров и наносили на клетки на 24 ч, после чего заменяли ее ростовой средой для фибробластов. Спустя сутки среду заменяли на ReNCell++. Через 8–10 дней на поверхности монослоя фибробластов появлялись скопления клеток, образующие сферы, которые собирали и культивировали 3–5 дней в среде ReNCell++ в чашке Петри, покрытой агарозой, препятствующей прикреплению клеток. После этого сферы рассаживали в адгезивных условиях (на культуральные чашки, покрытые ламинином и поли-L-орнитином) в среде ReNCell++. Чередование роста клеток в виде сфер или адгезивной культуры повторяли два раза.

Трансдукцию фибробластов человека набором вирусных векторов *Sox2*, *c-Myc*, *Brn2* и *Myt1L* (*Ascl*) в разных сочетаниях проводили по аналогичному протоколу.

Дифференцировка ИНП *in vitro*

Для индукции дифференцировки ИНП мыши рассаживали в количестве 50 000 клеток на 1 см^2 в лунки, предварительно обработанные эмбриональной сывороткой коров или 0,1 %-м раствором желатина. Первые 24 ч ИНП культивировали на среде для ИНП мыши, далее каждые 48 ч ее меняли на среду для дифференцировки.

Цитогенетический анализ ИНП человека

Цитогенетический анализ проводили по стандартному протоколу И.Е. Пристяжнюк с соавт. (2010). За 2 ч до фиксации клеток в культуральную среду добавляли колцемид (0,1 мкг/мл). Гипотоническую обработку проводили в 0,56 %-м растворе KCl в течение 30 мин при температуре 37 °C. Клетки фиксировали в смеси метанол: уксусная кислота (3 : 1). Препараты анализировали на микроскопе «Axioplan 2 imaging» фирмы Carl Zeiss, оснащенном CCD-камерой «Coolcube 1» (Meta systems), в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Изображение обрабатывали с помощью пакета прикладных программ ISIS3 (*In Situ* Imaging System), компании MetaSystems GmbH.

ОТ-ПЦР анализ

Суммарную РНК выделяли с помощью Trizol Reagent (Invitrogene, США). кДНК синтезировали с помощью Reverse Transcription System (Fermentas, Латвия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа экспрессии генов проводили ПЦР с праймерами, специфичными для этих генов (последовательности праймеров доступны по запросу). В реакционную смесь ПЦР (конечный объем 20 мкл), включающую: ПЦР буфер (65 мМ Tris-HCl, pH 8,8, 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$ и 0,01 % Tween); 2,5 мМ $MgCl_2$; 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ); 0,5 мкМ прямого и обратного праймеров; 0,2 единиц активности Taq-ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия), добавляли 50–200 нг кДНК. Полученные продукты амплификации исследовали при помощи гель-электрофореза.

Иммуноцитохимический анализ

Клетки предварительно фиксировали в течение 10 мин в растворе 3 %-го параформальдегида (Fluka, Германия) в фосфатном буфере (ФБ). После 20-минутной обработки 0,1%-м раствором тритона X-100 (Fluka, Германия) клетки отмывали 2 раза в течение 5 мин в ФБ и проводили блокировку в течение 1 ч 1 %-м раствором альбумина (Sigma, США) в ФБ. После обработки альбумином клетки инкубировали с первыми антителами (сводная информация по антителам и их разведениям, использованным в работе, приведена в табл. 1). Для приготовления раствора первых антител необходимой концентрации их стоковый раствор разводили в 1 %-м альбумине в ФБ. Инкубирование в растворе антител проводили при комнатной температуре в течение одного часа. После двух 5-минутных отмывок в ФБ наносили раствор вторичных антител, конъюгированных с флюорохромами Alexa Fluor 546 и Alexa Fluor 680, и инкубировали препараты один час при комнатной температуре в темноте. Клетки отмывали от раствора антител два раза по 5 мин раствором фосфатного буфера

Таблица 1

Антитела

Первичные антитела	Разведение
Mouse Tuj1 – anti-bTubb3 (Millipore, Германия)	1 : 500
Rabbit NF200 – anti-NF-H (Sigma, США)	1 : 200 – 1 : 500
Rabbit mCollagene – anti-Col1 (Chemicon, США)	1 : 100
Rabbit Sox2 – anti-Sox2	1 : 50 – 1 : 100
Mouse Nestin – anti-Nestin (Millipore, Германия)	1 : 100 – 1 : 300
Rabbit Olig2 – anti-Olig2 (Millipore, Германия)	1 : 100 – 1 : 200
Mouse GFAP – anti-GFAP (Millipore, Германия)	1 : 50 – 1 : 100
Rabbit Nestin – anti-NESTIN (Abcam)	1 : 200
Rabbit MAP2– anti-MAP2 (Abcam)	1 : 200
Rabbit Fibronectin – anti-Fibronectin (Abcam)	1 : 200
Вторичные антитела	
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, США)	1 : 500
Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, США)	1 : 500

и подкрашивали ядра клеток раствором DAPI (1 : 1000 в растворе фосфатного буфера) 10 мин в темноте. После этого клетки промывали 2 раза по 5 мин фосфатным буфером. Затем проводили микроскопический анализ с использованием флюоресцентного микроскопа «Axioscope 2 Plus» (Carl Zeiss, Germany).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение нейрональных предшественников из фибробластов мыши

Для получения нейрональных предшественников из фибробластов мыши использовали форсированную экспрессию транскрипционного фактора *Sox2* (Ring *et al*., 2012). В качестве вектора для доставки транскрипционного фактора использовали лентивирусную систему LeGO. Все эксперименты проводили по следующей схеме (рис. 1, а): культуру эмбриональных фибробластов мыши (ЭФМ) обрабатывали лентивирусом, содержащим транскрипционый фактор *Sox2*. Через 8 дней после вирусной трансдукции в культуре ЭФМ стали появляться колонии предполагаемых индуцированных нейрональных предшественников (ИНП) (рис. 1, б). На 8–10-й дни производили снятие колоний

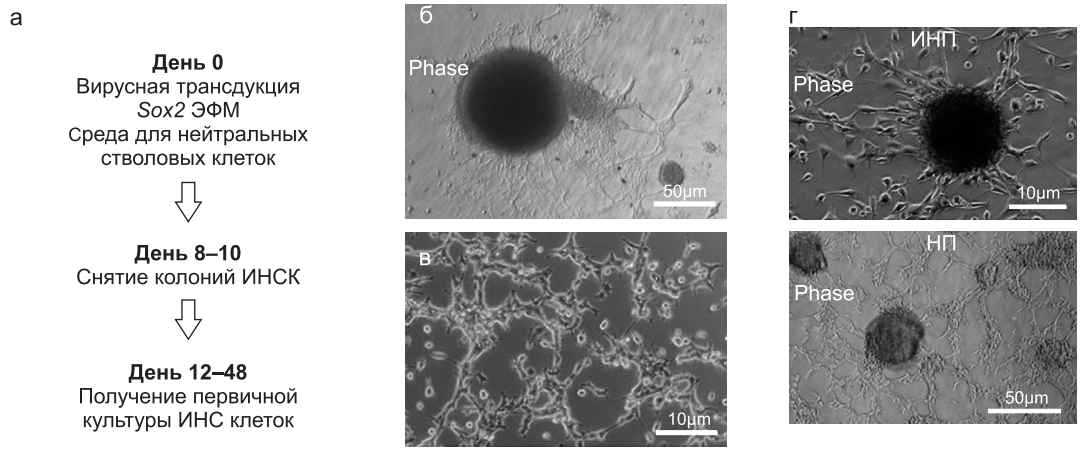


Рис. 1. Получение ИНП.

а – схема эксперимента; б – колонии ИНП в культуре ЭФМ на 8-й день после индукции трансдифференцировки; в – первичная культура ИНП; г – нейросферы, сформированные из ИНП и НП.

Fig. 1. Generation of iNP cells.

a – experiment design; b – iNP colonies in MEFs on day 8 after lentiviral transduction; c – iNP cells in the first passage; d – neurospheres from iNP and NP cells.

и продолжали их культивирование до получения культуры клеток. По морфологическим характеристикам полученная культура ИНП соответствовала нейрональным предшественникам (НП), полученным из головного мозга эмбрионов мыши (данные не приведены). При культивировании на адгезивном покрытии (желатин, ламинин) морфология ИНП и НП приближалась к нейроэпителиальной (рис. 1, в, г). Кроме того, оба типа клеток формировали сферообразные скопления (рис. 1, в, г). Важно отметить, что скорость пролиферации и морфология клеток на всем протяжении культивирования (около 4 мес.) оставались относительно стабильными.

Для ИНП и НП мы провели иммуноцитохимический анализ экспрессии двух маркеров нейральных предшественников: Nestin (рис. 2, а) и Sox2 (данные не показаны). Мы обнаружили, что полученная культура ИНП экспрессирует Sox2 (рис. 2, а). Однако экспрессия этого маркера в полученной линии клеток может быть обусловлена работой экзогенного Sox2, введенного при помощи вирусной трансдукции. Сигнал маркера Nestin незначительно превышал фоновый уровень, характерный для фибробластов (данные не приведены), хотя и был близок по интенсивности к сигналу, выявляемому в нейрональных предшественниках, полученных из головного мозга эмбрионов мыши.

Помимо иммуноцитохимического анализа, мы также провели ОТ-ПЦР анализ на следующие маркеры НСК: *Ascl1*, *Glast*, *Nestin* и *Pax6* (рис. 2, б). Было установлено, что в полученной линии клеток ИНП так же, как и в линии клеток НП, экспрессируются все вышеперечисленные маркеры. При этом в контрольных клетках фибробластов линии m5S экспрессия маркеров не наблюдалась. Однако экспрессия как минимум одного из вышеперечисленных факторов, *Nestin*, детектируется методом ОТ-ПЦР в культуре первичных фибробластов, не обработанных вирусом с *Sox2* (данные не приведены). Таким образом, выявленные молекулярные характеристики не позволяют однозначно оценить полноту репрограммирования полученных клеток.

Наиболее важную информацию о полноте репрограммирования может дать тест на мультипотентность, т. е. способность полученных ИНП дифференцироваться в три типа производных: нейроны, астроглию и олигодендроглию. Первым этапом данной работы был подбор условий для дифференцировки. Мы использовали около 30 комбинаций сред, добавок и покрытий. Определение наиболее оптимальных условий проводили по изменению морфологии клеток на сходную с морфологией нейрональных и глиальных, а также по выживаемости. Стоит отметить тот факт, что выживаемость клеток в этих экспериментах была крайне низка (10–20 % клеток). В итоге нами были отобраны несколько условий (рис. 3, а). В выбранных условиях индуцировали дифференцировку ИНП, через 7 дней клетки фиксировали и проводили иммуноцитохимический анализ на наличие экспрессии молекулярных маркеров нейронов (Tubb3) или глиальных клеток (GFAP) (рис. 3, б).

Было обнаружено, что при использовании среды, содержащей N2 Supplement, маркер астроглии GFAP экспрессировало подавляющее большинство клеток в культуре как ИНП, так и НП (рис. 3, б). Однако при анализе нейрональных маркеров ни при одном из условий дифференцировки в культуре ИНП Tubb3-позитивные клетки выявлены не были, хотя морфологически дифференцированные клетки соответствовали нейронам. Напротив, в культуре НП экспрессия гена *Tubb*3 была обнаружена. Итак, в результате дифференцировки линии ИНП удалось получить только один тип клеток – астроциты. Следовательно, мультипотентность этих клеток не доказана.

Получение нейрональных предшественников из клеток человека

Индукцию трансдифференцировки фибробластов человека проводили по схеме, используемой для фибробластов мыши (Ring *et al*., 2012), с небольшими модификациями. Клетки, трансдуцированные вирусом, содержащим ген *Sox2*, собирали и пересаживали на неадгезивную поверхность для формирования сферообразных скоплений. На следующем этапе сферы культвировали на чашке, покрытой ламинином и поли-L-орнитином, где они распластывались и пролиферировали как монослойная культура. Две эти стадии культивирования чередовали два или три раза.

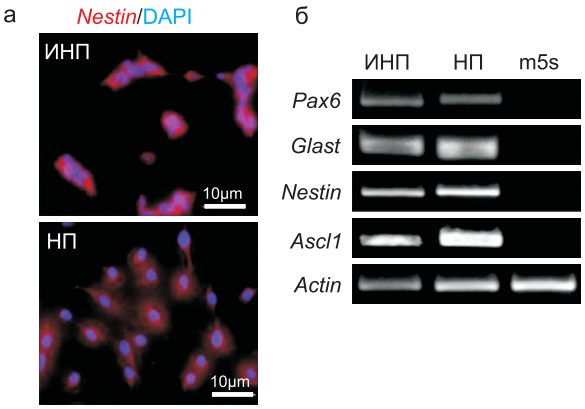


Рис. 2. Анализ экспрессии молекулярных маркеров НП.

а – иммуноцитохимический анализ культуры ИНП с антителами против Nestin; б – ОТ-ПЦР анализ культуры ИНП.

Fig. 2. Molecular marker expression in NP cells.

a – immunocytochemical analysis of iNP cell culture with antibodies against Nestin; b – RT-PCR analysis of iNP and NP cells.

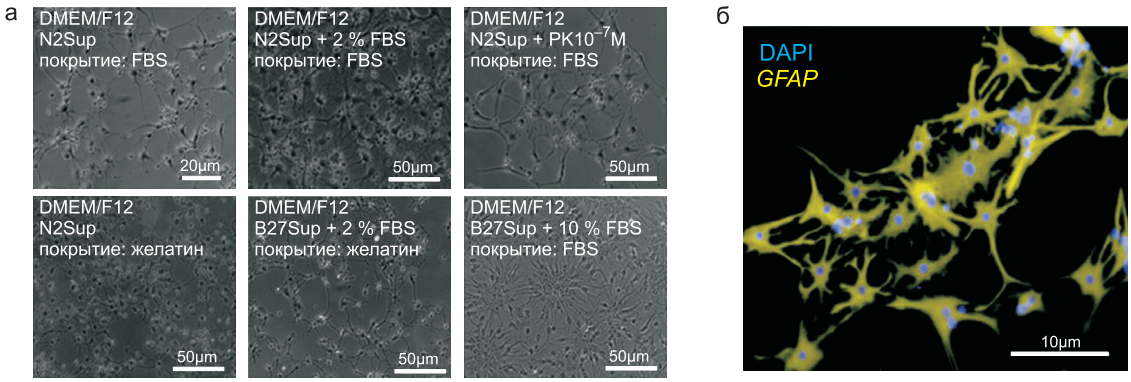


Рис. 3. Подбор условий для дифференцировки ИНП.

а – изменчивость морфологии ИНП в зависимости от разных условий культивирования (день 5-й от начала индукции дифференцировки); б – окраска культуры ИНП на 7-й день после индукции дифференцировки антителами против GFAP.

Fig. 3. Screening of culture conditions for iNP cells differentiation.

a – iNP cell morphology under different cell culture conditions (day 5); b – GFAP-antibody staining of iNP cells (day 7 of differentiation).

Мы провели несколько серий экспериментов по трансдукции фибробластов человека (TAF2 и ФКПЧ) вирусным вектором, несущим транскрипционный фактор *Sox2*. При этом клетки высевали либо на стекло, покрытое ламинином и поли-L-орнитином, либо на пластик с аналогичным покрытием. Для контроля эффективности заражения использовали вирусный вектор с *GFP*, которым трансдуцировали культуру фибробластов. Уже спустя трое суток в культуре TAF2 появились первые сферические скопления клеток, увеличивающиеся в количестве и размерах к 8–10-му дню (рис. 4, а). Следует отметить, что такие сферы образовывались только при культивировании на стекле. В культуре ФКПЧ сферы появились только через 2 недели (Si-ФКПЧ) (рис. 4, б). Однако сферические образования можно было наблюдать и в контрольном эксперименте с вирусом, несущим ген *GFP* (рис. 4, в). Видимо, способность фибробластов образовывать после трансдукции сферы при культивировании на стекле не следует связывать исключительно с влиянием *Sox2*, как утверждается в статье Ринг с соавт. (Ring *et al.*, 2012). Спустя 3 недели, пройдя стадию культивирования в неадгезивных условиях и последующую стадию культивирования на адгезивной поверхности, покрытой ламинином и поли-L-орнитином, клетки существенно отличались по морфологии от контрольных фибробластов, трансдуцированных вирусом с *GFP* и культивировавшихся в сходных условиях (рис. 4, г).

В обеих полученных культурах, Si-TAF и Si-ФКПЧ, методом иммуноцитохимического анализа показано присутствие маркеров нейральных клеток NESTIN и TUBB3 (рис. 4, д).

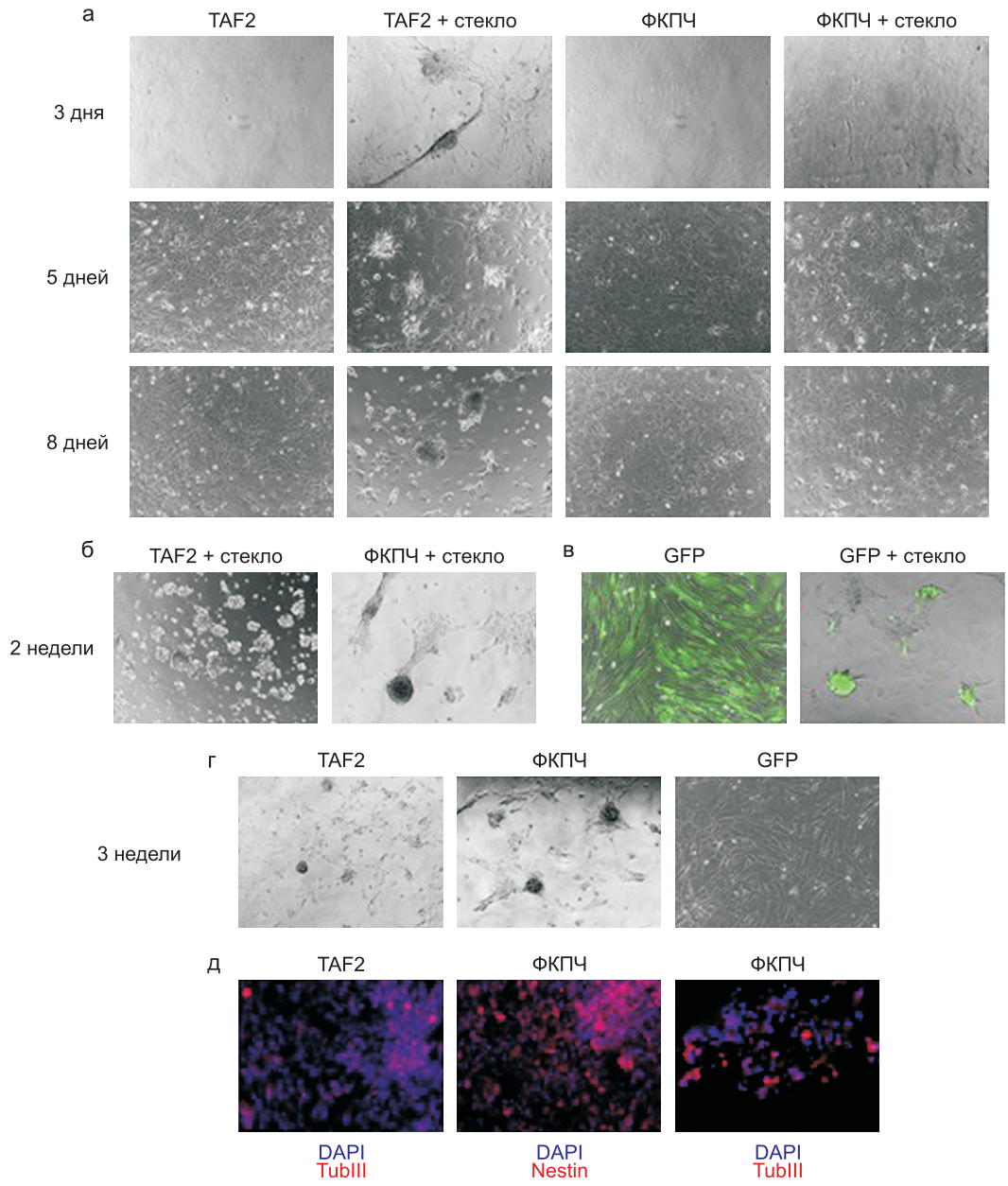


Рис. 4. Морфологические изменения в клетках фибробластов человека после трансдукции *Sox2* на 3-й, 5-й и 8-й день (а) и через 2 (б) и 3 (г) недели.

В качестве контроля представлены фотографии клеток TAF2 на 3-й день после трансдукции вирусом *GFP* (в). Иммуноцитохимический анализ 3-недельных культур клеток ФКПЧ и TAF2 с антителами против маркеров нейральных предшественников TUBB и NESTIN (д).

Fig. 4. Fibroblast cell morphology after *Sox2* transduction.

a – day 3, 5, and 8; b – 2 weeks; c – 3 weeks; d – TAF2 cells on day 3 after GFP transduction as a control; e – immunocytochemical analysis of 3-week cultures of HFF and TAF2 cells with antibodies against TUBB and NESTIN.

Экспрессия Nestin выявлена и методом ОТ-ПЦР. Интересно, что в отличие от эмбриональных фибробластов мыши в культуре фибробластов человека TAF2 экспрессии маркера Nestin обнаружено не было (данные ОТ-ПЦР).

Через два месяца в культуре трансдуцированных клеток ФКПЧ появились клетки, по морфологии напоминающие нейроны (рис. 5, а) и экспрессирующие MAP2 и TUBB3 (рис. 5, б). В это же время мы зафиксировали радикальное

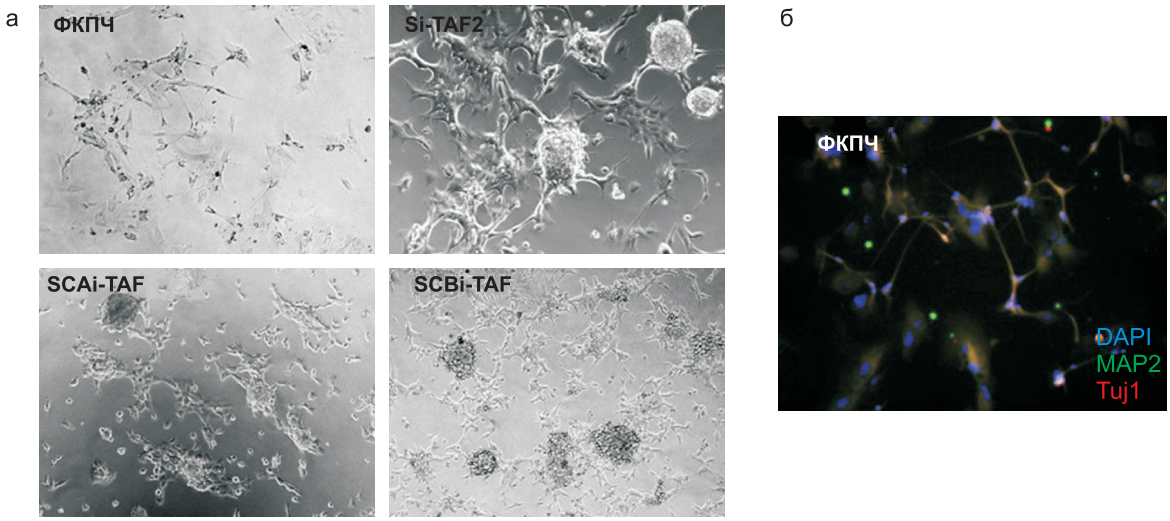


Рис. 5. Морфология клеток линий.

а – ФКПЧ, Si-TAF, SCBi-TAF и SCAi-TAF; б – иммуноцитохимический анализ культуры ФКПЧ с антителами против маркеров нейронов Map2 и нейральных предшественников НСК MAP2 и TUBB.

Fig. 5. Morphology of cell lines.

a – human foreskin fibroblasts, Si-TAF, SCBi-TAF and SCAi-TAF; b – immuno-cytochemical analysis of iNP cell culture with antibodies against MAP2 and TUBB.

снижение (вплоть до полного отсутствия) пролиферативной активности клеток этой культуры. Следует отметить, что при этом культивирование продолжалось в среде ReNCell++, не содержащей индукуторов к дифференцировке. В то же время трансдуцированные *Sox2* фибробласты TAF2 (линия Si-TAF) напоминали по морфологии культуру нейральных предшественников (рис. 5, а) и интенсивно делились. Однако цитогенетический анализ данной культуры показал, что она полиплоидизировалась (рис. 6, а).

В некоторых работах (Ruggieri *et al*., 2014; Zou *et al*., 2014) было показано, что человеческие индуцированные нейрональные предшественники могут быть получены из фибробластов при трансдукции их набором из трех транскрипционных факторов: *Sox2*, *c-Myc*, а также *Brn2* или *Brn4*.

Мы трансфицировали человеческие фибробласты линии TAF2 комплексом факторов: *Sox2*, *c-Myc* и *Ascl* либо *Brn2*. Трансформацию проводили по протоколу, описанному ранее для *Sox2*. В результате спустя 2 месяца были получены две культуры: SCAi-TAF (трансфекция факторами *Sox2*, *c-Myc* и *Ascl*) и SCBi-TAF (трансфекция факторами *Sox2*, *c-Myc* и *Brn2*). По морфологии они были сходны с культурой, полученной с одним *Sox2*. Они также имели характерную морфологию «сетки», активно образовывали сферы в ее «узлах», за исключением того, что клетки SCAi-TAF были более округлыми по форме, а SCBi-TAF – более вытянутыми и отростчатыми (рис. 5, а). На основании морфологических характеристик можно было бы ожидать и сходство по маркерным характеристикам, однако окраска клеток полученных линий антителами к маркерам нейральных предшественников (SOX2, NESTIN, TUBB3), дифференцированных нейронов (MAP2), астроглии (GFAP), олигодендроглии (OLIG2) и фибробластов (Fibronectin) показала, что уровень экспрессии этих маркеров варьирует в проанализированных культурах и не полностью соответствует паттерну, ожидаемому для культур ИНП (табл. 2). На основании полученных данных трудно сказать, являются ли полученные линии полноценными ИНП или нет. Кроме того, проведенный цитогенетический анализ линий SCBi-TAF и SCAi-TAF показал в них редуцированное число хромосом, наличие большого количества анэуплоидий и перестроенных хромосом, которые невозможно охарактеризовать без применения специфических проб (рис. 6, б, в).

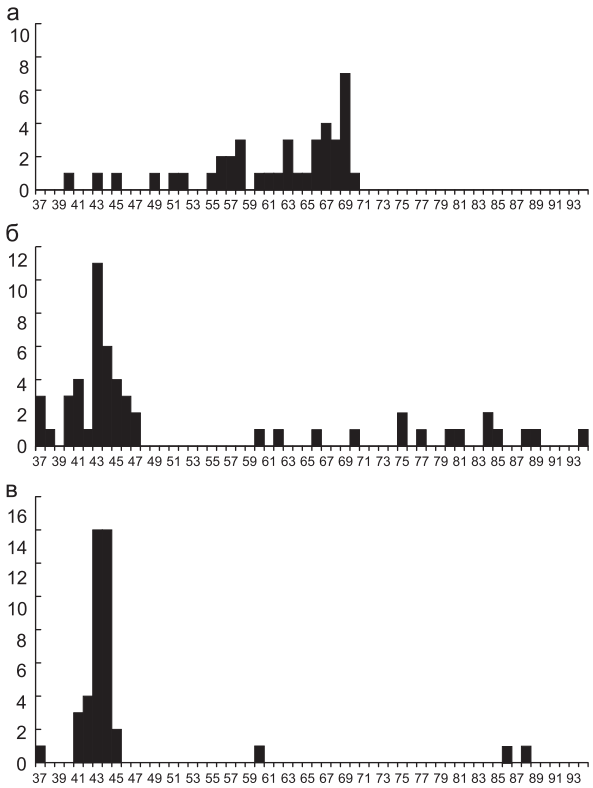


Рис. 6. Хромосомный состав в линиях клеток: а – Si-TAF; б – SCBi-TAF; в – SCAi-TAF.

По оси X отображено число хромосом, по оси Y – количество клеток с данным числом хромосом.

Fig. 6. Chromosome numbers in cell lines. a – Si-TAF; b – SCBi-TAF; c – SCAi-TAF.

X-axis: number of chromosomes; Y-axis, number of cells with the corresponding chromosome number.

Важно отметить, что как исходная культура TAF2, так и полученные из нее индуцированные плюрипотентные стволовые клетки имели нормальный кариотип без хромосомных перестроек (Неопубл. данные).

Таким образом, экзогенная оверэкспрессия *Sox2* обеспечивала получение культуры с высоким пролиферативным потенциалом только в случае нарушения кариотипа и/или полиплоидизации исходных клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нами была предпринята попытка получения ИНП из фибробластов мыши и человека путем экзогенной экспрессии фактора *Sox2*. Как в случае клеток мыши, так и в случае клеток человека мы обнаружили значительные изменения морфологии фибробластов, обработанных вирусом. Однако морфология контрольных (инфицированных вирусом, несущим зеленый белок) клеток в условиях, близких к условиям культивирования ИНП, также менялась, что не позволяет использовать изменение морфологии в качестве критерия появления в культуре ИНП. Нами было показано присутствие маркеров НП в культурах ИНП, и в частности экспрессия маркерного гена *Nestin* в этих клетках. Экспрессия *Nestin* широко используется как маркер НП (Ring *et al*., 2012; Ruggieri *et al*., 2014; Zou *et al*., 2014). Однако мы обнаружили, что тест на экспрессию гена *Nestin* может давать ложнопозитивный результат из-за присутствия определенного уровня экспрессии этого гена в культуре эмбриональных фибробластов, как было выявлено при анализе клеток мыши. Более того, мы показали, что ИНП мыши, экспрессирующие ген *Nestin*, не обладают способностью к формированию различных типов нейрональных клеток, в частности не способны давать начало зрелым нейронам. Таким образом, полученные культуры не являются полноценными аналогами НП.

Таблица 2

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток линий Si-TAF, SCBi-TAF и SCAi-TAF и фибробластов человека

Линии клеток	Sox2	Nestin	Tubb3	Map2	Gfap	Olig2	Fibronectin
Si-TAF	+++	++	Н	+	+	Н	Н
SCAi-TAF	+	+++	Н	+	++	_	+++
SCBi-TAF	+++	+	+	–	+	Н	+
TAF2	–	–	–	–	–	Н	+++

+++ интенсивно во всех клетках; ++ в части клеток и неравномерно: + наблюдается в единичных клетках; Н – не определялся.

При анализе ИНП человека нами были получены четыре культуры. Несмотря на экспрессию гена *Nestin* (существенно превышающую уровень экспрессии этого гена в исходной культуре фибробластов человека), все культуры по своим характеристикам оказались далеки от нормальных НП человека. Так, культуры Si-ФКПЧ имели низкий пролиферативный потенциал, а клетки культуры Si-TAF, SCBi-TAF и SCAi-TAF характеризовались анормальным кариотипом. И в том, и в другом случаях выявленные характеристики ставят существенное ограничение, не позволяющее использовать описанную методику получения ИНП в медицине.

Выявленные нами различия в культурах ИНП человека позволяют предположить, что опубликованные протоколы получения ИНП путем экзогенной экспрессии *Sox2* обладают низкой воспроизводимостью. Не исключено, что в ряде случаев возможно получение полноценных ИНП, сходных по своим характеристикам с НП, однако для этого необходимы увеличение количества анализируемых линий клеток и отбор линий ИНП с высокой пролиферативной способностью и потенциалом к дифференцировке. Кроме того, полученные нами результаты показывают, что при проведении отбора линий необходим их детальный анализ, включающий кариотипирование и молекулярную характеристику количественными методами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Интеграционного проекта СО РАН № 136, проекта РФФИ № 13-04-00441, а также грантов Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010

ЛИТЕРАТУРА

Пристяжнюк И.Е., Матвеева Н.М., Графодатский А.С., Сердюкова Н.А., Серов О.Л. Хромосомный состав межвидовых эмбриональных стволовых гибридных клеток мыши // Цитология. 2010. Т. 52. Вып. 2. С. 136–143.

Pristiazhniuk I.E., Matveeva N.M., Grafodatskiĭ A.S., Serdiukova N.A., Serov O.L. Analysis of chromosome sets in interspecific embryonic stem hybrid cells of mice // Tsitologiya. 2010. V. 52. No. 2. P. 136–143. (In Russian).

Heinrich C., Blum R., Gascon S., Masserdotti G., Tripathi P., Sanchez R., Tiedt S., Schroeder T., Gotz M., Berninger B. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons // Plos Biol. 2010. V. 8. No. 5. e1000373.

Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors // Cell. 2010. V. 142. No. 3. P. 375–386.

Jessberger S., Gage F.H. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans // Trends Cell Biol. 2014. V. 24. No. 10. P. 558–563.

Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine // Genes Dev. 2005. V. 19. P. 1129–1155.

Kruglova A.A., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Gridina M.M., Golubitsa A.N., Serov O.L. Embryonic stem cell/fibroblast hybrid cells with near-tetraploid karyotype provide high yield of chimeras // Cell Tissue Res. 2008. V. 334. P. 371–380.

Marión R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity // Nature. 2009. V. 460. P. 1149–1153.

Mouhieddine T.H., Kobeissy F.H., Itani M., Nokkari A., Wang K.K.W. Stem cells in neuroinjury and neurodegenerative disorders: Challenges and future neurotherapeutic prospects // Neural Regen. Res. 2014. V. 9. P. 901–906.

Ring K.L., Tong L.M., Balestra M.E., Javier R., Andrews-Zwilling Y., Li G., Walker D., Zhang W.R., Kreitzer A.C., Huang Y. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. No. 1. P. 100–109.

Ruggieri M., Riboldi G., Brajkovic S., Bucchia M., Bresolin N., Comi G.P., Corti S. Induced neural stem cells: Methods of reprogramming and potential therapeutic applications // Progr. Neurobiol. 2014. V. 114. P. 15–24.

Sasaki M.S., Kodama S. Establishment and some mutational characteristics of 3T3-like near-diploid mouse cell line // J. Cellular Physiol. 1987. V. 131. P. 114–122.

Sekiya S., Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors // Nature. 2011. V. 475. No. 7356. P. 390–393.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.

Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Südhof T.C., Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // Nature. 2010. V. 463. No. 7284. P. 1035–1041.

Villegas J., McPhaul M. Establishment and culture of human skin fibroblasts // Curr. Protoc. Mol. Biol. 2005. Unit 28.3.

Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state // Nature. 2007. V. 448. P. 318–324.

Zhong B., Watts K.L., Gori J.L., Wohlfahrt M.E., Enssle J., Adair J.E., Kiem H.-P. Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes // Mol. Ther. 2011. V. 19. P. 1667–1675.

Zou Q., Yan Q., Zhong J., Wang K., Sun H., Yi X., Lai L. Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 5250–5260.

DIRECT CONVERSION OF SOMATIC CELLS TO NEURONAL PRECURSORS: PROBLEMS AND OUTLOOKS

I.E. Pristyazhnyuk, T.A. Shnayder, V.S. Fishman, N.M. Matveeva, O.L. Serov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: serov@bionet.nsc.ru

Summary

The generation of multipotent patient-specific neural precursors from human fibroblasts is one of the challenges to regenerative medicine. Recently, a novel approach was offered. This method allows direct conversion of human and mouse fibroblasts into induced neuronal precursor (iNP) cells by overexpression of a single transcription factor, *Sox2*. In this study, we analyzed iNP cells produced from human and mouse fibroblasts by lentivirus transduction with *Sox2* and evaluated the medical prospects of this method. Both mouse and human fibroblasts demonstrated pronounced morphological changes after treatment with *Sox2*, and the resulting iNP cells were morphologically similar to wild-type ones derived from the mouse embryonic brain. Human and mouse iNP cells expressed NP molecular markers. However, induced differentiation of mouse iNP cells in vitro failed to produce three types of neural cells such as neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. In addition to *Sox2*, we treated human fibroblasts with *c-Myc* in combination with *Ascl* or *Brn2*. One of the obtained cell lines had a low proliferative potential, but others intensely divided. Cytogenetic analysis of these cell lines showed that they had aberrant chromosome sets. In our opinion, both mouse and human iNP cells produced by this protocol have limited application in medicine. Thus, iNP cells derived in our experiments are not equivalent to wild-type NP cells. We conclude from our results that the protocol is poorly reproducible.

Key words: neurogenesis, transdifferentiation, neural stem cells, patient-specific neural cells, *Sox2*.

УДК 576.3:57.017.642:602.9

ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

© 2014 г. **А.Г. Мензоров**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
Федеральное государственное бюджетное учреждение научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, Россия;
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия, e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 2 сентября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Продолжительность жизни людей существенно увеличилась за последнее время, что привело к росту доли «возрастных» болезней, в том числе нейродегенеративных заболеваний. Одно из перспективных направлений их лечения – клеточная терапия. Для клеточной терапии оптимально использовать пациент-специфические клетки для того, чтобы избежать иммунного ответа. В обзоре рассмотрены современные подходы изменения клеточной судьбы с акцентом на получение нейральных клеток с помощью трансдифференцировки. Для получения нейральных клеток можно проводить дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в нейроны. Такие клетки будут гетерологичными, кроме того, при использовании производных плюрипотентных клеток есть риск формирования опухолей. Терапевтическое клонирование даст возможность получить аутологичные эмбриональные стволовые клетки, которые можно дифференцировать в нейроны, однако могут возникнуть этические проблемы. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки позволяют получить пациент-специфические нейроны, однако остается риск появления опухолей. Трансдифференцировка – перспективная технология получения пациент-специфических нейронов из фибробластов, минуя стадию плюрипотентности. Однако возникает вопрос полноты репрограммирования фибробластов в нейроны и функциональности нейронов. Кроме того, зрелые нейроны будет затруднительно использовать в клеточной терапии, так как их относительно мало и они плохо переносят трансплантацию. Поэтому в настоящее время оптимальная стратегия получения клеточного материала для клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний – использование нейральных стволовых клеток. Для пациент-специфических нейральных стволовых клеток можно использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или трансдифференцировку фибробластов или астроцитов. В обзоре рассмотрены современные данные по трансдифференцировке различных типов клеток человека в нейроны и в клетки-предшественники нейронов. В целом использование пациент-специфических нейральных стволовых клеток даст возможность в будущем проводить терапию некоторых нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, клонирование, плюрипотентность, репрограммирование, трансдифференцировка, нейроны.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная терапия – одно из наиболее перспективных направлений медицины. Замещение поврежденных или нефункционирующих клеток может стать методом лечения болезней, на сегодняшний день считающихся неизлечимыми. В целом клеточную терапию можно разделить на несколько направлений: трансплантация клеток-предшественников, соматических стволовых клеток, трансплантация дифференцированных клеток, готовых

к выполнению своих функций, и трансплантация генетически модифицированных клеток с исправленными дефектами. Сейчас использование клеточной терапии в практике ограничивается переливанием крови и трансплантацией костного мозга.

Для широкого применения клеточной терапии в лечении заболеваний необходимо решить несколько проблем. Во-первых, введение чужеродного клеточного материала вызывает иммунологическое отторжение. Так, при пересадке органов и костного мозга определяют близость антигенов главного комплекса гистосовместимости, что существенно ограничивает возможности поиска донора. Даже при использовании «совместимого» материала реципиенты вынуждены принимать иммунодепрессанты в течение всей жизни. Во-вторых, возможность получить клетки донора физически ограничена – доступны лишь некоторые клеточные типы, например клетки костного мозга, но количество этих клеток может быть недостаточным для лечения. Если же говорить про нейроны, гепатоциты и другие специализированные клетки, то их практически невозможно получить от доноров. В-третьих, дифференцированные клетки взрослого организма чаще всего уже не способны к делению, функционируют в сформированной клеточной нише и поэтому не могут быть использованы для пересадки.

Заболевания нервной системы, связанные с нарушением функционирования и гибелью нейронов, такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона, в настоящее время практически не поддаются лечению. Рассеянный склероз – болезнь, связанная с демиелинизацией аксонов в центральной и периферической нервной системе, также неизлечима. В то же время известно, что, например, признаком болезни Паркинсона является гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга, а при рассеянном склерозе выработку миелина прекращают олигодендроциты. Трансплантация функциональных нейральных клеток может быть перспективным подходом для лечения таких заболеваний.

Ниже будут рассмотрены различные способы получения нейральных клеток для клеточной терапии, перспективы применения и имеющиеся проблемы.

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Все разнообразие типов клеток в нормальном развитии – нейроны, клетки кожи, крови, печени и другие формируется в результате деления и дифференцировки одной клетки – зиготы. Эмбриональное развитие можно представить как дерево, в основе которого лежит одна клетка, зигота, а ветви, отходящие от ствола, символизируют последовательную дифференцировку клеток. Способность к делению и дифференцировке в клетки, производные трех зародышевых листков, эндодермы, мезодермы и эктодермы, называется плюрипотентностью. Программа развития осуществляется путем последовательной активации различных групп транскрипционных факторов, которые регулируют экспрессию множества генов. На экспрессию генов влияют как внутренние факторы, так и внешние сигналы, например получаемые от окружающих клеток.

В экспериментальных системах и в некоторых случаях в нормальном развитии возможно изменение судьбы клеток (рис. 1). Дифференцировка – превращение недифференцированных клеток или клеток-предшественников в дифференцированные со специфическими функциями. Обратный процесс называется дедифференцировкой. Превращение одного предшественника клеток в другой – трансдетерминация. Например, в процессе кроветворения гемопоэтические стволовые клетки дифференцируются в предшественников лимфоидного ряда (лимфоциты и др.) и миелоидного ряда (гранулоциты, макрофаги, эритроциты и др.). Оказалось, что в экспериментальной системе можно вызвать трансдетерминацию, с помощью экспрессии транскрипционных факторов изменить судьбу предшественников миелоидного ряда так, что они дифференцируются в предшественников гранулоцитов и макрофагов или (в другом эксперименте) в предшественников эритроцитов (Orkin, Zon, 2008). И, наконец, недавно была показана прямая дифференцировка – эмбриональные стволовые клетки можно напрямую дифференцировать в нейроны в результате экспрессии определенных транскрипционных факторов. Прямой такая дифференцировка названа из-за того, что обязательные в нормальном

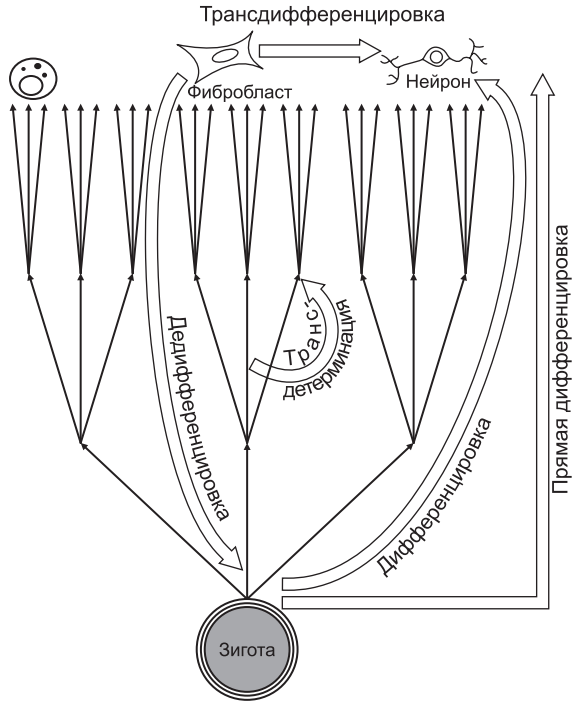


Рис. 1. Различные пути изменения судьбы клетки.

Нормальное развитие – дифференцировка тотипотентной зиготы в различные типы клеток с постепенным сужением потенциала к дифференцировке. В эксперименте можно изменить судьбу клетки – вызвать дедифференцировку, трансдетерминацию, трансдифференцировку или прямую дифференцировку (по: Vierbuchen, Wernig, 2011, с модификациями).

Fig. 1. Different ways to change the cell fate.

In the normal development, a totipotent zygote gives rise to different cell types with gradual decrease in differentiation potential. Cell fate can be changed in experiments by induction of dedifferentiation, transdetermination, transdifferentiation, or direct differentiation (Vierbuchen, Wernig, 2011, with modifications).

развитии стадии дифференцировки в этом случае не проходятся. Наконец, превращение дифференцированной клетки одного типа в другой без прохождения стадий дедифференцировки – трансдифференцировка.

Все вышеописанные способы изменения судьбы клетки потенциально пригодны для использования в клеточной терапии. Ниже будут рассмотрены возможности применения этих подходов с акцентом на получении нейральных клеток и использовании относительно нового направления в исследованиях – трансдифференцировки.

ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Клетки внутренней массы бластоцисты в процессе нормального развития дифференцируются во все типы клеток взрослого организма. Эти клетки можно выделить *in vitro* и практически неограниченно размножать. Недифференцированные клетки в культуре, способные к неограниченному размножению и к дифференцировке в специализированные типы клеток, были названы «эмбриональными стволовыми клетками». Впервые эмбриональные стволовые (ЭС) клетки были получены Эвансом и Кауфманом из бластоцист мыши (Evans, Kaufman, 1981). В 1998 г. Томсон получил ЭС клетки человека (Thomson *et al*., 1998). Появление плюрипотентных ЭС клеток открыло новые перспективы клеточной терапии. Исследователи смогли получить путем дифференцировки ЭС клеток различные типы клеток, в том числе и нейроны (Wobus, Boheler, 2005).

Следует отметить проблемы, связанные с применением ЭС клеток в медицине. Некоторые считают неэтичным разрушение эмбрионов человека даже на такой ранней стадии развития, как бластоциста. Из-за этических проблем число полученных линий ЭС клеток невелико. Это затрудняет использование полученных из ЭС клеток дифференцированных производных в клеточной терапии. Среди небольшого числа линий клеток сложно найти сходные по главному комплексу гистосовместимости, а значит, для большинства пациентов не удастся подобрать иммунологически совместимые трансплантируемые клетки.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ КЛОНИРОВАНИЕ

Для клеточной терапии желательно использовать пациент-специфические клетки. В идеа-

ле это должны быть клетки самого пациента, тогда можно не опасаться иммунологического отторжения. И, конечно же, хотелось бы иметь собственные плюрипотентные клетки для каждого пациента, чтобы была возможность получения максимального спектра дифференцированных клеток. Долгое время считалось, что клетки обладают плюрипотентностью только в раннем эмбриональном развитии и восстановление плюрипотентности невозможно. Однако Джон Гёрдон показал, что это не так. Если энуклеировать ооцит лягушки и подсадить ядро дифференцированной клетки, можно получить взрослое животное (Gurdon, 1962). Это означает, что процесс развития можно обратить назад, вызвав дедифференцировку. Метод переноса ядра дифференцированной клетки в цитоплазму энуклеированного ооцита чаще всего не совсем корректно называют «клонированием». Впервые метод клонирования был успешно применен на млекопитающих в 1997 г., когда была получена овца Долли (Wilmut *et al*., 1997). Затем были клонированы многие виды млекопитающих. Эффективность клонирования в большинстве случаев менее 1 %, а большинство клонированных животных имеют различные проблемы в развитии.

Помимо возможности создания «копий» животных клонирование потенциально открывает еще одно перспективное направление. Клонирование человека недопустимо по этическим причинам, в том числе и из-за ожидаемых нарушений в функционировании генома. Однако можно довести развитие полученного клона лишь до стадии бластоцисты и выделить плюрипотентные ЭС клетки. Получение ЭС клеток путем клонирования было названо терапевтическим клонированием (рис. 2). В теории терапевтическое клонирование позволяет решить проблему получения пациент-специфических клеток. Однако для этого метода также есть ограничения. Впервые ЭС клетки человека удалось получить путем клонирования в 2013 г. (Tachibana *et al*., 2013). Несмотря на достаточно высокую эффективность клонирования, для получения ЭС клеток нужны ооциты высокого качества, а значит, для получения даже одной линии ЭС клеток необходимо использовать много ооцитов. А это, в свою очередь, вызывает морально-этические проблемы. Кроме того, при клонировании ЭС клетки будут иметь митохондрии донора ооцитов. Это может быть плюсом для лечения заболеваний, связанных с мутациями митохондриального генома, но, возможно, другой гаплотип митохондриальной ДНК будет вызывать иммунный ответ. Недавние исследования позволили обойти необходимость использования ооцитов донора для индукции плюрипотентности.

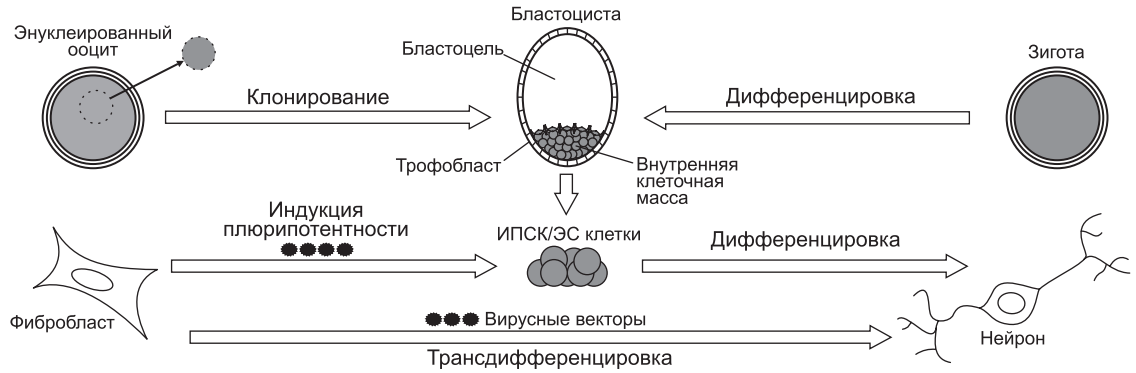


Рис. 2. Методы изменения судьбы клетки для клеточной терапии.

Получение плюрипотентных клеток с последующей дифференцировкой и трансдифференцировка позволяют получить нейроны из фибробластов.

Fig. 2. Methods of cell fate change for cell therapy.

Transdifferentiation and derivation of pluripotent cells with subsequent differentiation allow neuron production from fibroblasts.

ПОЛУЧЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Эксперименты по клонированию показали возможность дедифференцировки специализированных клеток. Считается, что цитоплазма ооцита содержит некие репрограммирующие факторы, которые могут изменить функционирование генома дифференцированной клетки и вернуть в плюрипотентное состояние. По-видимому, это какие-то транскрипционные факторы, необходимые для осуществления программы развития. На сегодняшний день не известно, какие факторы ооцита обладают репрограммирующей активностью и сколько их. Можно предположить, что это сложная многокомпонентная система.

Возможность репрограммирования генома дифференцированной клетки при клонировании заинтересовала японского исследователя Синъя Яманака. Он применил следующий методический подход: прямой перебор репрограммирующих факторов. Были проанализированы транскрипционные факторы, для которых известна экспрессия в ЭС клетках. Из них были выбраны 24 транскрипционных фактора и созданы ретровирусные векторы, несущие гены этих транскрипционных факторов. Эмбриональные фибробласты мыши *in vitro* были заражены ретровирусами и лишь незначительное число клеток дали начало росту колоний с морфологией ЭС клеток. Было показано, что эти клетки плюрипотентны. Затем исследователи убирали из коктейля репрограммирующих факторов по одному и установили, что для изменения клеточной судьбы необходимо лишь 4 транскрипционных фактора: Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (Takahashi, Yamanaka, 2006). Полученные клетки по своим свойствам практически полностью соответствовали ЭС клеткам и были названы индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) (рис. 2). Уже через год после первой публикации были получены ИПСК человека (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). В дальнейшем была показана возможность изменения судьбы не только эмбриональных, но и полученных из кожи фибробластов взрослого человека, а также других типов клеток. В 2012 г. Джон Гёрдон и Синъя Яманака получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие возможности репрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные.

Таким образом, в настоящее время есть возможность получения пациент-специфических плюрипотентных клеток из, например, клеток кожи. ИПСК практически не отличаются по своим свойствам от ЭС клеток, и в то же время их получение не связано с этическими запретами. Как и ЭС клетки, ИПСК можно дифференцировать во многие типы клеток, в том числе нейроны. Казалось бы, технология создания пациент-специфических плюрипотентных клеток позволит уже завтра использовать клеточную терапию, однако нерешенные проблемы еще остались.

Дифференцировка плюрипотентных клеток *in vitro* – крайне неэффективный процесс. Лишь незначительный процент дифференцированных клеток будет соответствовать ожидаемому клеточному типу. Дифференцировка *in vitro* имитирует нормальный процесс дифференцировки *in vivo*, знания о котором ограничены. При дифференцировке *in vitro* в среду для культивирования добавляют различные ростовые факторы. Для правильной дифференцировки необходимы также сигналы окружающих клеток, которые, в свою очередь, зависят от взаимодействия многих типов клеток, а в большинстве случаев *in vitro* не удается моделировать клеточное окружение. Таким образом, даже получив нужную популяцию клеток, мы не можем быть полностью уверены в том, что дифференцировка прошла правильно. Это можно проверить при сравнении профилей экспрессии генов в норме и в полученном в результате дифференцировки типе клеток с последующей оценкой функциональности полученных клеток. Функциональность нейральных клеток проверяется на модельных животных, а не на человеке, что не гарантирует корректное функционирование их в организме человека.

Еще одна проблема – потенциальная онкогенность плюрипотентных клеток. Если плюрипотентные клетки ввести в организм без предварительной дифференцировки, они формируют доброкачественную опухоль, тератому, пытаясь обеспечить эмбриональное развитие, несмотря на отсутствие необходимых сигналов. Неполностью дифференцированные производные

плюрипотентных клеток также потенциально опасны, поэтому необходимо очень тщательно отделять клетки, прошедшие дифференцировку от сохранивших потенциал к развитию. Один из подходов, позволяющих обойти проблему онкогенности, представлен ниже.

ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА: ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРОНОВ ИЗ ДРУГИХ ТИПОВ КЛЕТОК

После того как были получены ИПСК, стало ясно, что для изменения судьбы клетки достаточно лишь нескольких транскрипционных факторов. Дальнейшее развитие технологии позволило получить ИПСК без интеграции трансгенов доставкой репрограммирующих факторов с помощью модифицированной РНК, безынтеграционными вирусами или, в недавней работе, с использованием для репрограммирования только набора химических веществ (Hou *et al.*, 2013). Таким образом, проблема инсерционного мутагенеза практически решена, однако индуцирование плюрипотентности увеличивает и онкогенный потенциал клеток. Возможно ли обойтись без шага индуцированной плюрипотентности и сразу получить желаемый тип клеток? Многие исследователи сосредоточили свое внимание на получении нейронов с использованием фибробластов в качестве исходного материала для трансдифференцировки. Выбор фибробластов как для дедифференцировки, так и для трансдифференцировки не случаен. Фибробласты – относительно гомогенная популяция клеток, их можно легко получить из взрослого организма при культивировании небольшого участка кожи и *in vitro*. Для получения нейронов был использован тот же методический подход, что и для ИПСК. Были отобраны 19 транскрипционных факторов, экспрессия которых выявлена в нейронах, сделаны лентивирусные векторы, несущие гены транскрипционных факторов, и проведено заражение фибробластов модельного животного – мыши. Получив клетки, имеющие маркеры нейронов, исследователи постепенно установили минимальный необходимый набор репрограммирующих факторов – Ascl1, Brn2 и Mytl1 (Vierbuchen *et al.*, 2010). Полученные нейроны обладали способностью формировать синапсы. Эффективность получения нейронов достигала 19,5 %. Нужно отметить, что в этих экспериментах была получена смесь нейронов нескольких типов, т. е. для использования в клеточной терапии такие нейроны не пригодны. В дальнейшем аналогичным методом были получены нейроны из фибробластов человека, в том числе моторные нейроны и дофаминергические (табл. 1). Можно отметить использование микроРНК для репрограммирования, а также увеличение эффективности репрограммирования с использованием различных химических веществ. Трансдифференцировка имеет несколько проблем. Одна из них – получение мультиклональной культуры клеток с различными характеристиками. При этом экспрессия нейрональных маркеров еще не говорит о функциональности даже *in vitro* и тем более *in vivo.* Кроме того, в большинстве работ эффективность получения нейронов не превышает процентов, что не позволяет получать нейроны в достаточном количестве. Следующая модификация метода решает эту проблему.

ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКА: ПОЛУЧЕНИЕ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Итак, получение нейронов из фибробластов ограничено количеством фибробластов. Кроме того, использование функциональных нейронов для клеточной терапии затруднительно – нейроны формируют многочисленные отростки и их уже не удается пересадить без гибели клеток, так как отростки при этом разрушаются. Получение нейральных стволовых клеток (НСК) может решить эти проблемы. НСК обладают потенциалом как к самообновлению, так и к дифференцировке в основные нейральные типы клеток: нейроны, глию и олигодендроглию. При получении НСК из ЭС клеток или ИПСК остается проблема онкогенности. Для трансдифференцировки дифференцированных клеток в НСК были использованы различные репрограммирующие факторы (табл. 2). Можно отметить возможность получения клеток нервного гребня, источника нейронов периферической нервной системы, а также возможность репрограммирования астроцитов, в том числе *in vivo*. Даже при получении НСК сохраняются

Таблица 1

Получение нейронов из фибробластов и астроцитов человека с помощью трансдифференцировки

Исходный тип клеток	Тип полученных клеток	Репрограммирующие факторы	Литературный источник
Кортикальные астроциты	Глутаматергические нейроны	*NeuroD1*	Guo *et al.*, 2014
Эмбриональные фибробласты и фибробласты взрослого	Дофаминергические нейроны	*Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*, *Lmx1a*, *FoxA2*	Pfisterer *et al.*, 2011
Фетальные фибробласты и фибробласты взрослого	Дофаминергические нейроны	*Mash1*, *Nurr1*, *Lmx1a*	Caiazzo *et al.*, 2011
Астроциты	Дофаминергические нейроны	*ASCL1*, *LMX1B*, *NURR1*	Addis *et al.*, 2011
Эмбриональные фибробласты	Моторные нейроны	*Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*, *Lhx3*, *Hb9*, *Isl1*, *Ngn2*, *NEUROD1*	Son *et al.*, 2011
Фибробласты взрослого	Нейроны	Экстракт НСК	Lee *et al.*, 2011
Фибробласты взрослого	Нейроны	*MiR-124*, *BRN2*, *MYT1L*	Ambasudhan *et al.*, 2011
Фетальные и постнатальные фибробласты	Нейроны	*Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*, *NeuroD1*	Pang *et al.*, 2011
Неонатальные фибробласты	Нейроны	*miR-9/9*, *miR-124*, *NEUROD2*, *ASCL1*, *MYT1L*	Yoo *et al.*, 2011
Постнатальные фибробласты и фибробласты взрослого	Нейроны	*Ascl1*, *Ngn2*, SB-216763 и CHIR-99021	Ladevig *et al.,* 2012
Астроциты	Нейроны	*Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l*	Torper *et al.*, 2013
Фибробласты взрослого	Нейроны	*ASCL1*, *MYT1L*, *SOX2*	Wang *et al.*, 2014
Перициты коры головного мозга	Нейроны	*Sox2*, *Mash1*	Karow *et al.*, 2012
Фетальные фибробласты и фибробласты взрослого	Холинергические нейроны	*NGN2*, *SOX11*	Liu *et al.*, 2013

две проблемы трансдифференцировки. Популяция клеток НСК мультиклональна, т. е. разные клетки могут обладать различными свойствами. Кроме того, необходимо убедиться в том, что полученные НСК по экспрессии генов и по функциональности соответствуют «нормальным» клеткам. Однако, по-видимому, именно за получением нейральных стволовых клеток – будущее клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Несмотря на развитие клеточных технологий, нерешенные проблемы терапии заболеваний нервной системы остаются. Общая проблема клеточной терапии – отторжение трансплантированного материала иммунной системой. Одно из решений – использование клеток самого пациента после дедифференцировки или трансдифференцировки. Для терапии заболеваний центральной нервной системы можно использовать и гетерологичные клетки, так как мозг является иммунопривилегированным органом. Следующая проблема связана с выбором клеток для трансплантации. *In vitro* можно получить дофаминергические нейроны для лечения болезни Паркинсона, но после трансплантации функциональные нейроны погибнут из-за поломки отростков. Возможное решение – трансплантация клеток-предшественников, которые пройдут последние стадии дифференцировки уже в месте трансплантации. Транс-

Таблица 2

Получение предшественников нейральных клеток человека с помощью трансдифференцировки

Исходный тип клеток	Тип полученных клеток; потенциал к дифференцировке	Репрограммирующие факторы	Литературный источник
Неонатальные меланоциты	Клетки нервного гребня; нейроны, астроциты, олигодендроциты, остеобласты, хондроциты, клетки гладкой мускулатуры	*NIC1*	Zabierowski *et al.*, 2011
Постнатальные фибробласты	Клетки нервного гребня; нейроны, глия, меланоциты, мезенхимальные клетки	*SOX10*	Zhu *et al.*, 2014
Фетальные фибробласты	Клетки-предшественники нейронов; нейроны	*Sox2*, *c-Myc*, *BRN2* (или *Sox2*, *c-Myc*, *BRN4*)	Zou *et al.*, 2014
Фетальные фибробласты крайней плоти	НСК; нейроны, астроциты, олигодендроциты	*SOX2*	Ring *et al.*, 2012
Кортикальные астроциты	НСК; нейроны, астроциты, олигодендроциты	*SOX2* или *OCT4* или *NANOG*	Corti *et al.*, 2012
Фибробласты взрослого	НСК; нейроны, астроциты, олигодендроциты	*OCT4*	Mitchell *et al.*, 2014

плантация нейральных клеток в мозг имеет и другие подводные камни. Не совсем понятно, сколько введенных клеток выживет после переноса. Кроме того, они трансплантируются в систему, в которой связи между клетками уже сформированы. Смогут ли введенные нейроны сформировать новые связи с окружением и корректно функционировать в этой системе? Кроме того, остается проблема возможной онкогенности вводимых клеток.

Таким образом, в настоящее время клеточная терапия все ближе продвигается к практическому применению. Современные клеточные технологии позволяют получать многие типы клеток *in vitro*. Эксперименты на модельных животных показывают принципиальную возможность использования клеточной терапии для лечения некоторых заболеваний. Однако для широкого применения новых технологий в медицине необходимо решить этические и методические проблемы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке проекта РНФ «Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза хромосомных болезней» № 14-15-00772.

ЛИТЕРАТУРА

Addis R.C., Hsu F.C., Wright R.L. *et al*. Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector // PLoS One. 2011. V. 6. No. 12. e28719.

Ambasudhan R., Talantova M., Coleman R. *et al*. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions // Cell Stem Cell. 2011. V. 9. No. 2. P. 113–118.

Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretskova E. *et al*. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts // Nature. 2011. V. 476. No. 7359. P. 224–227.

Corti S., Nizzardo M., Simone C. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons // Exp. Cell Res. 2012. V. 318. No. 13. P. 1528–1541.

Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. V. 292. P. 154–156.

Guo Z., Zhang L., Wu Z. *et al*. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. No. 2. P. 188–202.

Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // J. Embryol. Exp. Morphol. 1962. V. 10. P. 622–640.

Hou P., Li Y., Zhang X. *et al*. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds // Science. 2013. V. 341. No. 6146. P. 651–654.

Karow M., Sanchez R., Schichor C. *et al*. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. No. 4.

P. 471–476.

Ladewig J., Mertens J., Kesavan J. *et al*. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts // Nat. Methods. 2012. V. 9. No. 6. P. 575–578.

Lee S.T., Chu K., Jung K.H. *et al*. Direct generation of neurosphere-like cells from human dermal fibroblasts // PLoS One. 2011. V. 6. No. 7. e21801.

Liu M.L., Zang T., Zou Y. *et al*. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons // Nat. Commun. 2013. V. 4. 2183.

Mitchell R.R., Szabo E., Benoit Y.D. *et al*. Activation of neural cell fate programs toward direct conversion of adult human fibroblasts into tri-potent neural progenitors using OCT-4 // Stem Cells Dev. 2014. V. 23. No. 16. P. 1937–1946.

Orkin S.H., Zon L.I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology // Cell. 2008. V. 132. No. 4. P. 631–644.

Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T. *et al*. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors // Nature. 2011. V. 476. No. 7359. P. 220–223.

Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O. *et al*. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. No. 25. P. 10343–10348.

Ring K.L., Tong L.M., Balestra M.E. *et al*. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. No. 1. P. 100–109.

Son E.Y., Ichida J.K., Wainger B.J. *et al*. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons // Cell Stem Cell. 2011. V. 9. No. 3. P. 205–218.

Tachibana M., Amato P., Sparman M. *et al*. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer // Cell. 2013. V. 153. No. 6. P. 1228–1238.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. *et al*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. V. 131. No. 5. P. 861–872.

Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126. P. 663–676.

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. 1998. V. 282. No. 5391. P. 1145–1147.

Torper O., Pfisterer U., Wolf D.A. *et al*. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. No. 17. P. 7038–7043.

Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. *et al*. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // Nature. 2010. V. 463. No. 7284. P. 1035–1041.

Vierbuchen T., Wernig M. Direct lineage conversions: unnatural but useful? // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. No. 10. P. 892–907.

Wang P., Zhang H.L., Li W. *et al*. Generation of patient-specific induced neuronal cells using a direct reprogramming strategy // Stem Cells Dev. 2014. V. 23. No. 1. P. 16–23.

Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. *et al*. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature. 1997. V. 385. P. 810–813.

Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy // Physiol. Rev. 2005. V. 85. No. 2. P. 635–678.

Yoo A.S., Sun A.X., Li L. *et al*. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons // Nature. 2011. V. 476. No. 7359. P. 228–231.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. *et al*. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // Science. 2007. V. 318. No. 5858. P. 1917–1920.

Zabierowski S.E., Baubet V., Himes B. *et al*. Direct reprogramming of melanocytes to neural crest stem-like cells by one defined factor // Stem Cells. 2011. V. 29. No. 11. P. 1752–1762.

Zhu S., Ambasudhan R., Sun W. *et al.* Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells // Cell Res. 2014. V. 24. No. 1. P. 126–129.

Zou Q., Yan Q., Zhong J. *et al*. Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. No. 8. P. 5250–5260.

DERIVATION OF NEURONS FOR CELL THERAPY

A.G. Menzorov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
Institute of Medical Genetics SB RAMS, Tomsk, Russia;
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Summary

Life expectancy drastically increased lately. It caused an increase in the morbidity of age-associated neurodegenerative diseases. One of the promising treatments is cell therapy. Patient-specific cells are preferable for cell therapy to avoid immune response. This mini review is dedicated to contemporary knowledge of cell fate modification focusing on the derivation of neural cells by transdifferentiation. One of the approaches for neural cell derivation is the differentiation of embryonic stem cells into neurons. There are at least two problems: such neurons will be heterologous, and remaining pluripotent cells can lead to tumor formation. Therapeutic cloning allows derivation of autologous embryonic stem cells with subsequent neuronal differentiation, but it is ethically questionable. Induced pluripotent stem cells allow producing patient-specific neurons but the tumorigenicity remains. Transdifferentiation is a new technology of cell fate reprogramming that makes possible derivation of patient-specific neurons without the intermediate pluripotency stage. The completeness of reprogramming and functionality of such neurons remain doubtfull. In addition, functional neurons may fail to survive transplantation and the number of neurons is limited. Currently, the best strategy for cell generation is to use neural stem cells. The sources of patient-specific neural stem cells can be induced pluripotent stem cells and transdifferentiation of fibroblasts or astrocytes. Contemporary data on transdifferentiation of different human cell types into neural precursors are presented in this mini review. In general, patient-specific neural stem cells are a candidate source of cell material for neurodegenerative disease treatment in the future.

Key words: embryonic stem cells, cloning, pluripotency, reprogramming, transdifferentiation, neurons.

УДК 57.08:004.5

НЕЙРОИНТЕРФЕЙСЫ: ОБЗОР, РАЗРАБОТКА

© 2014 г. **С.Н. Речкунов[1], А.В. Принц[1], В.А. Селезнев[1], С.В. Голод[1], Р.А. Соотс[1], А.И. Иванов[1], А.С. Ратушняк[2], В.Я. Принц[1]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова
Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: prinz@isp.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 17 октября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Изучение электрической активности в нейронных сетях необходимо для расшифровки на клеточном уровне механизмов информационных процессов и объяснения таких явлений, как долговременная память, обучение и синаптическая пластичность. Необходимо создание многоэлектродных приборов для фундаментальных исследований и практических применений, предназначенных для одновременной записи и стимуляции нейронной активности. В работе представлено современное состояние дизайна, тенденций развития, преимуществ и недостатков многоэлектродной концепции. Главной задачей в дизайне нейроинтерфейсов является достижение необходимого уровня биосовместимости и малой инвазивности при сохранении высокого пространственно-временного разрешения. Мы предложили и описали оригинальные нейроинтерфейсы. Один из них основан на плотном массиве вертикальных полупроводниковых микротрубок и предназначен для будущих *in vivo* нейроинтерфейсов. Другой является экспериментальным *in vitro* многоэлектродным прибором, сформированным из 60 жидкостных пэтч-кламп электродов. Описаны результаты измерения сигналов с нейронов с помощью сформированных пэтч-кламп электродов, каждый их которых представляет собой своеобразную пипетку (диаметром 2 мкм) и позволяет реализовать контакт с мембраной клетки путем присасывания. Достоинством этого подхода является то, что клетки не имеют непосредственного контакта с металлом электродов, а контактируют с проводящей жидкостью в микроканале (ионным проводником), что обеспечивает правильность электрических измерений и повышает выживаемость клеток в процессе измерений.

Ключевые слова: нейроинтерфейс, пэтч-кламп, полупроводниковые нанотрубки.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение информационно-когнитивного функционирования больших нейронных ансамблей является глобальной фундаментальной задачей современной науки. Нейронные ансамбли демонстрируют коллективную электрическую активность и коммуникативные способности передачи электрических сигналов по нейросети, что, по современным представлениям, является основой информационного процессинга в нейронных популяциях. В основе электрической активности, демонстрируемой нейронными ансамблями, лежат физические процессы «разряда» нейронов через трансмембранные ионные каналы. При открытии локализованного ионного канала становится возможным переток ионов через мембрану, что приводит к локальному изменению концентрации ионов вблизи канала и, как следствие, к возмущению локального электрического поля и потенциала (Buzsaki *et al*., 2012). Изменения потенциала вблизи мембраны нейрона при активации ионного канала имеют характерный вид импульсных

сигналов (спайков) миллисекундного временного диапазона. Возмущение электрического поля может спровоцировать открытие других ионных каналов и распространиться далее, охватывая определенный фрагмент нейросети. Экспериментальное исследование пространственно-временной динамики электрической активности больших нейронных ансамблей является необходимым базовым уровнем изучения механизмов кодирования и обработки информации мозгом.

Одной из важнейших задач экспериментального исследования является создание эффективных нейроинтерфейсов между нейронной популяцией и внешним миром (Rutten, 2002; Grill *et al*., 2009). Известные оптические методы регистрации активности больших нейронных ансамблей (обычно визуализации кальция) дают изображение активной области, усредненное на достаточно большом промежутке времени (сотни миллисекунд); детектирование отдельных спайков представляет трудно разрешимую техническую проблему. В противоположность этому, микроэлектродные системы прямой регистрации действующего потенциала позволяют наблюдать электрическую активность нейросети с временным разрешением субмиллисекундного диапазона, а также возбуждать активность нейросети электрическими стимулами сложного пространственно-временного шаблона. Отпадает и необходимость в трансгенных мутациях для выработки нейронами специфических фотоактивных белков, как в случае использования оптических методов. Хотя микроэлектродное зондирование пока не позволяет однозначно идентифицировать клеточные типы нейронов (Ruz, Schultz, 2014), тонкое временное разрешение делает данный метод исключительно эффективным для изучения спайковой динамики в больших нейронных ансамблях (Buzsaki, 2004; Wise *et al*., 2008). Более того, нейроинтерфейсы на основе электрических сигналов наиболее просто могут быть интегрированы в сложные электронные системы сбора и обработки данных. Интегрированные системы с плотными массивами микроэлектродов в силу малых размеров могут быть использованы в экспериментах на активных животных, а в перспективе – и в целях реабилитационного нейропротезирования (Schwartz, 2004; Weiland, Humayun, 2008; Wise *et al*., 2008; Zeng *et al*., 2008) и создания эффективных интерфейсов «мозг – машина» (Lebedev, Nicolelis, 2006; Schwartz, 2006).

За последние десятилетия со времени пионерской работы Д. Хюбеля (Hubel, 1957) технология нейронального зондирования претерпела революционные изменения в направлении развития устройств с большими массивами микроэлектродов. Устройства с мультиэлектродными массивами (МЭМ), имеющие десятки и сотни электродов, дают намного более богатую пространственную информацию, чем простые системы типа тетродов. МЭМ устройства высокой плотности позволяют одновременно регистрировать активность десятков нейронов в ансамбле на клеточном уровне (Nicolelis *et al*., 2003; Schwartz, 2004). В последнее время становится все более очевидно, что нейронные «микросхемы» коры головного мозга имеют прецизионную пространственную организацию (Lee, Huguenard, 2011; Oberlaender *et al*., 2011; Levy, Reyes, 2012; Ruz, Schulz, 2014). В этой связи создание *in vivo* зондовых систем с большими 3-D массивами микроэлектродов является как никогда актуальным для экспериментального изучения архитектуры мозга на разных системных уровнях организации. Примерами 3-D систем могут служить уже созданные МЭМ устройства типа «Utah» (Najafi *et al*., 1985) с массивом игольчатых электродов разной длины (Du *et al*., 2009; Herwik *et al*., 2009) или с несколькими электродными сайтами на конце каждой иглы (Chang, Chiou, 2010), МЭМ устройства глубокого зондирования типа «Michigan» (Campbell *et al*., 1991) с протяженным (свыше одного миллиметра) массивом микроэлектродов (Du *et al*., 2011; Lai *et al*., 2012), универсальные МЭМ устройства синхронного зондирования и стимуляции коры и внутренних отделов мозга (McCarthy *et al*., 2011).

Создание больших МЭМ систем, необходимых для современных исследований, сталкивается с рядом принципиальных ограничений. Увеличение числа микроэлектродов в массиве неразрывно связано с проблемой ввода/вывода физических сигналов, связанных с индивидуальными электродами. Кардинальное решение проблемы интерфейса видится в создании интегрированных МЭМ систем,

включающих помимо самого массива электродов микроэлектронные схемы усиления и преобразования данных, а также фильтрации и сжатия информационных потоков, что позволяет на один–два порядка уменьшить число необходимых интерфейсных линий. В случае имплантируемых *in vivo* МЭМ систем помимо интерфейсных ограничений имеются и серьезные ограничения на энергопотребление, что требует разработки специальной энергосберегающей архитектуры процессорного микрочипа и алгоритмов преобразования множественных нейрональных данных в малое число функционально значимых сигналов (Wattanapanitch *et al*., 2007; Chandrakasan *et al*., 2008; Sarpeshkar *et al*., 2008; Sodagar *et al.*, 2009). На современном этапе интегрированные *in vivo* МЭМ системы, имеющие ~100 электродов, можно считать приемлемым компромиссом для обеспечения функций нейроинтерфейса.

Другое ограничение касается проблемы обеспечения малой инвазивности массива микроэлектродов, иными словами, в присутствии электродов нормальное функционирование нейронного ансамбля не должно нарушаться. Для надежного детектирования и выделения активного нейрона электрод должен находиться не далее ~100 нм от сомы, поскольку амплитуда внеклеточного действующего потенциала быстро спадает с расстоянием, а в случае удаленного электрода имеет место и интерференция сигналов нескольких нейронов (Henze *et al*., 2000; Shoham *et al*., 2006; Buzsaki *et al*., 2012). Уменьшение межэлектродного расстояния повышает пространственное разрешение и отношение сигнал/шум, так как в среднем часть микроэлектродов будет расположена вблизи нейронов (Maccione *et al*., 2010). С другой стороны, с уменьшением расстояния между электродами искажения объемного распределения потенциала, вносимые эквипотенциальной поверхностью электродов, могут стать существенными, что ведет к необходимости уменьшать размеры микроэлектродов и даже применять нанотехнологии для обеспечения малой инвазивности МЭМ устройства (Du *et al*., 2011).

Уменьшение площади микроэлектрода ведет к ухудшению функциональных характеристик (увеличение шума, входного импеданса, уменьшение связанного заряда и величины инжектируемого заряда (Cogan, 2008)). Эффективную площадь электрода можно увеличить за счет развитой морфологии поверхности, используя специальные технологические приемы или покрытия, например, пористые электроды (Urbanova *et al*., 2011), органические проводники (Ludwig *et al*., 2011; Aregueta-Robles *et al*., 2014) или даже углеродные нанотрубки (Baranauskas *et al*., 2011; Bareket-Keren, Hanein, 2013). Тем не менее на сегодняшний день вопрос оптимальных биосовместимых материалов для микроэлектродов *in vivo* и *in vitro* МЭМ систем остается все-таки открытым, как и сопутствующая проблема взаимодействия нейронов с наноструктурированной поверхностью (Brunetti *et al*., 2010).

Нейрональные *in vivo* исследования с помощью МЭМ систем трудоемки, дороги и ограничиваются в основном опытами на полностью или частично иммобилизированных животных. Продолжительные *in vivo* эксперименты крайне затруднительны из-за иммунного ответа организма и высокого риска инфицирования в области аппликации МЭМ системы. Имплантируемые автономные МЭМ системы дистанционного *in vivo* мониторинга находятся в стадии разработки и труднодоступны. Вместе с тем имеется широкий круг проблем, которые могут решаться в ходе *in vitro* исследований.

Технология *in vitro* МЭМ систем совершенствуется год от года, становится доступнее и все шире применяется для исследования культивированных *in vitro* нейросетей и поиска ответа на фундаментальные вопросы, касающиеся обучения, долговременной памяти и синаптической пластичности на клеточном уровне (Zemianek *et al*., 2012). *In vitro* МЭМ системы позволяют исследователям неинвазивным способом проводить долговременные (до нескольких месяцев) наблюдения электрической активности нейросети, культивированной на поверхности матрицы микроэлектродов, имея в то же время возможность воздействовать внешними стимулами в течение всего периода эволюции популяции. Несмотря на обилие исследований, многие функциональные, химические и структурные механизмы развития электрической активности в нейросети остаются неясными (Spitzer, 2006) так же, как количественные критерии оценки развития сети и адекватные методы анализа больших объемов данных спай-

ковой активности сети (Carandini, 2012; Napoli *et al*., 2014). Приоритетная цель современных исследований культивированных нейронных ансамблей состоит в изучении связи между архитектурой нейросети и поведением, в том числе получение устойчивой желаемой реакции в ответ на определенные стимулы. Перспективным преимуществом *in vitro* МЭМ систем является то, что они могут стать прецизионной инструментальной платформой для разработки биогибридных нейроэлектронных обучаемых микросистем с гибкой функциональностью (Cullen *et al.*, 2011).

Проблема формирования массивов жидкостных пэтч-кламп электродов

Известен метод регистрации локального потенциала (patch-clamp, пэтч-кламп). Этот электрофизиологический метод, используемый для изучения свойств ионных каналов, является «золотым стандартом» в электрофизиологии. Это очень чувствительный метод, он позволяет отслеживать единичные ионы и молекулы. Суть метода состоит в изоляции небольшого фрагмента клеточной мембраны с помощью микропипетки и дальнейшего исследования его электрофизиологических свойств. Метод позволяет измерять ионные токи, проходящие через мембрану, контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны и делать выводы о том, как ионные каналы реагируют на электрическое и химическое воздействие.

Между пэтч-кламп электродом и открытым электродом, поверхность которого частично или полностью (в случае матрицы с электродами малых размеров) занята клеткой, имеются серьезные различия. Открытый электрод изолирован от межклеточной среды и находится на некотором удалении от мембраны клетки, таким образом, регистрируются внеклеточные потенциалы. Пэтч-кламп электроды присоединяются непосредственно к клеточной мембране, но (в конфигурации Whole-cell) не разрушают ее, за счет этого не шунтируется потенциал на поверхности мембраны и достигается высокий уровень сигнала по сравнению с шумом.

Для регистрации процессов, протекающих в нейронах, и для исследования механизмов передачи информации в нейросетях необходим массив электродов, которые бы не разрушали нейроны и в то же время регистрировали сигнал, генерируемый непосредственно нейроном. Пэтч-кламп электроды удовлетворяют этим требованиям. В идеальном варианте каждая клетка в нейронной сети должна быть присоединена к пэтч-кламп электроду и должна быть возможность регистрировать электрические сигналы от каждого электрода матрицы в каждый момент времени. Такой идеальной системы еще не существует.

Трудоемкость традиционного пэтч-клампа является причиной того, что исследователи стремятся создать системы автоматизированного и множественного пэтч-клампа, позволяющие регистрировать сигналы от множества клеток одновременно.

В отличие от массивов планарных металлических площадок электродов большие массивы пэтч-кламп электродов до сих пор не изготовлены. Перспективным является именно разработка технологии изготовления планарных пэтч-кламп электродов, что позволит создавать пэтч-кламп электродов массовыми методами.

Многие исследователи ведут работы по технологии изготовления отдельных (или небольшого количества) планарных пэтч-кламп электродов разными способами: формированием пор в $SiO_2\backslash Si_3N_4$ мембране (Fertig *et al*., 2000), формированием отверстий в кремнии, покрытом PECVD-оксидом плазменным травлением (Pantoja *et al*., 2004); с использованием полиимидной пленки с порами (Kiss *et al*., 2003); трэковой мембраны (Fertig, 2002); сопла из оксида кремния (Lehnert *et al*., 2002); стеклянных подложек (Bruggemann *et al*., 2003; Xu *et al*., 2003).

В работе Klemic с соавт. (2002) описана матрица пэтч-кламп электродов с размером отверстий 4–20 мкм, их изготавливали путем отливки из ПДМСа (полидиметилсилоксан), используя в качестве шаблона ямки травления в кремнии. Однако большие размеры отверстий ограничивают область применения изучением больших клеток типа ооцитов лягушки.

В работе Ionescu-Zanetti с соавт. (2004) изготовили из ПДМС систему для множественного пэтч-клампа, в которой клетки присасывают через поры в вертикальных (боковых) стенках микрожидкостного канала. Система позволяет

снимать сигналы одновременно от 14 клеток. Пэтч-кламп электроды не являются планарными, клетки находятся в жидкостном канале, поэтому система плохо подходит для культивирования нейронов и изучения нейронных сетей.

В работе Li с соавт. (2006) изготовили линейный массив из 8 пэтч-кламп электродов из ПДМС, в котором реализован гигаомный контакт с нейронами. Однако для изучения нейронных сетей необходимо больше электродов, расположенных с более высокой плотностью.

В работе Aryasomayajula с соавт. (2011) для получения микроотверстий для системы планарного пэтч-клампа использовали стандартную ПЭТФ-мембрану для фильтрования растворов с отверстиями диаметром 3 мкм. Основа конструкции содержала 4 жидкостных канала и изготовлена из ПДМС. Конструкция позволяла одновременно регистрировать сигнал только от 4 клеток.

Группа ученых из Канады использовала для получения массового планарного пэтч-клампа полиимидную мембрану с микропорами (4 мкм) на основе из ПДМС. В такой системе одновременно культивировали 12 нейронов моллюска, 6 из которых имели контакт с порами (Martinez *et al*., 2010; Martina *et al*., 2011). Развитием этой работы стала система с мембраной из нитрида и оксида кремния с отверстиями диаметром 2–3 мкм. Нейроны культивировали непосредственно на поверхности кремниевого чипа (Ру *et al*., 2010). Такие чипы приходится тестировать на работоспособность, так как половина из них оказываются неработоспособными (Ру *et al*., 2014).

Одним из развитий пэтч-кламп метода является многоканальный (популяционный) пэтч-кламп, позволяющий проводить измерения трансмембранных токов интегрально в популяции клеток. Дно культуральной ячейки содержит массив отверстия для удерживания клеток и измерения трансмембранных токов по аналогии с пэтч-кламп измерениями, но измерительный электрод – один, общий для всех клеток. Популяционный пэтч-кламп не подходит для изучения нейросетей, так как используется один электрод для множества клеток, но он полезен для тестирования фармакологически перспективных соединений, потому что позволяет регистрировать влияние веществ на ионные каналы клеток (Kiss *et al*., 2003; Guthrie *et al*., 2006; Dale *et al*., 2007; John *et al*., 2007). Коммерческие системы для скрининга веществ предлагаются компаниями Molecular Devices Inc. (http://www.moleculardevices.com) и Nanion Technologies (http://www.nanion.de).

Разработка нейроинтерфейса, содержащего 60 планарных пэтч-кламп электродов

В данной работе мы предлагаем оригинальную конструкцию матрицы прямоугольной конфигурации, состоящей из 60 электродных ячеек (сайтов), каждая из которых является своеобразной электродной «пипеткой», позволяющей реализовать локальный контакт к мембране клетки. На рис. 1 приведено поперечное сечение индивидуальной ячейки матрицы с клеткой нейрона в режиме пэтч-кламп эксперимента.

Матрица выполнена на стеклянной подложке толщиной 0,7 мм в форм-факторе, полностью совместимом с популярной матрицей MEA64 и измерительным оборудованием компании «Multichannel Systems» (Германия), которое широко используется во многих лабораториях мира для электрофизиологических исследований клеточных ансамблей, в том числе и нейронов.

Микроотверстия имеют размер 2 мкм, что много меньше размера клетки и позволяет проводить измерения в режиме пэтч-кламп. Проблема формирования массива микроотверстий, которые контактируют с клетками, была решена с использованием метода штамповой литографии.

Надежный контакт с клетками обеспечивается за счет того, что микроотверстия переходят в жидкостные каналы, проходящие сквозь всю систему, что позволяет, присасывать клетки к отверстиям при отрицательном давлении.

Внутри каждого канала расположен золотой электрод с выводом на индивидуальную контактную площадку. Каналы электрически изолированы друг от друга, что дает возможность одновременно измерять электрические сигналы от 60 клеток независимо друг от друга.

Достоинством является то, что клетки не имеют непосредственного контакта с металлом электродов, а контактируют с проводящей жид-

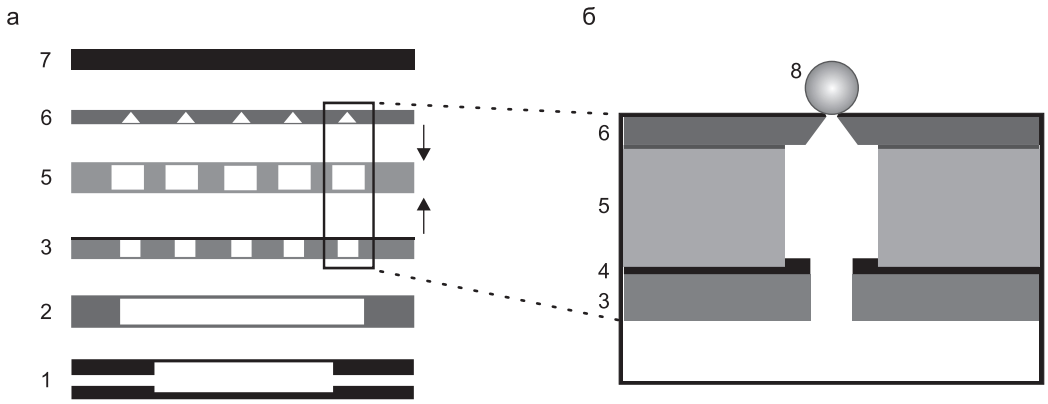


Рис. 1. Схема предлагаемой мультиэлектродной системы.

а – схема системы; б – увеличенный фрагмент пленочной структуры системы после сборки. Обозначение слоев (снизу вверх): 1– нижнее жесткое оргстекло с отверстием для присасывания клеток; 2 – печатная плата с внешними контактами; 3 – полимерная пленка с отверстиями диаметром 30 мкм и напыленными золотыми электродами; 4 – напыленные золотые контакты; 5 – слой из ПДМС с микроканалами диаметром 50 мкм; 6 – полипропиленовая мембрана с коническими отверстиями (верхняя часть отверстия менее 2 мкм); 7 – верхнее жесткое оргстекло; 8 – клетка.

Fig. 1. Scheme of proposed MEA device.

a – set of constituting layers; b – enlarged view of electrode site after assembling. Layer notations (bottom-up): 1 – rigid polymer substrate with fluid cavity and pumping channels; 2 – printed wire board with contact outlines; 3 – perforated flexible polymer foil (hole diameter is about 30 um); 4 – Au-electrodes and outline wires deposited on top of the layer (3); 5 – PDMS layer with microchannels of 50 um in diameter; 6 – perforated polypropylene membrane with conical shape holes (opening size of holes on top surface is less than 2 um); 7 – rigid polymer lid; 8 – attached cell.

костью в микроканале (ионным проводником), что повышает выживаемость клеток в процессе измерений.

На рис. 1 приведена схема разработанной матрицы. Система состоит из слоев: 1 и 2 – стеклянное основание со сквозным отверстием, обеспечивающее необходимую жесткость и возможность создания отрицательного давления для присоса клеток; 3 – полимерная пленка с напыленными золотыми электродами и дорожками-выводами (4) на периферию матрицы к контактным площадкам для подключения измерительных приборов. Электроды имеют площадки внутри каналов, что обеспечивает электрический контакт с жидкостью (остальная часть изолирована слоем (5)). В центральной части площадок в пленке с помощью лазера изготовлены сквозные отверстия, таким образом сформированы каналы сквозь все слои; 5 – слой из ПДМС (сформированный методом отливки), содержащий массив каналов диаметром 50 мкм; 6 – полипропиленовая мембрана с микроотверстиями, совмещенными с отверстиями полимерной пленки с электродами, на стороне пленки, контактирующей с клетками, диаметр отверстий составляет 2 мкм. Задача этой пленки – уменьшить размер (от 50 до 2 мкм) жидкостных каналов, к которым присасываются клетки. Полипропиленовая мембрана толщиной 15 мкм с микроотверстиями изготавливалась методом термического штампования с использованием штампа из массива кремниевых пирамид. В результате формировалась пленка со сквозными отверстиями от кремниевых пирамид, на выходе размер отверстий составлял менее 2 мкм.

Все слои необходимо было совместить между собой, чтобы совпали отверстия и сформировались сквозные каналы, и обеспечить надежное герметичное соединение. Проблема соединения слоев решалась с использованием технологии низкотемпературного химического бондинга.

Клетки контактируют непосредственно с микроотверстиями, соединенными с жидкостным каналом, а металлические электроды находятся на противоположном конце жидкостного канала. На рис. 2 показан общий вид системы и поле рабочих электродов. Клетки наносятся на чип, плотно присасываются к отверстиям с помощью насоса, после чего регистрируются ионные токи и потенциалы клеток. Был разработан

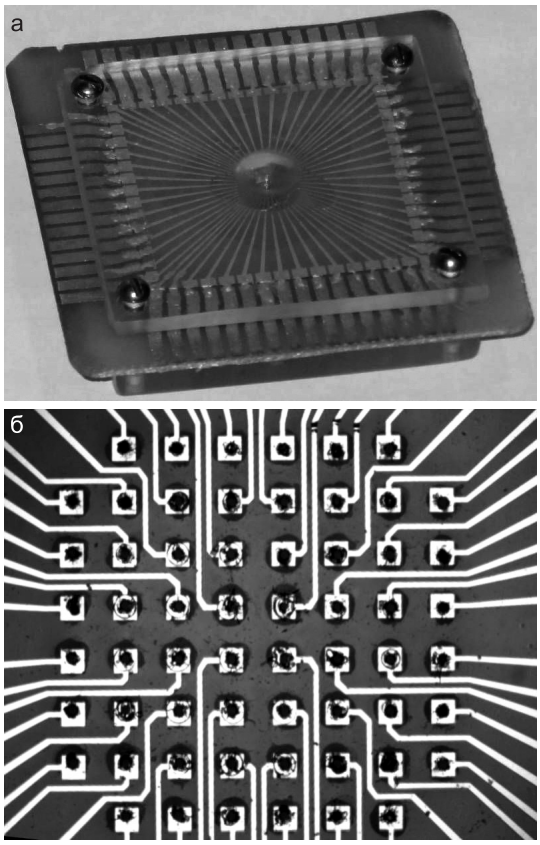


Рис. 2. Разработанная мультиэлектродная система для исследования нейронов на основе 60 жидкостных пэтч-кламп электродов.

а – общий вид; б – увеличенное изображение золотых микроэлектродов в центральной камере системы, каждый микроэлектрод имеет сквозное отверстие в центре квадратной площадки. Расстояние между площадками электродов 200 мкм.

Fig. 2. Fabricated MEA system for neuronal recording based on array of sixty planar 'patch-clamp' electrodes.

a – general view of assembled device; b – top view of arrayed Au-microelectrodes in working space of the device, each electrode has a through-hole in the middle of the squire shaped contact area. Spacing between the recording sites is about 200 um.

коммутатор на основе многоканального мультиплексора, позволяющий считывать сигналы путем опроса всех контактов поочередно.

С помощью разработанной и изготовленной матрицы проведены измерения на монослойной культуре нейронов, показавшие работоспособность системы. Система позволяет стимулировать нейроны и регистрировать ответную реакцию клеток в виде ионных токов или потенциалов действия. Часть клеток нейронной сети будут накрывать электродные сайты матрицы, которые можно использовать в режиме пэтч-кламп электродов. На рис. 3 показаны фрагмент матрицы с нейронами моллюска *Lymnaea stagnalis* и пример регистрации токов после стимулирующего воздействия. 9 электродных сайтов представляют собой металлизированную область (90 мкм) с отверстием внутри и отходящей металлической дорожкой. Клетки нейронов имеют сферическую форму (диаметр 40–60 мкм).

Предложенная конструкция матрицы сочетает возможности как исследования пространственно-временной динамики потенциалов в сетях нейронов на площади ~2 мм^2, так и регистрации потенциала и стимуляции локального участка мембраны индивидуальной клетки сети во временном масштабе, необходимом для разрешения тонкой структуры спайков.

Разработка массива вертикальных трубчатых микроэлектродов

Одной из назревших задач является формирование интерфейсов от нервной системы к компьютеру. В течение многих лет в ведущих лабораториях мира ведутся работы в этом направлении, однако задача является чрезвычайно сложной.

В настоящее время для получения электрического сигнала используются контактные площадки, металлические иглы и стеклянные капилляры. Каждый вариант имеет свои достоинства и недостатки. В качестве альтернативы вышеперечисленным инструментам мы предлагаем использовать микротрубки, свернутые из полупроводниковых GaAs/InGaAs пленок. Этот метод формирования микро- и нанотрубок путем сворачивания напряженных полупроводниковых пленок разработан в ИФП СО РАН (Prinz *et al*., 2000; Принц и др., 2008; Принц, 2013). Стенки трубки формирует изолирующая GaAs/InGaAs пленка, внутри трубки находится жидкость, таким образом, обеспечивается ионная проводимость канала трубки. Данные полупроводниковые нанотрубки (Prinz *et al*., 1998, 2000; Принц и др., 2003), свернутые из сверхтонких пленок, показали свою эффективность и малоинвазивность при работе с клетками (Prinz A.V., Prinz V.Ya., 2003; Prinz *et al*., 2003). Особенностью таких трубок являются

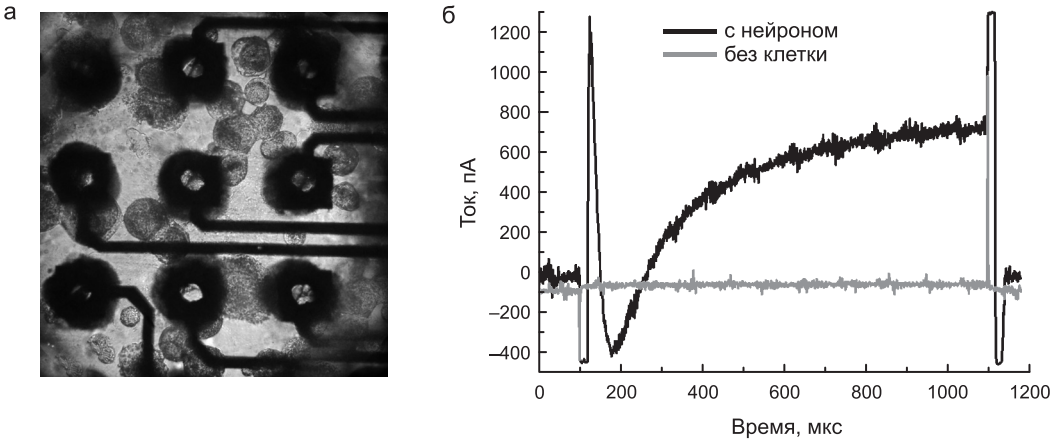


Рис. 3. Пример регистрации трансмембранных токов, полученных от матричного электрода после приложения к системе, стимулирующей разность потенциалов.

а – увеличенное изображение участка матрицы электродов с нейронами *Lymnaea stagnalis*; б – черная кривая на графике – сигнал, полученный от электрода, на котором находился нейрон; серая кривая – от электрода без клетки.

Fig. 3. Examples of recorded ion current transient response on external stimulus.

a – top view of selected MEA area populated with *Lymnaea stagnalis* neurons; b – black curve – signal from the electrode site occupied by neuron, gray curve – signal from an empty site.

высокая воспроизводимость геометрических параметров и механическая прочность; возможность массового изготовления с использованием развитых полупроводниковых технологий. Диаметр формируемых трубок определяется толщиной сворачиваемой гетеропленки и величиной упругих напряжений в ней. Достижимы диаметры от единиц нанометров до сотен микрометров. Для работы с клетками необходимы микротрубки субклеточного диаметра от 0,1 мкм до 2 мкм.

Высокая прочность микротрубок, свернутых их пленок Si/SiGe, была показана с использованием микроманипуляций под сканирующим электронным микроскопом (Zhang *et al*., 2008). Расчеты также показывают, что прочность микро- и нанотрубок на несколько порядков превышает необходимую для прокалывания клеток (Копылов, Принц, 2010).

Благодаря совместимости с полупроводниковыми технологиями достигается массовость изготовления; за счет малой толщины стенок трубок (несколько нм) клетка гораздо меньше повреждается механически.

На рис. 4 в тестовом эксперименте демонстрируется возможность использования единичной InGaAs/GaAs микротрубки в качестве внутриклеточного электрода.

Для изучения нейросетей и групп клеток необходимы двумерные массивы вертикальных микротрубок-электродов. Ранее в патенте Принц с соавт. (2008) предложили способ подъема свернутых трубок относительно подложки (рис. 5). Этот способ развили с целью формирования двумерных массивов вертикальных трубок. Суть способа заключается в том, что помимо области бипленки, предназначенной для сворачивания в трубку (прямоугольная область на подложке на рис. 5, а), формируют дополнительную область (треугольную область, примыкающую к прямоугольной), изгиб которой приводит к поднятию трубок над подложкой. При удалении жертвенного слоя сначала из прямоугольной напряженной бипленки на подложке сворачиваются трубки, которые затем поднимаются за счет изгиба дополнительной треугольной области бипленки (петли) у одного из концов трубки (рис. 5, а). Показанная на рис. 5, а конструкция неустойчива, более того, ее создание требует точного расчета; часто трубки не только поднимаются, но и переворачиваются (см. рис. 5, б). Для формирования более прочной конструкции из полимера Su 8 с помощью дополнительной литографии нами изготовлен стопорный элемент (стенка). Наличие этого элемента (см. рис. 5, в) позволяет не только

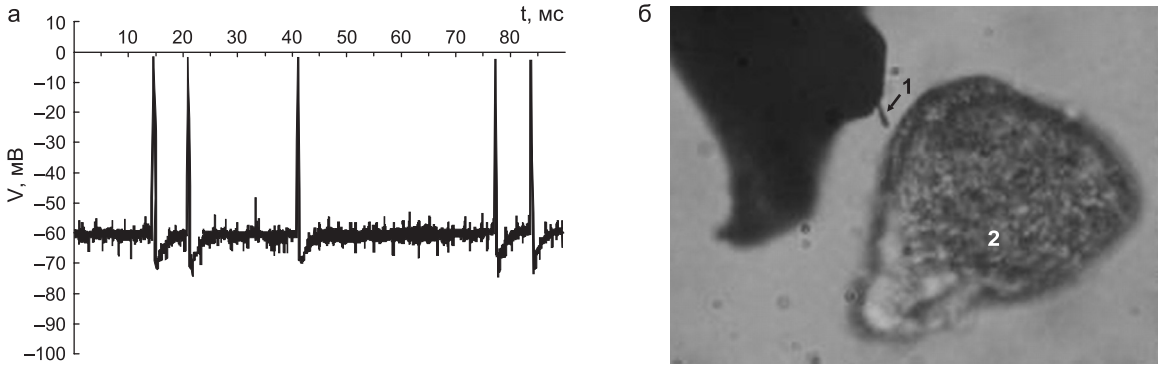


Рис. 4. Пример спонтанной активности нейронов, зарегистрированной с помощью внутриклеточной InGaAs/GaAs микротрубки (а). Оптическая фотография зонда (б) с микротрубкой (1), около клетки (2).

Fig. 4. Example of spontaneous activity of neuron (namely, membrane potential spikes) recorded with an intracellular InGaAs/GaAs microtube probe (a). Optical image (b) of microtube probe (1) nearby the target cell (2).

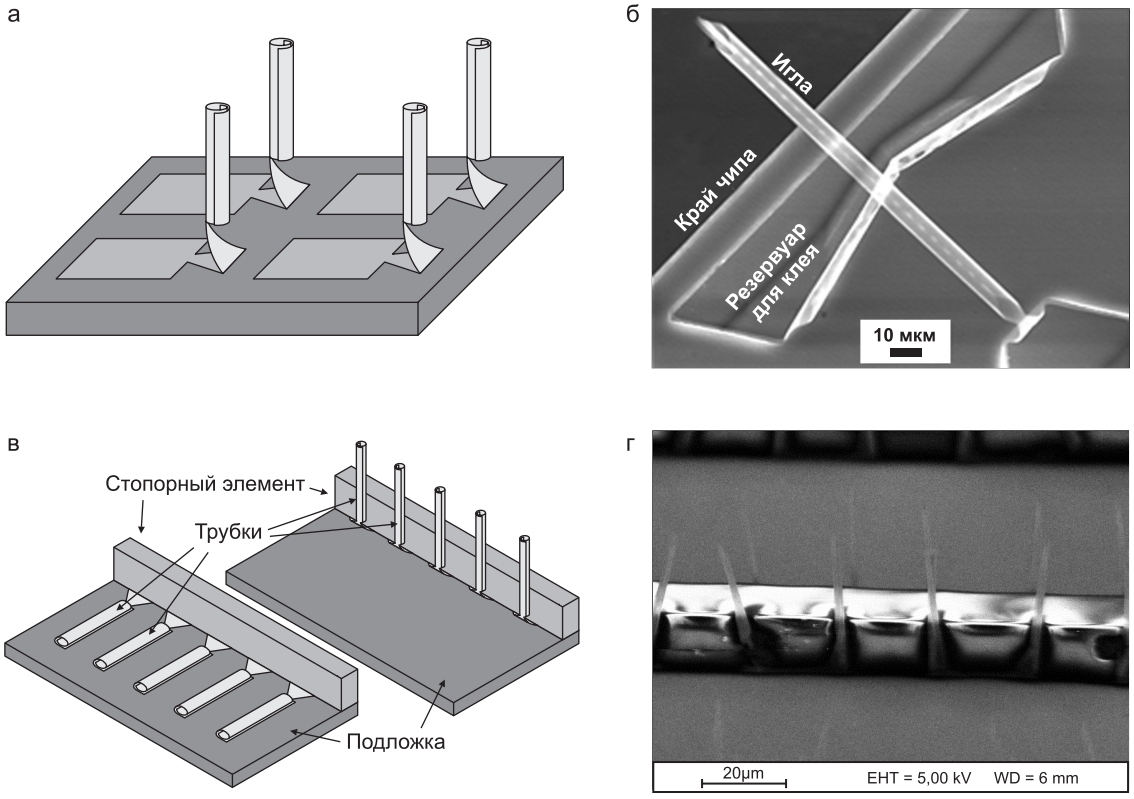


Рис. 5. Вертикальные микротрубки.

а – схематичное изображение трубок, поднятых в вертикальное положение; б – изображение трубки, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), у которой изгибающий момент дополнительного элемента оказался больше рассчитанного, что привело к перевороту трубки за край подложки (Принц и др., 2008); в – схематичная иллюстрация формирования массива вертикальных трубок с фиксацией в вертикальном положении; г – СЭМ изображение массива вертикальных трубок, свернутых из InGaAs/GaAs бипленки (Принц, 2013).

Fig. 5. Vertically standing microtubes.

a – schematic view of tubes put in a vertical position; b – scanning electron microscopy (SEM) image showing an example of tube overturned in opposite horizontal position, in this case the bending moment of auxiliary element was over the expected one (Prinz *et al*., 2008); c – schematic diagram showing the implemented approach to fix microtubes in vertical position; d – SEM image of arrayed vertically standing microtubes made by rolling up of InGaAs/GaAs bilayer film (Prinz, 2013).

остановить процесс подъема трубки, но и зафиксировать ее в вертикальном направлении.

На рис. 5, г приведено СЭМ изображение массива вертикальных микротрубок. К сожалению, под пучком электронов в электронном микроскопе происходит интенсивная зарядка высокоомного резиста Su-8 и непроводящих трубок, что приводит к появлению электростатических сил, которые изгибают и даже ломают трубки при длительном воздействии электронного пучка. Этот эффект значительно затрудняет получение контрастных электронно-микроскопических снимков. Плотность массива вертикальных трубок при использованных нами литографических размерах достигает 70–80 тыс. трубок на см^2. В реализованном нами технологическом маршруте длина трубок составляет 40 мкм.

В отличие от разработки интерфейса, который описан в предыдущем разделе, разработка плотного массива вертикальных трубок является только составляющей, хотя и важнейшей на пути создания нейроинтерфейсов нового поколения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ современного состояния проблемы формирования нейроинтерфейсов. Разработан, изготовлен и испытан нейроинтерфейс, содержащий 60 жидкостных пэтч-кламп электродов. Разработан массив вертикальных трубок с плотностью 70 тыс. трубок на см^2, предназначенных для формирования нейроинтерфейсов нового поколения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана Интеграционным проектом СО РАН № 136.

ЛИТЕРАТУРА

Копылов А.В., Принц В.Я. Графен-полупроводниковые трубчатые иглы для работы с живыми клетками // Вестн. НГУ. Сер. Физика. 2010. Т. 5. № 1. С. 91–96.
Kopylov A.V., Prinz V.Ya. Graphene-semiconductor tubular needles for operation on living cells // Vestnik NGU. Seriya: fisika. 2010. V. 5. No. 1. P. 91–96 (In Russian).

Принц А.В. Метод формирования массива длинных вертикальных полупроводниковых микротрубок // Нано- и микросистемная техника. 2013. № 10. С. 5–7.
Prinz A.V. Method for fabrication of array of extended semiconductor microtubes // Nano- i mikrosistemnaya tekhnika. 2013. No. 10. P. 5–7 (In Russian).

Принц В.Я., Голод С.В., Принц А.В. Полая игла в интегральном исполнении и ее изготовление: Патент России № 2341299. 2008.
Prinz V.Ya., Golod S.V., Prinz A.V. Integrated hollow needle and method for its fabrication // Patent Rossii. 2008. No. 2341299 (In Russian).

Принц В.Я., Селезнев В.А., Чеховский А.В. Самоформирующиеся полупроводниковые микро- и нанотрубки // Микросистемная техника. 2003. № 6. С. 29–34.
Prinz V.Ya., Seleznev V.A., Chekhovski A.V. Self-forming of semiconductor micro- and nanotubes // Mikrosistemnaya tekhnika. 2003. No. 6. P. 29–34 (In Rissian).

Aregueta-Robles U.A., Woolley A.J., Poole-Warren L.A. *et al.* Organic electrode coatings for next-generation neural interfaces // Front. Neuroeng. 2014. V. 7. article 15 (18P.), DOI: 10.3389/fneng.2014.00015.

Aryasomayajula A., Perike S., Henselc R., Posseckardt J., Gerlach G., Funk H.W. A novel patch micro electrode array for sensing ionic membrane currents // Proc. Eurosensors XXV. September 4–7, 2011. Athens, Greece.

Baranauskas G., Maggiolini E., Castagnola E. *et al.* Carbon nanotube composite coating of neural microelectrodes preferentially improves the multiunit signal-to-noise ratio // J. Neural Eng. 2011. V. 8. 066013.

Bareket-Keren L., Hahein Y. Carbon nanotube-based multi electrode arrays for neuronal interfacing: progress and prospects // Front. Neural Circuits. 2013. V. 6. article 122 (16P.), DOI: 10.3389/fncir.2012.00122.

Bruggemann A., George M., Klau M., Beckler M., Steindl J., Behrends J.C., Fertig N. High quality ion channel analysis on a chip with the NPC technology // Assay Drug Dev. Technol. 2003. V. 1. No. 5. P. 665–673.

Brunetti V., Maiorano G., Rizello L. *et al*. Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. No. 14. P. 6264–6269.

Buzsaki G. Large-scale recording of neuronal ensembles // Nat. Neurosci. 2004. V. 7. P. 446–451.

Buzsaki G., Anastassiou C.A., Koch C. The origin of extracellular fields and currents – EEG, ECoG, LFP and spikes // Nat. Rev. Neurosci. 2012. V. 13. P. 407–420.

Campbell P.K., Jones K.E., Huber R.J. *et al*. A silicon-based, three-dimensional neural interface: manufacturing processes for an intracortical electrode array // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1991. V. 38. P. 758–768.

Carandini M. From circuits to behavior: a bridge too far? // Nat. Neurosci. 2012. V. 15. No. 4. P. 507–509.

Chandrakasan A.P., Verma N., Daly D.C. Ultralow-power electronics for biomedical applications // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008. V. 10. P. 247–274.

Chang C.-W., Chiou J.-C. Development of a three dimensional neural sensing device by a stacking method // Sensors. 2010. V. 10. P. 4238–4252.

Cogan S.F. Neural stimulation and recording electrodes // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2008. V. 10. P. 275–309.

Cullen D.K., Wolf J.A., Vernekar V.N. *et al*. Neural tissue engineering and biohybridized microsystems for neurobiological investigation *in vitro* (Part 1) // Crit. Rev. Biomed. Eng. 2011. V. 39. P. 201–240.

Dale T.J., Townsend C., Hollands E.C., Trezise D.J. Population patch clamp electrophysiology: a breakthrough technology for ion channel screening // Mol. Biosyst. 2007. V. 3. P. 714–722.

Du J.G., Blanche T.J., Harrison R.R. *et al*. Multiplexed, high density electrophysiology with nanofabricated neural probes // PloS ONE. 2011. V. 6. No. 10. e26204.

Du J.G., Roukes M.L., Masmanidis S.C. Dual-side and three-dimensional microelectrode arrays fabricated from ultra-thin silicon substrates // J. Micromech. Microeng. 2009. V. 19. 075008.

Fertig N., Blick RH., Behrends J.C. Whole cell patch clamp recording performed on a planar glass chip // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 3056–3062.

Fertig N., Tilke A., Blick R.H., Kotthaus J.P., Behrend J.C., ten Bruggencate G. Stable integration of isolated cell membrane patches in a nanomachined aperture // Appl. Phys. Lett. 2000. V. 77. P. 1218–1220.

Grill W.M., Norman S.E., Bellamkonda R.V. Implanted neural interfaces: biochallenges and engineered solutions // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2009. V. 11. P. 1 24.

Guthrie H., Livingston F.S., Gubler U., Garippa R. A place for high-throughput electrophysiology in cardiac safety: screening hERG cell lines and novel compounds with the IonWorks HT system // J. Biomol. Screen. 2006. V. 10. No. 8. P. 832–840.

Henze D.A., Borhegyi Z., Csicvari J. *et al*. Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus *in vivo* // J. Neurophysiol. 2000. V. 84. P. 390–400.

Herwik S., Kisban S., Aarts A.A.A. *et al*. Fabrication technology for silicon-based microprobe arrays used in acute and sub-chronic neural recording // J. Micromech. Microeng. 2009. V. 19. 074008.

Hubel D.H. Tungsten microelectrode for recording from single units // Science. 1957. V. 125. P. 549–550.

John V.H., Dale T.J., Hollands E.C., Chen M.X., Partington L., Downie D.L., Meadows H.J., Trezise DJ. Novel 384-well population patch clamp electrophysiology assays for Ca^{2+}-activated K^+ channels // J. Biomol. Screen. 2007. V. 12. P. 50. DOI: 10.1177/1087057106294920.

Kiss L., Bennett P.B., Uebele V.N., Koblan K.S., Kane S.A., Neagle B., Schroeder K. High throughput ion-channel pharmacology: planar-array-based voltage clamp // Assay Drug Dev. Technol. 2003. V. 1. P. 127–135.

Klemic K.G., Klemic J.F., Reed M.A., Sigworth F. Micromolded PDMS planar electrode allows patch clamp electrical recordings from cells // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. P. 597–604.

Lai H.-Y., Liao L.-D., Lin C.-T. *et al*. Design, simulation and experimental validation of a novel flexible neural probe for deep brain stimulation and multichannel recording // J. Neural Eng. 2012. V. 9. 036001 (15 p.).

Lebedev M.A., Nicolelis A.L. Brain-machine interfaces: Past, present and future // Trends Neurosci. 2006. V. 29. No. 9. P. 536–546.

Lee C.K., Huguenard J.R. Martinotti cells: community organizers // Neuron. 2011. V. 69. No. 6. P. 1042–1045.

Lehnert T., Gijs M.A.M., Netzer R., Bischoff U. Realization of hollow SiO_2 micronozzle for electrical measurements on living cells // Appl. Phys. Lett. 2002. V. 81. P. 5063–5065.

Levy R.B., Reyes A.D. Spatial profile of excitatory and inhibitory synaptic connectivity in mouse primary auditory cortex // J. Neurosci. 2012. V. 32. No. 16. P. 5609–5619.

Li X., Klemic K.G., Reed M.A., Sigworth F.J. Microfluidic system for planar patch clamp electrode arrays // Nano Lett. 2006. V. 6. No. 4. P. 815–819.

Ludwig K.A., Langhals N.B., Joseph M.D. *et al*. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) polymer coatings facilitate smaller neural recording electrodes // J. Neural Eng. 2011. V. 8. 014001.

Maccione A., Gandolfo M., Tedesco M. *et al*. Experimental investigation on spontaneously active hippocampal cultures recorded by means of high-density MEAs: analysis of the spatial resolution effects // Front. Neuroeng. 2010. V. 3. article 4, P. 1–12, DOI: 10.3389/fneng.2010.00004.

Martina M., Luk C., Py C., Martinez D., Comas T., Monette R., Denhoff M., Syed N., Mealing G.A. Recordings of cultured neurons and synaptic activity using patch-clamp chips // J. Neural Eng. 2011. V. 8. 034002, (10 p).

Martinez D., Py C., Denhoff M.W., Martinac M., Monette R., Comas T., Luk C., Syed N., Mealing G. High-fidelity patch-clamp recordings from neurons cultured on a polymer microchip // Biomed. Microdevices. 2010. 12:977-985DOI 10.1007/s10544-010-9452-z.

McCarthy P.T., Rao M.P., Otto K.J. Simultaneous recording of rat auditory cortex and thalamus via a titanium-based, microfabricated, microelectrode device // J. Neural. Eng. 2011. V. 8. 046007.

Najafi K., Wise K.D. Mochizuki T. A high-yield IC-compatible multichannel recording array // IEEE Trans. Electron. Devices. 1985. V. 32. P. 1206–1211.

Napoli A., Xie J., Obeid I. Understanding the temporal evolution of neuronal connectivity in cultured networks using statistical analysis // BMC Neuroscience. 2014. V. 15. No. 1. P. 17–27.

Nicolelis M.A.L., Dimitrov D., Carmena J.M. *et al*. Cronic, multisite, multielectrode recordings in macaque monkeys // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 11041– 11046.

Oberlaender M., Boudewijns Z., Kleelec T. *et al*. Three-dimensional axon morphologies of individual layer 5 neuron indicate cell type-specific intracortical pathways for whisker motion and touch // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. No. 10. P. 4188–4193.

Pantoja R., Nagarah J.M., Starace D.M., Melosh N.A., Blunck R., Bezanilla F., Heath J.R. Silicon chip-based patch-clamp electrodes integrated with PDMS microfluidics // Biosens. Bioelectron. 2004. V. 20. P. 509–517.

Prinz A.V., Prinz V.Ya. Application of semiconductor micro- and nanotubes in biology // Surface Science. 2003. V. 532–535. P. 911–915.

Prinz A.V., Prinz V.Ya., Seleznev V.A. Semiconductor micro- and nanoneedles for microinjections andink-jet printing // Microelectronic Engineering. 2003. V. 67/68. P. 782–788.

Prinz V.Ya., Seleznev V.A., Gutakovsky A.K. Self-formed InGaAs/GaAs Nanotubes: Concept, Fabrication, Properties // Proc. of the 24th Intern. Conf. on the Physics of Semiconductors / Ed. D. Gershoni. World Scientific, Singapore, 1998.

Prinz V.Ya., Seleznev V.A., Gutakovsky A.K., Chehov-

skiy A.V., Preobrazenskii V.V., Putyato M.A., Gavrilova T.A. Free-standing and overgrown InGaAs/GaAs nanotubes, nanohelices and their arrays // Physica E. 2000. V. 6. No. 1/4. P. 828–831.

Py C., Denhoff M.W, Martinac M., Monette R., Comas T., Ahuja T., Martinez D., Wingar S., Caballero J., Laframboisea S., Mielkec J., Bogdanov A., Luk C., Syed N., Mealing G. A novel silicon patch-clamp chip permits high-fidelity recording of ion channel activity from functionally defined neurons // Biotechnology and Bioengineering. 2010. V. 107. No. 4. P. 593–600.

Py C., Denhoff M.W., Sabourin N., Weber J., Shiu M., Zhao P. Priming and testing silicon patch-clamp neurochips // New Biotechnol. 2014. V. 31. No. 5. P. 430–435. doi: 10.1016/j.nbt.2014.04.003.

Rutten W.L.C. Selective electrical interfaces with the nervous system // Annu. Rev. Biomed. Eng. 2002. V. 4. P. 407–452.

Ruz I.D., Schulz S.R. Localizing and classifying neurons from high density MEA recordings // J. Neurosci. Methods. 2014. V. 233. P. 115–128.

Sarpeshkar R., Wattanapanitch W., Arfin S.K. *et al*. Low-power circuits for brain-machine interfaces // IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst. 2008. V. 2. No. 3. P. 173–183.

Schwartz A.B. Cortical neural protheses // Annu. Rev. Neurosci. 2004. V. 27. P. 487 507.

Schwartz A.B., Weber D.J., Cui X.T. *et al*. Brain-controlled interfaces: Movement restoration with neural prosthetics // Neuron. 2006. V. 52. P. 205–220.

Seo J., Ionescu-Zanetti C., Diamond J., Lal R., Lee L.P. Integrated multiple patch-clamp array chip via lateral cell trapping junctions // Applied Physics Letters. 1973. (2004) V. 84. P. 1973. doi: 10.1063/1.1650035.

Shoham S., O'Connor D.H., Segev R. How silent is the brain: is there a «dark matter» problem in neuroscience? // J. Comp. Physiol. A. 2006. V. 192. P. 777–784.

Sodagar A.M., Wise K.D., Najafi K. A wireless implantable microsystem for multichannel neural recording // IEEE Trans. Microwave Theory Tech. 2009. V. 57. No. 10. P. 2565–2573.

Spitzer N.C. Electrical activity in early neuronal development // Nature. 2006. V. 444. No. 7120. P. 1207–1214.

Urbanova V., Li Y., Vytras K. *et al*. Macroporous microelectrode arrays for measurements with reduced noise // J. Electroanalyt. Chem. 2011. V. 656. P. 91–95.

Wattanapanitch W., Fee M.S., Sarpeshkar R. An energy-efficient micropower neural recording amplifier // IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst. 2007. V. 1. No. 2. P. 136–147.

Weiland J.D., Humayun M.S. Visual prothesis // Proc. IEEE. 2008. V. 96. No. 7. P. 1076-1084.

Wise K.D., Sodagar A.M, Yao Y. *et al*. Microelectrodes, microelectronics and implantable neural microsystems // Proc. IEEE. 2008. V. 96. No. 7. P. 1184–1202.

Xu J., Guia A., Rothwarf D., Huang M., Sithiphong K., Ouang J., Tao G., Wang X., Wu L. A benchmark study with sealchip planar patch-clamp technology // Assay Drug Dev. Technol. 2003. V. 1. No. 5. P. 675–684.

Zemianek J.M., Serra M., Guaraldi M. *et al*. Stimulation with a low-amplitude, digitized synaptic signal to invoke robust activity within neuronal network on multielectrode arrays // Biotechniques. 2012. V. 52. No. 3. P. 177–182.

Zeng F.-G., Rebscher S., Harrison W. *et al.* Cochlear implants: System design, integration, and evolution // IEEE Rev. Biomed. Eng. 2008. V. 1. P. 115–142.

Zhang L., Dong L., Nelson B.J. Bending and buckling of rolled-up SiGe/Si microtubes using nanorobotic manipulation // Appl. Phys. Lett. 2008. V. 92. 243102.

NEUROINTERFACES: REVIEW AND DEVELOPMENT

S.N. Rechkunov[1], A.V. Prinz[1], V.A. Seleznev[1], S.V. Golod[1], R.A. Soots[1], A.I. Ivanov[1], A.S. Ratushnyak[2], V.Ya. Prinz[1]

[1] Rzhanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: prinz@isp.nsc.ru;
[2] Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Electrical activity seems to be the key issue for disclosing information processing mechanisms in neuronal networks; however, the related phenomena such as long-term memory, learning behavior and synaptic plasticity have not been adequately understood yet on cellular level. A great challenge in the fundamental research and practical implementation of those phenomena is to build up multi-electrode array (MEA) devices for simultaneous neuronal recordings and stimulation. We outline the state-of-the-art MEA designs, development trends, and benefits and shortcomings of the MEA concept. As a rule, the general task in neuro-interface designing is to achieve biocompatible, low-invasive interface performance and the spatio-temporal resolution. In this paper, we propose and describe two innovative neuro-interface designs. One of these designs is introduced as a conceptual device based on a dense array of vertically standing semiconductor microtubes which can be implemented in future in vivo interfaces. Another design is a pilot in vitro MEA device formed by 60 planar 'patch-clamp' electrode sites.

Here, we report results of neuron-signal measurements performed with the help of patch-clamp sucker electrodes, each of the electrodes presenting a kind of a 2-μm diameter pipette that can be used for making contacts to cell membranes. An advantageous feature of the method consists in that the treated cells have no immediate contact with the metal as they contact with the microchannel conducting liquid, or ionic conductor; the latter approach ensures more adequate measurements and, simultaneously, it improves the cell survivability during measurements.

Key words: patch clamp electrodes, neurointerface, brain-computer interface, semiconductor nanotube array.

УДК 612.822.3

СИНЕРГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ИОНОВ МАГНИЯ И АМИДА ЛАМБЕРТИАНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НМДА ТИПА ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

© 2014 г. **Т.А. Запара[1], С.О. Вечкапова[1, 2], А.Л. Проскура[1], А.С. Ратушняк[1]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: zapara_t@mail.ru

Поступила в редакцию 8 октября 2014 г. Принята к публикации 10 ноября 2014 г.

Наиболее распространенные нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, рассеянный склероз, эпилепсия, ишемические поражения мозга, хотя и вызваны различными механизмами, но могут использовать общий путь – нарушения ионотропных глутаматных рецепторов, особенно НМДА подтипа. В настоящее время активно разрабатываются препараты с глутаматергическим механизмом действия для лечения когнитивных расстройств и нейродегенеративных процессов. Цель работы заключалась в исследовании эффектов амида ламбертиановой кислоты на глутаматергическую синаптическую передачу. Проведен анализ функциональной интеграции глутаматных и немедиаторных рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа. Доминирующим типом функционирования рецепторов плазматической мембраны является интеграция воздействий медиаторов многочисленных внешних и внутренних факторов и совместное использование сигнальных путей. На срезах гиппокампа мыши показано, что амид ламбертиановой кислоты не препятствует развитию НМДА рецептор-зависимой синаптической потенциации, проявляет нейропротекторное свойство, нормализуя эпилептиформную активность, вызванную отсутствием эндогенного лиганда (ионов магния) ионного канала НМДА-рецепторов. Возможно, ламбертиановая кислота, выделяемая из хвои и живицы сибирского кедра (*Pinus sibirica* R. Mayr), и ее производные могут стать источником доступных препаратов с глутаматергическим механизмом действия для лечения когнитивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: синаптическая пластичность, долговременная потенциация, глутаматные рецепторы, блокаторы ионных каналов, амид ламбертиановой кислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные рецепторы – это молекулы, расположенные на поверхности плазматической мембраны нейронов. Клеточные рецепторы специфически реагируют изменением своей пространственной конфигурации на присоединение к ним молекул определенного химического вещества, нейромедиаторов, гормонов, нейропептидов, экзогенных веществ и передают этот сигнал внутрь клетки, обычно при помощи механизма так называемых вторичных посредников или с помощью трансмембранных ионных токов (Зинченко, Долгачева, 2003; Сидоров, 2008).

Химические вещества, специфически взаимодействующие с рецепторами, называются лигандами этих рецепторов. Как правило, рецепторы способны связываться не только с основными эндогенными лигандами, но и с другими структурно сходными молекулами. Этот факт позволяет использовать экзогенные

вещества, связывающиеся с рецепторами и меняющие их состояние, в качестве лекарств. Рецептор, как правило, имеет несколько участков или «сайтов» связывания со специфичными для этого рецептора лигандами (например нейромедиаторами). Кроме того, рецепторный комплекс может иметь и дополнительные аллостерические регуляторные участки, с которыми взаимодействуют другие химические вещества (Зинченко, Долгачева, 2003; Сидоров, 2008).

Вещества, посредством которых осуществляется передача электрического импульса через синаптическое пространство между нейронами, называются медиаторами (нейротрансмиттерами). Медиаторы накапливаются в пресинаптических окончаниях в везикулах. Нервный импульс, поступающий в пресинаптическое окончание, вызывает освобождение медиатора из пресинаптических везикул в синаптическую щель. Молекулы медиаторов реагируют со специфическими рецепторными молекулами клеточной мембраны постсинаптического нейрона. Ионотропные рецепторы медиаторов являются рецепторно-канальными белковыми комплексами. Молекулы медиаторов, взаимодействуя со специфическими сайтами ионотропных рецепторов, вызывают изменение трансмембранного тока ионов. В случае трансмембранного тока ионов натрия или кальция (вторичного посредника) происходят деполяризация мембраны и возникновение потенциала действия постсинаптического нейрона (Зинченко, Долгачева, 2003; Сидоров, 2008).

Гиппокамп принимает участие в процессах обучения, формирования памяти у человека и животных, является центральной структурой лимбической системы мозга и мишенью факторов, которые оказывают влияние как на поведение, так и на висцеральные реакции (Виноградова, 1975).

Основные структуры гиппокампа включают зубчатую извилину и Аммонов рог, также называемый Cornus Ammonis (CA), содержащий поля CA 1, 2 и 3. Все подполя гиппокампа демонстрируют явление, известное как синаптическое долгосрочное потенцирование (ДП), которое является основой обучения и консолидации памяти (Malenka, 2003). В глутаматергических синапсах CA3-CA1 пирамидных нейронов ДП возникает после интенсивного и непродолжительного выброса медиатора глутамата, например, в результате высокочастотной стимуляции афферентных входов пирамидных нейронов гиппокампа поля CA1 (Sweatt, 1999).

ОРГАНИЗАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ

Большинство возбуждающих синапсов ЦНС млекопитающих являются глутаматергическими. Постсинаптическая мембрана синапса – это первое место, где обрабатывается и сохраняется информация (Kennedy, 2000). Дендритные шипики представляют собой наименьший функционально независимый химический отсек, обеспечивающий субстрат для реализации локальных правил обучения, которые могут быть ограничены отдельными активированными синапсами (Koch, Segev, 2000).

Основными ионотропными рецепторами глутамата синапсов являются НМДА и АМРА рецепторы (НМДАР и АМПАР), названные по агонистам (N-метил-D-аспарагиновая кислота и α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолепропионовая кислота соответственно). В зрелых гиппокампальных нейронах АМПАР представлены тремя типами субъединиц (GluR1-3). В состав рецептора входят четыре субъединицы, объединенные в два димера. В шипиках обнаруживают три типа АМПАР: 1/2 (GluR1/GluR2); 2/3 (GluR2/GluR3) и 1/1 (GluR1/GluR1) (Shi, 2001). До индукции ДП в зоне синаптической мембраны присутствуют АМПАР типа 2/3, проницаемые для Na^+. АМПАР типа 1/2 (проницаемые для Na^+) встраиваются в активную зону синапса при развитии ДП.

Взаимодействие глутамата с этими рецепторами в миллисекундном интервале времени изменяет мембранный потенциал, что в конечном счете индуцирует распространение сигнала (Lai, Jan, 2006). Активация АМПАР глутаматом инициирует вход Na^+, что приводит к достаточной для срабатывания НМДАР деполяризации синаптической мембраны и входу Ca^{2+} в шипик (Nowak *et al*., 1984).

НМДАР обладают рядом особенностей: одновременно хемо- и потенциал-чувствительностью, медленной динамикой запуска и длительностью эффекта, способностью к временной суммации и усилению вызванного потенциала.

Ионы магния селективно блокируют активность рецепторов при потенциале покоя, высокой гиперполяризации или деполяризации. Наибольшие ионные токи при активации агонистами возникают при деполяризации мембраны в узком диапазоне от –30 до –20 мВ (в этом проявляется потенциал-зависимость НМДАР) (Nowak *et al.*, 1984). НМДАР является рецепторно-канальным комплексом, включающим: сайт специфического связывания медиатора (L-глутаминовой кислоты), регуляторный, или коактивирующий, сайт связывания глицина, полиаминовый аллостерический модуляторный сайт, сайты связывания фенциклидина, цинка и потенциал-зависимый Mg^{2+} связывающий участок в ионном канале (Racca *et al*., 2000). Для нормальной работы рецепторно-канального комплекса кроме медиатора необходимо присутствие вышеперечисленных факторов.

Таким образом, ионы магния функционируют в качестве переключателя. Внеклеточные Mg^{2+} держат ионный канал НМДАР заблокированным при нормальном потенциале покоя, но позволяют Ca^{2+} проходить через этот трансмембранный канал, когда активация рецептора имеет черты, необходимые для процессов обучения. То есть на уровне специфической белковой молекулы реализуется временная и пространственная конвергенция (суммация) внешних воздействий и собственного состояния клетки (Dingledine *et al*., 1999). Деполяризационное смещение потенциала покоя нейрона, вызванное, например, недостаточным снабжением кислородом, приводит к аберрантному проникновению сигнальных молекул (Ca^{2+}) в нейрон. Приток Ca^{2+} через НМДАР, индуцируемый синаптической активностью, необходим для многих типов синаптической пластичности и лежит в основе некоторых форм обучения и памяти. Однако чрезмерный приток Ca^{2+} может привести к эксайтотоксической гибели клеток. Предполагают, что опосредованные НМДАР процессы вносят определенный вклад в нейродегенеративные и психоневрологические расстройства (Dingledine *et al*., 1999; Krystal *et al*., 2003; Moghaddam, Jackson, 2003).

Перемещению АМПАР в плоскости мембраны, их встраиванию (эндо/экзоцитоз) в зону синаптической мембраны придается решающее значение в долгосрочной синаптической пластичности (Kessels, Malinow, 2009). Полагают, что этот процесс лежит в основе обучения и памяти. Количество и субъединичный состав постсинаптических АМПАР способны определить зависимые от активности изменения, отвечающие за ДП (Bredt, Nicoll, 2003).

Анализ данных о работе гиппокампа позволяет прийти к выводу, что на клеточном уровне доминирующим типом функционирования является интеграция воздействий селективных сигнальных молекул (медиаторов) с многочисленными внешними и внутренними факторами.

При таком типе функционирования нейрональных клеток нарушения, вызванные отдельными видами рецепторов, приводят к патологическим изменениям, связанным с нейродегенеративными заболеваниями, которые часто сопровождаются когнитивными расстройствами и деменциями. Наиболее распространенные нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, рассеянный склероз, эпилепсия, ишемические поражения мозга, хотя и вызваны различными механизмами, но могут совместно использовать общий путь – нарушения ионотропных глутаматных рецепторов, особенно НМДАР (Mehta *et al*., 2012). При расстройствах, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями, предполагается, что хронические воздействия умеренно повышенных концентраций глутамата или гиперактивность глутаматных рецепторов на более длительные периоды времени, чем это имеет место при нормальной нейротрансмиссии, запускают клеточные процессы в нейронах, которые в конечном итоге приводят к апоптозоподобной гибели клеток. Такая ситуация, как правило, возникает при деполяризационном смещении потенциала покоя нейронов, что может быть вызвано недостаточным энергообеспечением, возрастными изменениями, различными повреждениями нейронов. В этих условиях снимается нормальный Mg^{2+} блок ионного канала и, таким образом, аномально увеличиваются продолжительность активности НМДАР и поступление Ca^{2+} в нейрон (Zeevalk, Nicklas, 1992). Сложность снижения поступления Ca^{2+} через НМДАР состоит в том, что те же процес-

сы, которые при высоких уровнях приводят к эксайтотоксичной гибели клеток, являются при физиологических уровнях абсолютно необходимыми для нормального функционирования нейронов.

Для клинического применения разрешен только один препарат с глутаматергическим механизмом действия – мемантин. Он способен блокировать эксайтотоксическую гибель клеток и не нарушать физиологические процессы (Chen *et al*., 1992). Препараты с действующим веществом мемантином (Акатинол, Канон) рекомендованы для лечения деменции, склероза, снижения памяти у взрослых и детей, начальных стадий болезни Альцгеймера**.**

Для ламбертиановой кислоты и ее производных в настоящее время выявлен широкий спектр биологической активности: она стимулирует исследовательское поведение животных в тесте «открытого поля»; в модели висцеральной боли выявлено ее обезболивающее и антиоксидантное действие. Для азотсодержащих производных показано ее ноотропное и нейротропное действие (Толстикова и др., 2000, 2001, 2004; Tolstikova *et al*., 2004). Амид ламбертиановой кислоты (АмЛК) в условиях социального дискомфорта оказывает выраженный стресс-протекторный эффект: повышает коммуникативность, двигательную активность животных, уменьшает гипертрофию надпочечников (Августинович и др., 2014). Ламбертиановую кислоту получают из кедра сибирского (*Pinus sibirica* R. Mayr). Она является легкодоступным растительным метаболитом (Толстиков и др., 2002).

Однако, несмотря на выявленный широкий спектр биологической активности ламбертиановой кислоты, и в частности амида ламбертиановой кислоты (АмЛК), механизмы их действия на структуры мозга и отдельные медиаторные системы остаются неисследованными. Анализ принципов и механизмов функционирования глутаматергических нейронов, а также широкий спектр биологической активности амида ламбертиановой кислоты и ее производных позволили сделать предположение, что это вещество может обладать глутаматергическим механизмом действия. Целью экспериментальной части этой работы была проверка такого предположения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на срезах гиппокампа двухмесячных самцов мышей линии ICR с соблюдением «Правил работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Министерства здравоохранения № 755 от 12.08.1977). Использовали животных, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН.

Приготовление срезов выполнялось по стандартной методике. Извлеченный после декапитации мозг переносили в охлажденный до 0–4 °C аэрированный (95 % O_2, 5 % CO_2) физиологический раствор. Поперечные срезы гиппокампа (толщиной 300–350 μм) помещали в проточную (1,5 мл/мин, 30–31 °C) камеру, физиологический раствор насыщался карбогеном и содержали (в мМ): NaCl – 129; KCl – 2,25; $CaCl_2$ – 2,4; $MgSO_4$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 26; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; pH 7,6–7,8.

Перед началом основного эксперимента для каждого среза определяли пороговую силу стимула и зависимость амплитуды ответа от величины стимула. В ходе основного эксперимента использовали интенсивность тестирующего стимула, при которой амплитуда ответов не превышала 50 % от максимально возможной амплитуды. Организованная таким образом электрическая стимуляция и внеклеточная запись активности нейронов отражают синхронную реакцию – популяционный спайк (п-спайк) пирамидных нейронов, расположенных под регистрирующим микроэлектродом.

Стимуляция коллатералей Шаффера и регистрация вызванных п-спайков пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа производились через внеклеточные микроэлектроды, заполненные физиологическим раствором.

Для устранения магниевого блока с ионотропных глутаматных НМДАР использовали физиологический раствор, не содержащий ионов магния. На коллатерали Шаффера подавали стимул, при этом в нормальном растворе регистрировали одиночный п-спайк максимальной амплитуды. В безмагниевом растворе после 5–20 мин инкубации при стимуле тех же параметров регистрировали серию п-спайков.

Тетанизация коллатералей Шаффера осуществлялась с помощью электрической стиму-

ляции в течение 1 с с частотой 100 Гц стимулом, при котором амплитуда п-спайков не превышала 50 % от максимальной. Стимул такой же амплитуды использовался для тестирования ответов после потенциации.

АмЛК (синтезирован в лаборатории медицинской химии НИОХ СО РАН) растворяли в 50 μл этанола, затем по каплям, постоянно перемешивая, добавляли к физиологическому раствору. Эквивалентное количество этанола добавлялось в физиологический раствор в группах сравнения. Используемая концентрация АмЛК составляла 170 μM.

Мемантин, МК-801 (Sigma) использовали в концентрациях 100 μM и 10 μM соответственно.

Внеклеточные сигналы усиливались с помощью усилителя (Nihon Kohden.mez-8201, Япония). Регистрацию данных проводили с использованием аналого-цифрового преобразователя (L-CARD, Россия).

Полученные данные представлены как средняя величина ± стандартная ошибка среднего. Для оценки достоверности отличий между группами использовали U-критерий Манна–Уитни для каждой временной точки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы определить, может ли АмЛК нормализовать функционирование НМДА-рецептор-канального комплекса при отсутствии эндогенного лиганда, взаимодействующего с сайтом связывания, находящимся в канальной части рецепторной молекулы, срезы гиппокампа в течение 20 мин перфузировали физиологическим раствором, не содержащим ионов магния. Отсутствие ионов магния в среде приводило к снятию магниевого блока с НМДА-рецепторов и развитию эпилептиформной активности пирамидных нейронов поля СА1, которая проявлялась в том, что в ответе на тестирующий стимул кроме основного п-спайка (рис. 1, а, 1) возникало несколько дополнительных п-спайков (рис. 1, а, 2).

После развития эпилептиформной активности пирамидных нейронов поля СА1 в раствор, перфузирующий срезы экспериментальной группы (n = 16), добавляли АмЛК. Срезы контрольной группы (n = 9) инкубировали в безмагниевом растворе в течение такого же времени, как и срезы экспериментальной группы (150 мин).

Действие АмЛК проявлялось в уменьшении амплитуды, а затем и подавлении дополнительных п-спайков (рис. 1, а, 3). Основной ответ уменьшался на 27,34 ± 7,41 % от начальной величины за все время перфузии в АмЛК (150 мин). При этом не менялась амплитуда волоконного ответа, что свидетельствует о том, что АмЛК не влияет на потенциал-зависимые каналы, обеспечивающие проведение импульса. В контрольной группе срезов, которые такое же время перфузировались в безмагниевом физиологическом растворе, не наблюдалось уменьшения числа и амплитуды дополнительных п-спайков в вызванных ответах.

После отмывки АмЛК в течение часа безмагниевым раствором дополнительные спайки вновь не появлялись. Это свидетельствует о стабильности взаимодействия АмЛК с молекулами-мишенями.

Для проверки возможного превентивного действия АмЛК срезы (n = 9) перфузировали физиологическим раствором с добавлением АмЛК (60 мин), а затем перфузировали физиологическим раствором, не содержащим ионов магния (60 мин) (рис. 1, б, 1–3). Несмотря на то что эндогенный блокатор был удален из среды, эпилептиформная активность пирамидных нейронов в поле СА1 не развивалась (рис. 1, б, 3).

В связи с выраженным эффектом АмЛК в условиях нарушения магниевого блока вторая серия экспериментов была посвящена изучению влияния АмЛК на НМДАР-зависимую синаптическую потенциацию в физиологических условиях.

Перед тетанизацией срезы перфузировали нормальным физиологическим раствором, содержащим АмЛК, в течение 60 мин, при этом наблюдали незначительное уменьшение амплитуды основного спайка. После такой обработки срезов АмЛК проводили тетанизацию (100 Гц/1с) коллатералей Шаффера. Контрольную группу перфузировали 60 мин в нормальном растворе. Достоверного различия экспериментальной (n = 8) и контрольной (n = 5) групп не обнаружилось (рис. 2).

В случае обработки срезов высокоаффинным экзогенным лигандом МК-801, который взаимо-

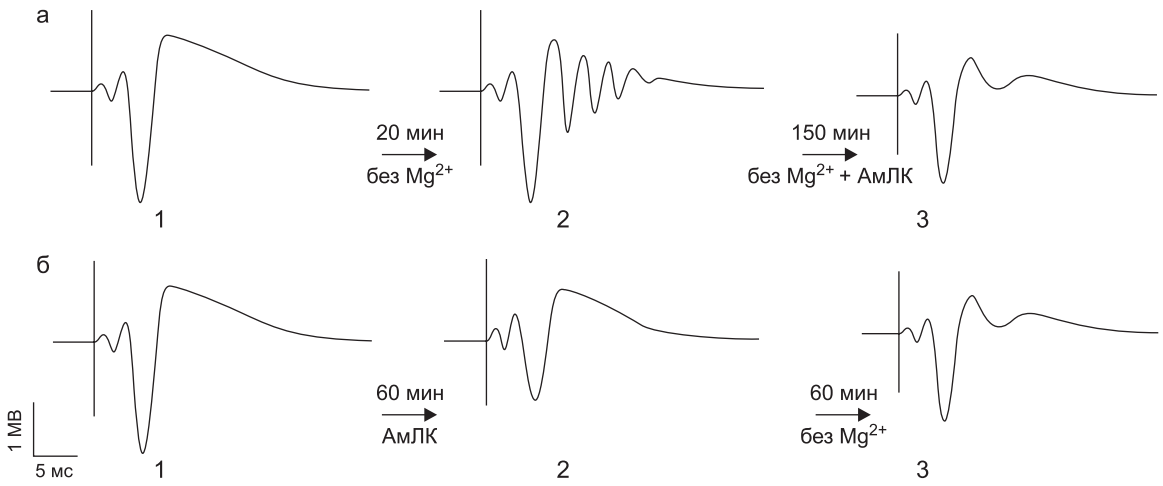


Рис. 1. Регуляция активности глутаматных рецепторов НМДА типа амидом ламбертиановой кислоты.

Над горизонтальными стрелками цифрами указана продолжительность инкубации срезов с указанными веществами.
а – компенсация амидом ламбертиановой кислоты гиперактивности глутаматных рецепторов НМДА типа пирамидных нейронов гиппокампа поля CA1, вызванной снятием магниевого блока. 1 – одиночный п-спайк в нормальном растворе; 2 – эпилептиформноподобная активность после 20 мин инкубации среза в безмагниевом растворе; 3 – восстановление одиночных п-спайков после 150 мин инкубации среза в безмагниевом растворе с АмЛК;
б – предотвращение гиперактивности глутаматных рецепторов НМДА типа пирамидных нейронов гиппокампа поля CA1 амидом ламбертиановой кислоты. 1 – одиночный п-спайк в нормальном растворе; 2 – инкубация в нормальном растворе с АмЛК; 3 – отсутствие эпилептиформноподобной активности в безмагниевом растворе.

Fig. 1. Regulation of glutamate receptors NMDA-type by lambertianic acid amide.

Numerals above horizontal arrows indicate the duration of slices incubation with substances under study.
a – hyperactivity of NMDA type glutamate receptors in pyramidal hippocampal neurons of the CA1 field caused by magnesium block removal: compensation by lambertianic acid amide. 1 – Single p-spike in the normal solution; 2 – epileptiform activity of slice after 20 min incubation in a solution without of magnesium ions; 3 – restoration of single p-spikes after 150 min incubation of slice in solution with lambertianic acid amide and without magnesium ions.
b – prevention of NMDA type glutamate receptor hyperactivity in pyramidal hippocampal neurons of the CA1 field by lambertianic acid amide. 1 – single p-spike in the normal solution; 2 – incubation in the normal solution with lambertianic acid amide; 3 – absence of the epileptiform activity from the solution without magnesium ions.

действует с сайтом связывания, находящимся в канальной части рецепторной молекулы ионного канала НМДАР, потенциация не развивалась (рис. 2).

Эти результаты показывают, что проводимая тетанизация коллатералей Шаффера вызывает именно НМДАР-зависимую синаптическую потенциацию. АмЛК не препятствует развитию синаптической потенциации в присутствии эндогенного блокатора (рис. 2).

В третьей серии экспериментов проводили обработку срезов мемантином. Обнаружили, что, как и в случае обработки срезов АмЛК, мемантин подавляет развившуюся в безмагниевом растворе эпилептиформную активность (n = 5) (рис. 3).

Однако в случае превентивной обработки срезов мемантином в нормальном растворе при перфузии этих срезов безмагниевым раствором развивалась эпилептиформная активность (n = 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах на животных (грызунах) для ламбертиановой кислоты и ее производных в настоящее время выявлен широкий спектр биологической активности (Толстикова и др., 2000, 2001, 2004; Tolstikova *et al*., 2004; Августинович и др., 2014). В экспериментах, проведенных нами, показано, что АмЛК может оказывать воздействие непосредственно на нервную ткань (срезы гиппокампа).

Нейропротекторный эффект АмЛК проявлялся в условиях отсутствия одного из эндогенных лигандов НМДАР. АмЛК нормализовал развившуюся эпилептиформную активность пирамидных нейронов поля CA1 (рис. 1, а).

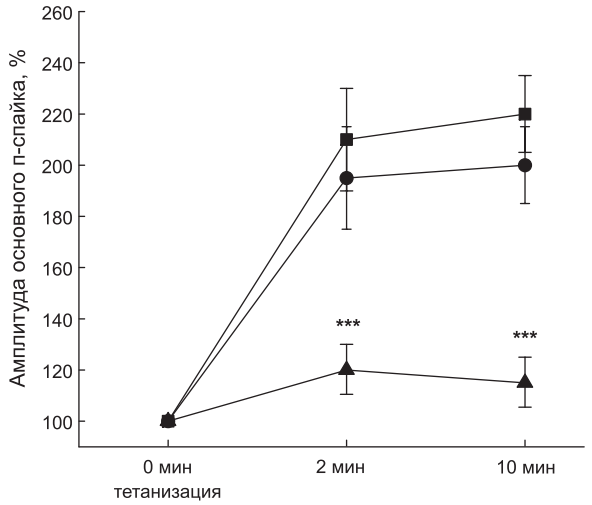


Рис. 2. Влияние АмЛК и МК-801 на развитие долговременной потенциации.

По оси OX – время после тетанизации срезов высокочастотной стимуляцией (100 Гц/1с). По оси OY – увеличение амплитуды п-спайка каждой из трех групп в % относительно начальной величины (до тетанизации). За 100 % взята амплитуда п-спайков до тетанизации.

—■— группа срезов, которую преинкубировали в нормальном растворе (контроль);

—●— группа срезов, которую преинкубировали в нормальном растворе с добавлением АмЛК (60 мин);

—▲— группа срезов, которую преинкубировали в нормальном растворе с добавлением МК-801 (60 мин).

Достоверное отличие амплитуды п-спайков по сравнению с контрольной группой после тетанизации: *** $p \leq 0{,}001$.

Fig. 2. Influence of lambertianic acid amide and MK-801 on the development of long-term potentiation.

X-axis: time after high-frequency (100 Hz/1c) tetanization of slices.

Y-axis: increase of the p-spike amplitude in each of the three groups as percentage of the initial value (before tetanization). The amplitude of the p-spikes before tetanization is taken to be 100 %.

—■— group of slices pre-incubated in the normal solution (control);

—●— group of slices pre-incubated in the normal solution with lambertianic acid amide (60 min);

—▲— group of slices pre-incubated in the normal solution with MK-801 (60 min).

*** Difference of the amplitude of the p-spikes from the control group after tetanization significant at $p \leq 0{,}001$.

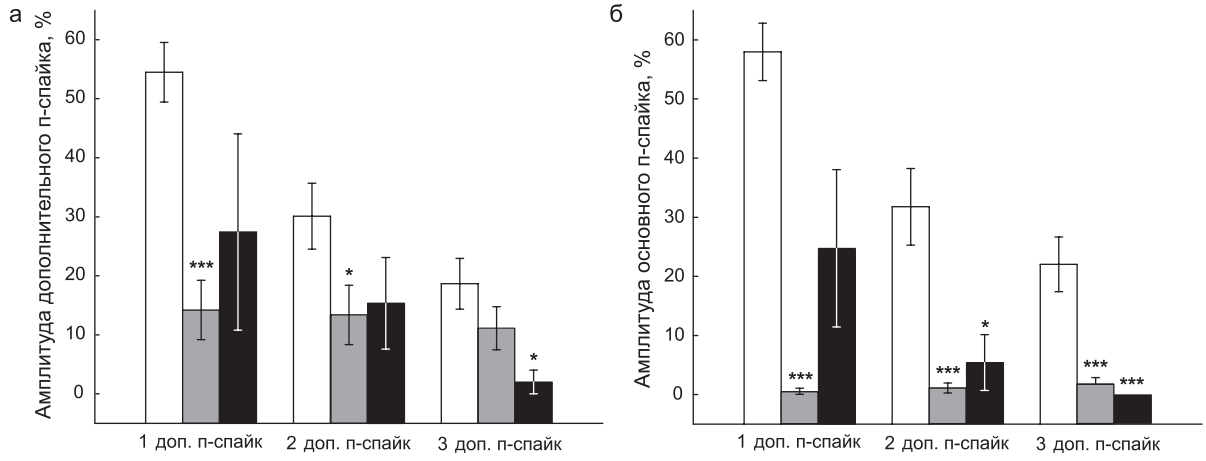


Рис. 3. Динамика уменьшения дополнительных п-спайков под воздействием АмЛК и мемантина.

а – 90 мин после начала инкубации; б – 150 мин после начала инкубации.

Достоверное уменьшение амплитуды дополнительных п-спайков экспериментальной группы по сравнению с контрольной группой в той же самой временной точке: * $p \leq 0{,}05$; *** $p \leq 0{,}001$.

□ группа срезов, которую инкубировали в безмагниевом растворе (контроль).

▒ группа срезов, которую инкубировали в безмагниевом растворе с добавлением АмЛК;

■ группа срезов, которую инкубировали в безмагниевом растворе с добавлением мемантина.

Амплитуда дополнительных п-спайков нормирована относительно основного п-спайка.

Fig. 3. Dynamics of reduction of the amplitude of additional p-spikes under the influence of lambertianic acid amide and memantin.

a – 90 minutes after the beginning of incubation; b – 150 minutes after the beginning of incubation.

Reduction of the amplitude of the additional n-spikes in the experimental group compared to the control group at the same time point significant at: * $p \leq 0{,}05$; *** $p \leq 0{,}001$.

□ group of slices incubated in the normal solution (control);

▒ group of slices incubated in the solution with lambertianic acid amide and without magnesium ions;

■ group of slices incubated in the solution with memantin and without magnesium ions.

The amplitude of the additional p-spike is normalized relative to the main p-spike.

Кроме того, предварительная обработка срезов блокировала развитие эпилептиформной активности, которая вызывалась в экспериментах удалением ионов магния из омывающей среды (рис. 1, б). В условиях применения физиологического раствора без ионов магния, когда снимается нормальный Mg^{2+} блок ионного канала, происходят аномальное увеличение продолжительности активности НМДАР и избыточное поступление Ca^{2+} в нейрон (Zeevalk, Nicklas, 1992), что может стать причиной эксайтотоксичной гибели клеток. Таким образом, АмЛК при отсутствии ионов магния может блокировать развитие эпилептиформной активности и ассоциированное с ней избыточное поступление Ca^{2+} в нейрон.

Известно, что для нормальной глутамат-зависимой нейротрансмиссии необходимо присутствие и потенциал-зависимое взаимодействие Mg^{2+} с НМДАР (Chen *et al*., 1992; Chen, Lipton, 2006; Johnson, Kotermanski, 2006)**.** Наши данные показывают, что в отсутствие Mg^{2+} АмЛК нормализует глутамат-зависимую нейротрансмиссию, и нормализация глутамат-зависимой нейротрансмиссии происходит в результате интеграции эффектов глутамата и АмЛК.

Кроме нейропротекторного эффекта, который был выявлен нами в отсутствие эндогенного лиганда НМДАР, обнаружили, что при физиологических условиях АмЛК не препятствует нормальному функционированию нейронов и процессам синаптической пластичности.

Обработка срезов АмЛК не препятствовала развитию ДП в присутствии эндогенного канального блокатора, как это наблюдается, например, при применении высокоаффинного экзогенного лиганда (блокатора) ионного канала НМДАР МК-801 (рис. 2). Эти результаты показывают, что проводимая тетанизация коллатералей Шаффера вызывает НМДАР-зависимую синаптическую потенциацию, так как если бы АмЛК действовал подобно МК-801, потенциация бы не развивалась.

Функционально действие АмЛК на срезы гиппокампа можно сравнить с эффектами мемантина с известными НМДА рецептор-зависимыми механизмами действия (Chen *et al*., 1992; Chen, Lipton, 2006; Johnson, Kotermanski, 2006).

АмЛК и мемантин воздействовали на срезы гиппокампа сходным образом: не блокировали развитие НМДАР-зависимой синаптической потенциации; нормализовали эпилептиформную активность нейронов, вызванную удалением эндогенного блокатора каналов НМДАР. Однако только АмЛК показал превентивный эффект – в срезах, обработанных АмЛК, не развивается эпилептиформная активность при помещении их в среду, не содержащую ионов магния.

Известно, что мемантин является низкоаффинным неконкурентным канальным блокатором, он связывается с каналом, который находится в открытом состоянии и способен к быстрому выходу из канала (Chen *et al*., 1992; Chen, Lipton, 2006). При инкубации срезов в физиологическом растворе как с мемантином, так и с АмЛК, тестирующие стимулы подавались регулярно через две минуты и НМДАР-каналы находились в открытом состоянии порядка нескольких миллисекунд. Вероятно, в случае с мемантином этого времени было недостаточно, чтобы он вступил в реакцию со своим сайтом связывания в канале, находящемся в открытом состоянии. АмЛК, напротив, успешно взаимодействовал, возможно, с другим сайтом, нежели мемантин, и при удалении Mg^{2+} эффективно функционировал как блокатор канала. Вероятно, это выявленное нами превентивное нейропротекторное свойство АмЛК может проявиться как особое преимущество при дальнейших исследованиях и клинических испытаниях вещества.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использованы материалы, полученные при выполнении интеграционного проекта Президиума СО РАН № 136; базового проекта фундаментальных исследований 35.1.5; гранта РФФИ № 12-01-00639-а; ФНМ-2012-46.

Работа также поддержана грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

ЛИТЕРАТУРА

Августинович Д.Ф., Фомина М.К., Сорокина И.В. и др. Комплексное исследование эффектов амида лambертиановой кислоты у самок мышей, находящихся в условиях социального дискомфорта // Бюл. эксперим. биол. медицины. 2014. Т. 157. С. 599–603.

Avgustinovich D.F., Fomina M.K., Sorokina I.V. *et al*. Complex investigation of the effects of lambertianic acid

amide in female mice under conditions of social discomfort // Bull. Eks. Biol. Med. 2014. V. 157. P. 583–587. (In Russian).

Виноградова О.С. Гиппокамп и память. М.: Наука, 1975. 239 с.
Vinogradova O.S. Hippocampus and memory. M.: Nauka, 1975. 239 p. (In Russian).

Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. Пущино: Аналитическая микроскопия, 2003. 83 с.
Zinchenko V.P., Dolgacheva L.P. Intracellular signaling. Pushchino: Analiticheskaya mikroskopija, 2003. 83 p. (In Russian).

Сидоров А.В. Физиология межклеточной коммуникации. Минск: БГУ, 2008. 215 с.
Sidorov A.V. Phisiologija mezhkletochnoi kommunikatcii. Minsk: BGU, 2008. 215 p. (In Russian).

Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э. Синтетические трансформации высших терпеноидов и алкалоидов // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. 2002. № 7. С. 9–20.
Tolstikov G.A., Baltina L.A., Tolstikova T.G., Shults E.E. Synthetic transformations of higher terpenoids and alkaloids // Khimija i kompjuternoye modelirovanie. Butlerovskie soobshenija. 2002. V. 7. P. 9–20. (In Russian).

Толстикова Т.Г., Долгих М.П., Толстиков Г.А. Ламбертиановая кислота и ее аминопроизводные – новая группа перспективных нейротропных агентов // Докл. АН. 2000. Т. 374. № 2. С. 268–270.
Tolstikova T.G., Dolgikh M.P., Tolstikov G.A. Lambertian acid and its amino derivatives: a new group of perspective neurotropic agents // Dokl. Akad. nauk. 2000. V. 374. No. 2. P. 445–447. (In Russian).

Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Воевода Т.В., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Ноотропная активность производных ламбертиановой кислоты // Докл. РАН. 2001. Т. 376. № 2. С. 271–273.
Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Voivoda T.V. *et al*. Nootropic activity lambertianic acid derivatives // Dokl. RAS. 2001. V. 376. P. 271–273. (In Russian).

Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Долгих М.П., Харитонов Ю.В., Чернов С.В., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Нейротропная активность аддуктов ламбертиановой кислоты с N-замещенными малеинимидами // Хим.-фарм. журнал. 2004. Т. 38. № 10. С. 13–15.
Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Dolgikh M.P. *et al*. Neurotropic activity adducts lambertianic acid N-substituted maleimide // Khim. Pfarm. Zhurnal. 2004. V. 38. P. 13–15. (In Russian).

Bredt D.S., Nicoll R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses // Neuron. 2003. V. 40. P. 361–379.

Chen H.S., Lipton S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists // J. Neurochem. 2006. V. 97. P. 1611–1626.

Chen H.S., Pellegrini J.W., Aggarwal S.K. *et al*. Open-channel block of NMDA responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity // J. Neurosci. 1992. V. 12. P. 4427–4436.

Dingledine R., Borges K., Bowie D. *et al*. The glutamate receptor ion channels // Pharmacol. Rev. 1999. V. 51. P. 7–61.

Johnson J.W., Kotermanski S.E. Mechanism of action of memantine // Curr. Opin. Pharmacol. 2006. V. 6. P. 61–67.

Kennedy M.B. Signal-processing machines at the postsynaptic density // Science. 2000. V. 290. P. 750–754.

Kessels H.W., Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior // Neuron. 2009. V. 61. P. 340–450.

Koch C., Segev I. The role of single neurons in information processing // Nat. Neurosci. 2000. V. 3. P. 1171–1177.

Krystal J.H., D'Souza D.C., Mathalon D. *et al*. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development // Psychopharmacology (Berl). 2003. V. 169. P. 215–233.

Lai H.C., Jan L.Y. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels // Nat. Rev. Neurosci. 2006. V. 7. P. 548–562.

Malenka R.C. The long-term potential of LTP // Nature Rev. Neurosci. 2003. V. 4. P. 923–926.

Mehta A., Prabhakar M., Kumar P. *et al*. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders // Eur. J. Pharmacol. 2012. V. 698. P. 6–18.

Moghaddam B., Jackson M.E. Glutamatergic animal models of schizophrenia // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003. V. 1003. P. 131–137.

Nowak L., Bregestovski P., Ascher P. *et al*. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones // Nature. 1984. V. 307. P. 462–465.

Racca C., Stephenson F.A., Streit P. *et al*. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area // J. Neurosci. 2000. V. 20. P. 2512–2522.

Shi S., Hayashi Y., Esteban J.A. *et al*. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons // Cell. 2001. V. 105. P. 331–343.

Sweatt J.D. Toward a molecular explanation for long-term potentiation // Learn. Mem. 1999. V. 6. P. 399–416.

Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Dolgikh M.P., Kharitonov Y.V., Chernov S.V., Shults E.E., Tolstikov G.A. Neurotropic activity of lambertianic acid adducts with N-substituted maleinimides // Pharm. Chem. J. 2004. V. 38. No. 10. P. 532–534.

Zeevalk G.D., Nicklas W.J. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block of the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism // J. Neurochem. 1992. V. 59. P. 1211–1220.

SYNERGISTIC EFFECT OF MAGNESIUM IONS AND LAMBERTIANIC ACID AMIDE IN THE REGULATION OF GLUTAMATE RECEPTORS OF NMDA-TYPE IN PYRAMIDAL NEURONS OF THE HIPPOCAMPUS

T.A. Zapara[1], S.O. Vechkapova[2], A.L. Proskura[1], A.S. Ratushnyak[1]

[1] Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia;
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: zapara_t@mail.ru

Summary

The most common neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, multiple sclerosis, epilepsy, ischemic brain damage, although caused by different mechanisms, may share a common pathway: anomalies of ionotropic glutamate receptors, particularly of NMDA type. Currently, drugs with glutamatergic mechanisms of action are intensely being developed for the treatment of cognitive disorders and neurodegenerative processes. The aim of this work was to study the effect of lambertianic acid amide on glutamatergic synaptic transmission. The functional integration of glutamate and non-neurotransmitter receptors of hippocampal pyramidal neurons was analyzed. The dominant type of functioning of the plasma membrane receptors is the integration of effects of selective signaling molecules (mediators), numerous internal and external factors, as well as the sharing of signaling pathways. Examination of mouse hippocampal slices showed that lambertianic acid amide did not affect the development of NMDA-dependent synaptic potentiation. It exhibited neuroprotective effects, normalizing the epileptiform activity caused by the absence of the endogenous ion channel blocker of the NMDA receptor. Thus, lambertianic acid extracted from needles and galipot of Siberian cedar pine (*Pinus sibirica* R. Mayr) and its derivatives are a promising source of drugs with glutamatergic mechanism of action suitable for the treatment of cognitive disorders and neurodegenerative diseases.

Key words: synaptic plasticity, long-term potentiation, glutamate receptor, glucocorticoid, neuropeptide receptors, ion channel blocker, lambertianic acid amide.

УДК 612.017:612.882:612.225:612.062

ВОВЛЕЧЕНИЕ НЕЙРОГЕНОМНОГО УРОВНЯ РЕГУЛЯЦИИ В ПРОЦЕССЫ ПОДДЕРЖАНИЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА ОРГАНИЗМА НА ХОЛОДЕ

© 2014 г. **Т.В. Козырева, И.П. Воронова**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: kozyreva@physiol.ru

Поступила в редакцию 17 сентября 2014 г. Принята к публикации 6 ноября 2014 г.

В статье представлены данные нескольких серий исследований, свидельствующие о важной роли генома в регуляции температурного гомеостаза.

Показано, что при длительной адаптации организма к холоду происходит изменение экспрессии генов термочувствительных TRP-ионных каналов (TRPV3) и серотониновых рецепторов (5HT-2A), расположенных на поверхности гипоталамического нейрона. Эти изменения специфичны для гипоталамуса, центра терморегуляции, и не наблюдаются в других структурах мозга. Следовательно, в адаптивных изменениях температурной чувствительности гипоталамических нейронов участвуют, как минимум, два генных механизма, регулирующих соотношение TRP-ионных каналов и медиаторных рецепторов. Эти два механизма взаимно дополняют друг друга.

Учитывая важную роль холодочувствительного ионного канала TRPM8 в регуляции терморегуляторных, метаболических и иммунных реакций, можно полагать, что изменения в функционировании этого канала будет приводить к индивидуальному разнообразию формирования защитных реакций при смене температурных условий. Это подтверждается данными, полученными на людях, о роли однонуклеотидного полиморфизма гена *TRPM8* (rs11562975). Люди с гетерозиготным генотипом GC по этому полиморфизму имеют, по сравнению с людьми, имеющими гомозиготный генотип GG, повышенную чувствительность к холоду и сниженную чувствительность к ментолу, агонисту ионного канала TRPM8. Этот полиморфизм сопровождается также гипометаболической (менее энергозатратной) реакцией организма на холод.

Ключевые слова: температура, экспрессия генов, полиморфизм, TRP ионные каналы, серотониновые рецепторы.

Температура – неотъемлемый фактор окружающей среды. Освоение человеком территорий, климатической особенностью которых являются низкие температуры, привлекает особое внимание к вопросам о возможности, пределах и механизмах приспособления организма к холоду, вовлечению в эти процессы геномного уровня регуляции. Охлаждающие воздействия с интенсивной теплоотдачей (например, сочетанное воздействие высокой влажности и ветра) возможны и вне зависимости от географической широты. Кроме того, интенсивные теплопотери сопровождают порой медицинские процедуры, такие как операционное вмешательство, в том числе и с применением гипотермии. Поэтому исследования процессов восприятия температурной информации, формирования температурных ощущений и эффекторных реакций организма являются актуальными для современной биологической науки.

Геномные механизмы температурной чувствительности представляют собой совершенно неисследованную область, поскольку материальные носители термочувствительности (TRP-ионные каналы и их гены) были расшифрованы недавно, а также, так как термочувст-

вительность организма является сложным фенотипическим признаком, подверженным существенным адаптивным изменениям под влиянием как окружающей среды, так и различных состояний организма.

При температурном воздействии на организм формирование афферентной информации происходит в термочувствительных структурах нервной системы – периферических и центральных терморецепторах. Периферическими кожными терморецепторами являются окончания центростремительных сенсорных нервов, обеспечивающих высокую чувствительность организма к изменению внешней температуры. Нейроны гипоталамуса – центра системы терморегуляции – также обладают собственной температурной чувствительностью и способны изменять свою импульсную активность даже при очень незначительном температурном воздействии на них (Nakayama *et al*., 1961; Watanabe *et al*., 1986; Brück, Zeisberger, 1987; Kozyreva, Pierau, 1994; Boulant, 1998; Kozyreva, 2006). Формируя афферентные сигналы, терморецепторы вовлечены в контроль и коррекцию различных эффекторных функций, обеспечивая сложный характер ответа организма на температурное воздействие.

Вопросы о том, что лежит в основе термочувствительности, благодаря каким клеточным механизмам изменяется импульсная активность центральных нейронов и периферических сенсорных окончаний, в течение долгого времени оставались невыясненными. Приблизиться к ответу позволило открытие термочувствительных белков клеточной мембраны, образующих ионные каналы. Часть из них относится к многочисленной группе так называемых TRP (**t**ransient **r**eceptor **p**otential)-ионных каналов, способных под влиянием различных стимулов изменять проникновение ионов в клетку, что может приводить к изменению мембранного потенциала (McKemy *et al*., 2002; Jordt *et al*., 2003; Patapoutian *et al*., 2003; Ramsey *et al*., 2006). Название «термочувствительные» получили TRP-каналы, активируемые непосредственно температурой. Так же как и другие TRP-каналы, они имеют внутриклеточные амино- и карбоксил- терминали, 6 трансмембранных доменов и петлю, расположенную между 5-м и 6-м сегментами, которая участвует в формировании поры канала, проницаемой для катионов (Ramsey *et al*., 2006). К настоящему времени наиболее признанными считаются 6 термочувствительных TRP-ионных каналов (Caterina, 2007; Vay *et al*., 2012). Два холодочувствительных, т. е. активирующихся при понижении температуры: ниже 17 °С – TRPA1 и ниже 28 °С – TRPM8; а также 4 теплочувствительных, которые активируются при повышении температуры: TRPV3 – в диапазоне 31–39 °С, TRPV4 – от 25 до 42 °С, TRPV1 – от 42 °С и выше, TRPV2 – от 52 °С и выше (Jordt *et al*., 2003). Все вместе они охватывают диапазон температур, воспринимаемых большинством млекопитающих, и не исключено, что именно эти каналы и являются первичными детекторами изменений температуры у теплокровных животных. С момента открытия TRP-ионные каналы находятся под пристальным вниманием исследователей. Интенсивно изучаются их свойства, как молекулярно-биологические (первичные и вторичные белковые структуры, свойства разных отделов этих молекул), так и физико-химические (Q_{10}, ионные токи, сродство к природным и искусственно создаваемым лигандам). В то же время исследованию физиологического значения этих каналов уделяется гораздо меньше внимания. Часть работ в этом направлении посвящена исследованиям физиологических ответов организма после искусственного изменения активности исследуемого TRP-канала (Gavva *et al*., 2007; Козырева, Ткаченко, 2008; Kozyreva *et al*., 2010), часть – исследованиям физиологических реакций после генетического нокаута генов TRP-каналов (Caterina *et al*., 2000; Lee *et al*., 2005). Изменение порогов терморегуляторных реакций после активации термочувствительных TRP-каналов (Tajino *et al*., 2007; Kozyreva *et al*., 2010), а также изменение термопреферендума после нокаута по генам термочувствительных TRP-каналов (Lee *et al*., 2005; Bautista *et al*., 2007; Tajino *et al*., 2007; Garami *et al*., 2011) могут быть расценены как смещение термонейтральной зоны для данного организма. Известно, что в естественных условиях смещение термонейтральной зоны является результатом адаптации к измененным температурным условиям (Слоним, 1979). Таким образом, можно было полагать, что TRP-ионные каналы могут быть задействованы в механизмах температурных адаптаций. Термочувствительные нейроны

гипоталамуса теплокровного организма, как было показано, изменяют свои характеристики в результате адаптации к холоду (Kozyreva, Pierau, 1994). Можно было предположить, что в основе формирования измененного в результате холодовой адаптации ответа нейронов на один и тот же температурный стимул лежат изменения, произошедшие в самих нейронах и связанные с перераспределением соотношения различных ионных каналов мембраны клетки или рецепторов соответствующих медиаторов. Это должно, в свою очередь, найти отражение в изменении функционирования генома – изменении экспрессии генов, кодирующих эти ионные каналы или рецепторы.

В связи с этим нами впервые было проведено сравнительное исследование уровня экспрессии генов 6 наиболее известных термочувствительных TRP-ионных каналов в гипоталамусе у типичных теплокровных животных – крыс, адаптированных к разным температурам среды – холоду и теплу (Воронова и др., 2012; Voronova *et al*., 2013).

Согласно результатам нашего исследования, в гипоталамусе крыс активно экспрессируются гены термочувствительных ионных TRP-каналов, активирующихся при температурах выше 30 °С, в то время как гены TRP-каналов, активирующихся при более низких температурах (TRPA1 и TRPM8), экспрессируются в меньшей степени (рис. 1). Как было отмечено ранее, особенностью термочувствительных ионных каналов TRPA1 и TRPM8 является не только то, что они активируется при относительно низких температурах, но и то, что активация их происходит при снижении температуры. Повышение импульсной активности при снижении температуры характерно для холодочувствительных нейронов (Hensel, 1974). Исходя из этого, именно TRPA1 и TRPM8 ионные каналы рассматриваются исследователями (Patapoutian *et al*., 2003; McKemy, 2005) как молекулярная основа физиологических ощущений холода. В гипоталамусе, согласно электрофизиологическим исследованиям, холодочувствительных нейронов в 20 раз меньше, чем чувствительных к теплу, и число их составляет только 2 % от общего числа исследованных нейронов (Watanabe *et al*., 1986). Обнаруженный нами факт невысокой экспрессии генов холодочувствительных ионных каналов в гипоталамусе вполне согласуется с этими данными.

Фактом, заслуживающим особого внимания, является показанное в нашей работе влияние адаптации к холоду на уровень экспрессии гена термочувствительного TRPV3 ионного канала (Воронова и др., 2012). Адаптация к холоду достоверно понизила его экспрессию в гипоталамусе (рис. 2, а). Это позволяет предполагать участие данного ионного канала в обеспечении собственной температурной чувствительности гипоталамуса и ее адаптивных изменениях. Известно, что активность ионного канала TRPV3 имеет место при температурах 31–39 °С (Jordt *et al*., 2003), т. е. в физиологическом диапазоне температур. Ранее было показано наличие в гипоталамусе крыс трех типов термочувствительных нейронов, различающихся по способности изменять свою активность в зависимости от диапазона предъявленных температур (рис. 2, б). Были обнаружены нейроны, (1) чувствительные к изменению температуры в диапазоне 35–38 °С и нечувствительные или слабочувствительные в области температур

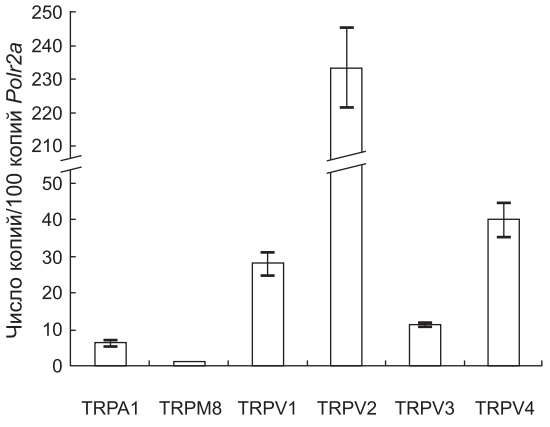


Рис. 1. Уровень мРНК генов термочувствительных ионных каналов TRPA1, TRPM8, TRPV1, TRPV2, TRPV3 и TRPV4 в гипоталамусе крыс.

Fig. 1. The levels of mRNA for different thermosensitive TRP ion channels in the rat hypothalamus.

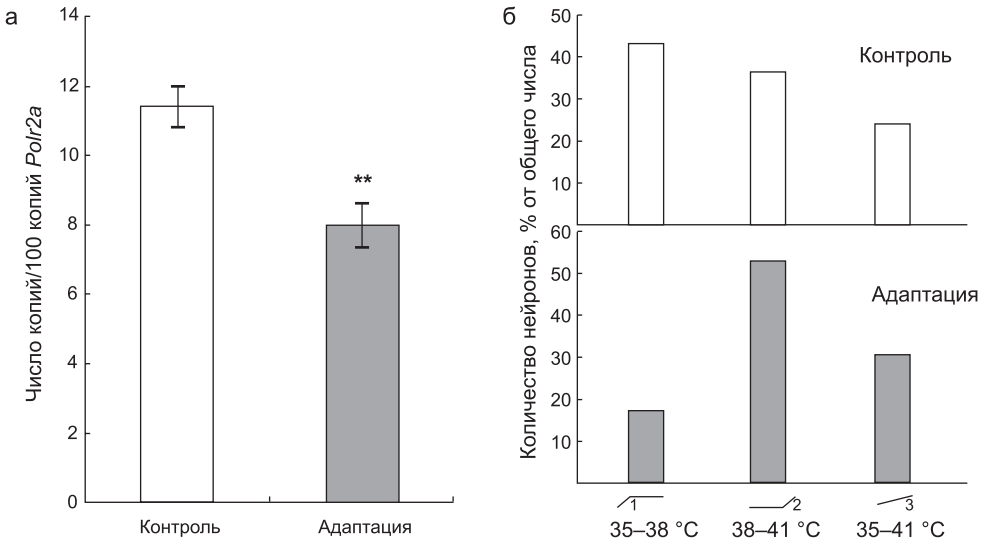


Рис. 2. Изменение экспрессии гена ионного канала TRPV3 и соотношения нейронов с разной температурной чувствительностью в гипоталамусе после длительной адаптации организма к холоду.

а – уровень мРНК гена термочувствительного ионного канала TRPV3 в гипоталамусе контрольных и адаптированных к холоду крыс. ** $p < 0{,}002$ (p= 0,001255); б – три типа термочувствительных нейронов в гипоталамусе, различающиеся по способности изменять свою активность в зависимости от диапазона предъявленных температур, и изменение их количества после адаптации животных к холоду.

Fig. 2. Changes in gene expression of TRPV3 ion channel and in the ratio of neurons with different thermal sensitivity in hypothalamus after the long-term adaptation to cold.

a – the level of mRNA for the TRPV3 thermosensitive ion channel in the hypothalamus of control and cold-adapted rats. ** $p < 0{,}002$ ($p = 0{,}001255$); b – three types of thermosensitive neurons in the rat hypothalamus, whose activities vary with the temperature range to which they were exposed, and changes in their ratio after the adaptation to cold.

38–41 °C; (2) нейроны, чувствительные к изменению температуры в диапазоне 38–41 °C и нечувствительные в области 35–38 °C, а также (3) нейроны, чувствительные к изменению температуры во всем диапазоне исследованных температур 35–41 °C. Адаптация к холоду приводила к увеличению количества нейронов, чувствительных в области температур 38–41 °C, и снижению доли нейронов, чувствительных в области более низких температур (35–38 °C) (Kozyreva, Pierau, 1994). Температурные диапазоны активации TRPV3 ионного канала и тех нейронов, число которых в результате адаптации уменьшилось, совпадают. Кроме того, как нами обнаружено, адаптация к холоду снижает уровень мРНК именно этого ионного канала. При сопоставлении этих фактов складывается впечатление, что TRPV3 ионный канал ответственен за обеспечение температурной чувствительности определенной части нейронов гипоталамуса в области 35–38 °C и тех изменений, которые возникают при холодовой адаптации.

В нашем исследовании (Воронова и др., 2012) адаптация животных к холоду привела к изменению уровня мРНК TRPV3, а уровень мРНК других исследованных нами TRP-ионных каналов остался неизменным. Вероятно, это можно связать с тем, что эти каналы активируются при разных температурах, и не исключено, что изменение экспрессии генов таких ионных каналов, как TRPV1, TRPV2 или TRPV4, будет обнаружено при адаптации животных к высоким температурам.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что температурная адаптация затрагивает процессы, происходящие на уровне экспрессии мРНК, а само изменение экспрессии генов TRP-каналов является одним из молекулярных механизмов изменения термочувствительности нейронов гипоталамуса при длительных температурных воздействиях.

В механизмах изменения термочувствительности нейронов гипоталамуса могут принимать участие и рецепторы различных медиаторов,

расположенных на поверхности гипоталамического нейрона. Так, существуют многочисленные данные о том, что температурные условия изменяют ответы организма на агонисты и антагонисты серотонина (Bligh, Cottle,1969; Popova, Konusova, 1985; Oerther, 2000; Nicholas, Seiden, 2003). Из этого следует, что при разных температурах окружающей среды либо меняется состояние серотониновых рецепторов, либо под влиянием серотониновых рецепторов происходят изменения в чувствительности и (или) функции регулирующих температуру нейронов (Nicholas, Seiden, 2003), экспрессирующих эти рецепторы. Известно также, что большинство термочувствительных нейронов гипоталамуса способны отвечать на микроинъекции серотонина (Hori, Nakayama, 1973; Watanabe *et al*., 1986), т. е. имеют в своей структуре постсинаптические серотониновые рецепторы. Из 14 типов и подтипов рецепторов серотонина наиболее изученными являются серотониновые 5-HT1A и 5-HT2A рецепторы. Эти рецепторы участвуют в реализации многочисленных физиологических реакций, и именно с их активацией большинство исследователей связывают возникновение у подопытных животных гипо- и гипертермии соответственно (Barnes, Sharp, 1999). Исследование уровня мРНК 5-HT1A и 5-HT2A рецепторов в различных отделах мозга крыс (Воронова и др., 2006; Voronova *et al*., 2007), адаптированных к холоду или к теплу, показало, что адаптация к холоду почти в полтора раза увеличивает уровень мРНК 5-HT2A рецепторов в гипоталамусе, не оказывая существенного влияния на уровень мРНК 5-HT1A рецептора (рис. 3, а). Повышение экспрессии гена 5-HT2A рецепторов в гипоталамусе у животных, подвергнутых адаптации к холоду, воспринимается как явление вполне целесообразное, поскольку под влиянием этих рецепторов активируются механизмы, приводящие к улучшению защиты от холода: возникают реакции, направленные на повышение теплопродукции (Lin *et al*., 1998) и на снижение теплоотдачи (Blessing, Seaman, 2003). В совокупности эти процессы могут, с одной стороны, приводить организм, находящийся в термонейтральных условиях, к гипертермии, а с другой – улучшать защиту теплокровного организма от влияния пониженных температур внешней среды. Необходимо подчеркнуть, что наблюдаемые изменения являются специфичными для гипоталамуса. В гиппокампе и среднем мозге холодовая адаптация экспресию мРНК 5-HT2A рецептора не изменяет, в коре же приводит к изменениям, противоположным тем, которые наблюдаются в гипоталамусе: коли-

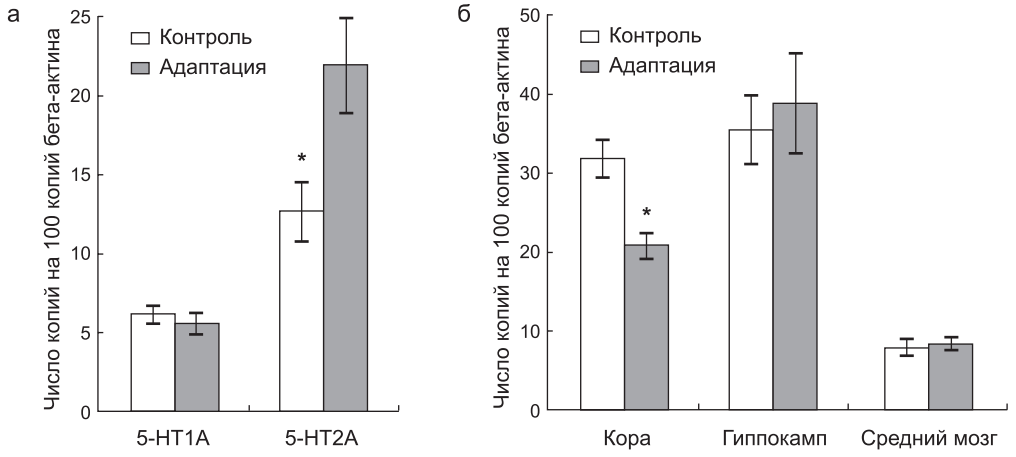


Рис. 3. Изменение экспрессии генов серотониновых рецепторов после длительной адаптации к холоду.

а – уровень мРНК генов серотониновых 5-HT1A и 5-HT2A рецепторов в гипоталамусе крыс, адаптированных к холоду (адаптация) или к теплу (контроль); б – уровень мРНК гена серотонинового 5-HT2A рецептора в отделах мозга крыс, адаптированных к холоду (адаптация) или к теплу (контроль).

Fig. 3. Changes in gene expression of the serotonin receptors after long-term adaptation to cold.

a – the levels of mRNA for 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the hypothalamus of control and cold-adapted rats; b – the levels of mRNA for 5-HT2A receptors in different brain structures of control and cold-adapted rats: frontal cortex, hippocampus, and midbrain.

чество мРНК этого рецептора в коре достоверно падает (рис. 3, б).

Таким образом, можно констатировать факты влияния температурной адаптации на процессы, происходящие на уровне функционирования генома, и предположить, что в механизмы адаптивного изменения термочувствительности нейронов гипоталамуса могут быть вовлечены сдвиги в соотношении как термочувствительных TRP-ионных каналов, так и рецепторов различных медиаторов, расположенных на поверхности гипоталамического нейрона. Очевидно, эти два механизма взаимно дополняют друг друга. Сопоставляя полученные результаты с имеющимися в литературе данными, можно сделать вывод о том, что обнаруженные изменения в функционировании генома являются закономерными, адаптивными и, учитывая их локализацию в ЦНС, регуляторными.

Хотелось бы подчеркнуть, что, согласно результатам наших исследований, наблюдается неодинаковый уровень экспрессии генов термочувствительных ионных каналов в различных отделах мозга (Voronova *et al.*, 2013), однако во всех исследованных центральных структурах, включая и гипоталамус, зарегистрировано преобладание экспрессии генов теплочувствительных ионных каналов. В то же время в нервных окончаниях периферической нервной системы, а именно в сенсорных афферентных волокнах, хорошо представлены холодочувствительные ионные каналы TRPM8 и TRPA1, которые и составляют основу периферической холодовой чувствительности (Patapoutian *et al*., 2003; McKemy, 2005). Ионный канал TRPM8 наиболее интересен, так как он работает в области физиологических температур. Его агонистом, т. е. веществом, возбуждающим этот канал без изменения температуры, является ментол.

Исследование физиологических реакций организма после фармакологической активации ионного канала TRPM8 позволило нам обнаружить следующие интересные факты.

1. Предварительная фармакологическая активация TRPM8 оказывает существенное влияние на последующие терморегуляторные реакции – при быстром охлаждении организма происходит уменьшение температурных порогов этих реакций, т. е. они запускаются раньше, при меньшем охлаждении, кроме того, наблюдается также усиление ряда составляющих терморегуляторного ответа на холод (Kozyreva *et al*., 2012).

2. Ионный канал TRPM8 не только участвует в формировании ответа организма на холод, но и определяет, по-видимому, тип метаболизма вообще, смещая его в сторону жирового обмена. Известно, что при холодовом воздействии организм переключает метаболизм с углеводного на жировой. В наших исследованиях активация TRPM8, локализованного в коже, ментолом в термонейтральных условиях, без воздействия холода также усиливает жировой обмен, о чем свидетельствует снижение дыхательного коэффициента (Kozyreva *et al*., 2010). Хотелось бы отметить, что к сдвигам в метаболизме приводит активация TRPM8 ионного канала именно кожных нервных структур, в то время как внутрибрюшинное введение агониста этого канала таких изменений не вызывает (Неопубл. данные), что подчеркивает важность термосенсорных структур кожи.

3. Ионный канал TRPM8 принимает участие в модуляции иммунного ответа. Ранее было показано (Козырева и др., 2000; Kozyreva, Eliseeva, 2000) влияние охлаждающего воздействия на формирование иммунного ответа, что позволяло предполагать участие холодочувствительного ионного канала TRPM8 в этих процессах. И, действительно, было обнаружено (Kozyreva *et al*., 2012; Kozyreva, 2013), что фармакологическая активация ионного канала TRPM8 ментолом без изменения температуры приводит к повышению содержания ряда интерлейкинов крови (IL-6 и IL-1β) и изменению иммунного ответа на антиген (значительно возрастало антигенсвязывание клеток селезенки и снижалось содержание IgG в крови). Предварительная активация ионного канала TRPM8 ментолом ослабляет угнетающий эффект последующего глубокого охлаждения на иммунный ответ. Следовательно, фармакологическая стимуляция ионного канала TRPM8 приводит к изменениям формирования защитных реакций организма не только терморегуляторных, но и иммунных.

Учитывая важную роль ионного канала TRPM8 в формировании защитных реакций организма, терморегуляторных, метаболических и иммунных, можно полагать, что различия в функционировании этого ионного канала могут приводить к индивидуальному разнообразию

формирования защитных реакций организма при изменении внешних условий. Это выдвигает вопрос о связи полиморфизмов гена, кодирующего белковую молекулу этого канала, с особенностями формирования физиологических защитных реакций.

В настоящее время для ионного канала TRPM8 в кодирующих и некодирующих участках его гена установлено наличие целого ряда однонуклеотидных полиморфизмов (NCBI, Database SNP), функциональное значение которых далеко не ясно. В то же время эти полиморфизмы могут оказаться генетическими маркерами индивидуального разнообразия температурной чувствительности человека и его способности к защитным реакциям (метаболическим, терморегуляторным, иммунным).

Одним из таких полиморфизмов является однонуклеотидный полиморфизм rs11562975. Он локализован в 6-м экзоне гена *TRPM8* и обусловливает синонимичную замену нуклеотидов гуанина G на цитозин C. Популяционные исследования показали значительную вариабельность в распределении частот генотипов по этому полиморфизму гена *TRPM8* в разных этнических группах (Потапова и др., 2008). Согласно этим исследованиям, у русских частота генотипов с менее распространенным аллелем C однонуклеотидного полиморфизма rs11562975 значительна и составляет 18 %.

Нами были проведены исследования температурной чувствительности и показателей метаболического ответа организма при фармакологической или температурной активации ионного канала TRPM8, локализованного в коже, у людей с гетеро- и гомозиготным генотипом по этому полиморфизму. Результаты исследований показали, что для индивидуумов с гетерозиготным генотипом GC характерна повышенная чувствительность к холоду и сниженная чувствительность к ментолу, агонисту ионного канала TRPM8, по сравнению с людьми, имеющими гомозиготный генотип GG (Козырева и др., 2011).

Субъекты, имеющие гомозиготный генотип GG, помимо более низкого уровня ощущений холода, продемонстрировали и адекватный (с точки зрения терморегуляции) ответ организма на охлаждение: уменьшение теплоотдачи с дыханием и переход на жировой обмен. Субъекты с гетерозиготным генотипом GC ни при охлаждении, ни при нетермической стимуляции TRPM8 ментолом активации жирового обмена не продемонстрировали, более того, у них снижались вентиляция легких и потребление кислорода, т. е. ответ организма развивался по гипометаболическому типу (Козырева и др., 2014).

Гипометаболизм как ответ на снижение температуры среды, присущий пойкилотермным животным, у человека впервые описан Hemingway и Birzis (1956), которые показали, что в естественных условиях у бушменов пустыни Калахари при температуре воздуха от 0 до –3 °C снижались средняя температура тела и уровень метаболизма. В основе этого явления, скорее всего, лежат снижение кислородного запроса и, как следствие, уменьшение вентиляции легких и теплопотерь (Симонова, 1994). Реакция организма по гипометаболическому типу считается менее энергоемким способом ответа организма на охлаждение.

Хотелось бы подчеркнуть, что действие холода и нетермическая стимуляция ионного канала TRPM8 вызывают однонаправленные эффекторные реакции. Это свидетельствует о вовлеченности данного ионного канала не только в формирование температурных ощущений, но и в развитие комплекса защитных реакций на холод. Показанная связь изменений реакций на охлаждение с полиморфизмом именно этого ионного канала подтверждает его роль в развитии определенного типа метаболического ответа организма при воздействии низких температур.

Итак, приведенные в статье данные свидетельствуют о том, что температурное воздействие затрагивает геномный уровень регуляции, изменяя экспрессию генов в центре терморегуляции – гипоталамусе (рис. 4), что, по-видимому, и является первопричиной изменений термочувствительности его нейронов. Кроме того, получены доказательства определяющей роли генома (на примере полиморфизма rs11562975 гена *TRPM8*) в изменчивости восприятия теплокровным организмом температуры и, соответственно, развития термозащитных реакций.

В связи с показанной вовлеченностью геномных перестроек TRP-ионных каналов и медиаторных рецепторов в регуляцию изменчивости восприятия температуры встает вопрос о меха-

Рис. 4. Схема вовлеченности нейрогеномного уровня в процессы поддержания температурного гомеостаза организма на холоде.

Fig. 4. Involvement of neurogenomic regulation in the maintenance of temperature homeostasis in the cold.

низмах взаимодействия различных составляющих генома. Принимая во внимание доказанную возможность влияния термочувствительных афферентов на функционирование медиаторных систем в центре и на периферии (Brück, Zeisberger, 1987; Kozyreva *et al.*, 1999), можно полагать, что перестройки в генах, кодирующих TRP-ионные каналы, служат предшественниками и регуляторами геномных перестроек рецепторов медиаторных систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ: 14-04-00700-а.

ЛИТЕРАТУРА

Воронова И.П., Куликов А.В., Попова Н.К., Козырева Т.В. Влияние длительной адаптации к холоду на экспрессию генов серотониновых 1а и 2а рецепторов // Рос. физиол. журнал. 2006. Т. 92. № 5. С. 599–606.
Voronova I.P., Kulikov A.V., Popova N.K., Kozyreva T.V. Effect of long-term cold adaptation on the expression of mRNA for serotonin 5-HT1A and 5-HT2A receptors // Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova. 2006. V. 92. No. 5. P. 599–606. (In Russian).

Воронова И.П., Тужикова А.А., Козырева Т.В. Экспрессия генов термочувствительных TRP каналов в гипоталамусе крыс в норме и при адаптации к холоду // Рос. физиол. журнал. 2012. Т. 98. № 9. С. 1101–1110.
Voronova I.P., Tuzhikova A.A., Kozyreva T.V. Thermosensitive TRP channel gene expression in the hypothalami of normal rats and rats adapted to cold // Ross Fiziol Zh Im I.M. Sechenova. 2012. V. 98. No. 9. P. 1101–1110. (In Russian).

Козырева Т.В., Елисеева Л.С., Вавилин В.А. Влияние скорости и глубины охлаждения на иммунный ответ и содержание кортикостерона в плазме крови // Рос. физиол. журнал. 2000. Т. 86. № 12. С. 1618–1623.
Kozyreva T.V., Eliseeva L.S., Vavilin V.A. Effect of cooling rate and depth on the immune response and corticosterone blood level in rats // Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova. 2000. V. 86. No. 12. P. 1618–1623. (In Russian).

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я. Влияние ментола на температурную чувствительность человека // Физиология человека. 2008. Т. 2. С. 99–103.
Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ia. Effect of menthol on human temperature sensitivity // Fiziol. Cheloveka. 2008. V. 34. No. 2. P. 99–103. (In Russian).

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я., Потапова Т.А. Воевода М.И. Реакция респираторной системы на локаль-

ное охлаждение у людей с однонуклеотидным полиморфизмом rs11562975 гена термочувствительного ионного канала *TRPM8* // Физиология человека. 2014. Т. 40. № 2. С. 94–98.

Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ia., Potapova T.A., Voevoda M.I. Respiratory system response to cooling in subjects with single nucleotide polymorphism rs11562975 in the gene for thermosensitive TRPM8 ion channel // Fiziol. Cheloveka. 2014. V. 40. No. 2. P. 94–98. (In Russian).

Козырева Т.В., Ткаченко Е.Я., Потапова Т.А. Ромащенко А.Г., Воевода М.И. Связь однонуклеотидного полиморфизма rs11562975 гена термочувствительного ионного канала TRPM8 с чувствительностью человека к холоду и ментолу // Физиол. человека. 2011. Т. 37. № 2. С. 71–76.

Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ia., Potapova T.A., Romashchenko A.G., Voevoda M.I. Association of singlenucleotide polymorphism rs11562975 in the thermosensitive ion channel TRPM8 gene with human sensitivity to cold and menthol // Fiziol. Cheloveka. 2011. V. 37. No. 2. P. 71–76. (In Russian).

Потапова Т.А., Юдин Н.С., Бабенко В.Н., Пилипенко И.В., Кобзев В.Ф., Гыргольжау Л.А., Воевода М.И. Полиморфизм гена холодового рецептора TRPM8 в этнических группах Сибири и Дальнего Востока // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 749–754.

Potapova T.A., Yudin N.S., Babenko V.N., Pilipenko I.V., Kobsev V.F., Gyrgol'kau L.A., Voevoda M.I. Polymorphism for the cold receptor gene TRPM8 in ethnic groups of Siberia and the Far East // Inform. Vestnik VOGiS. V. 12. No. 4. P. 749–754. (In Russian).

Симонова Т.Г. Тепло- и влагообмен в дыхательных путях // Физиология дыхания. СПб., 1994. С. 139.

Simonova T.G. Heat and moisture exchange in the respiratory pathways // Physiology of Breath. SPb, 1994. P. 139–158. (In Russian).

Слоним А.Д. Учение о физиологических адаптациях. Экологическая физиология животных. Л.: Наука, 1979.

Slonim A.D. Doctrine of physiological adaptations. Ecological Physiology of Animals. Leningrad: Nauka,1979. P. 79–182 (In Russian).

Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function // Neuropharmacology. 1999. V. 38. No. 8. P. 1083–1152.

Bautista D.M., Siemens J., Glazer J.M. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold // Nature. 2007. V. 448. P. 204–208.

Blessing W.W., Seaman B. 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats // Neuroscience. 2003. V. 117. No. 4. P. 939–948.

Bligh J., Cottle W.H. The influence of ambient temperature on thermoregulatory responses to intraventricularly injected monoamines in sheep, goats and rabbits // Experientia. 1969. V. 25. No. 6. P. 608–609.

Boulant J.A. Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. V. 856. P. 108–115.

Brück K., Zeisberger E. Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis // Pharmacol. Therapeut. 1987. V. 35. No. 1/2. P. 163–215.

Caterina M.J. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 292. No. 1. P. R64–R76.

Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeitz K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor // Science. 2000. V. 288. No. 5464. P. 306–313.

Garami A., Pakai E., Oliveira D.L., Steiner A.A., Wanner S.P., Almeida M.C., Lesnikov V.A., Gavva N.R., Romanovsky A.A. Thermoregulatory phenotype of the trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesis // J. Neurosci. 2011. V. 31. No. 5. P. 1721–1733.

Gavva N.R., Bannon A.W., Hovland D.N., Lehto S.G., Klionsky L, Surapaneni S., Immke D.C., Henley C., Arik L., Bak A., Davis J., Ernst N., Hever G., Kuang R., Shi L., Tamir R., Wang J., Wang W., Zajic G., Zhu D., Norman M.H., Louis J.C., Magal E., Treanor J.J. Repeated administration of vanilloid receptor TRPV1 antagonists attenuates hyperthermia elicited by TRPV1 blockade // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. V. 323. No. 1. P. 128–137.

Hemingway A., Birzis L. Effect of hypoxia on shivering // J. Appl. Physiol. 1956. V. 8. No. 6. P. 577–579.

Hensel H. Thermoreceptors // Ann. Rev. Physiol. 1974. V. 36. P. 233–249.

Hori T., Nakayama T. Effects of biogenic amines on central thermoresponsive neurones in the rabbit // J. Physiol. 1973. V. 232. No. 1. P. 71–85.

Jordt S.E., McKemy D.D., Julius D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation // Curr. Opin. Neurobiol. 2003. V. 13. No. 4. P. 487–492.

Kozyreva T.V. Neurophysiological aspects of the long-term adaptation to cold in mammals: The role of central and peripheral thermoreceptors // J. Thermal Biology. 2006. V. 31. P. 105–114.

Kozyreva T.V. Participation of cold sensitive TRPM8 ion channel in modulation of metabolism and immune response // Frontiers Immunol. 2013. doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00951

Kozyreva T.V., Eliseeva L.S. Immune response in cold exposures of different types // J. Thermal. Biol. 2000. V. 25. P. 401–404.

Kozyreva T.V., Khramova G.M., Eliseeva L.S. The influence of TRPM8 ion channel activation on immune response at different temperature conditions // J. Thermal Biol. 2012. V. 37. P. 648–653.

Kozyreva T.V., Kozaruk V.P., Tkachenko E.Ia., Khramova G.M. Agonist of TRPM8 channel, mentol, facilitates the initiation of thermoregulatory responses to external cooling // J. Thermal Biol. 2010. V. 35. P. 428–434.

Kozyreva T.V., Pierau Fr.-K. Effect of cold adaptation and noradrenaline on thermosensitivity of rat hypothalamic neuron studied *in vitro* // Neurophysiology. 1994. V. 26. No. 3. P. 142–146.

Kozyreva T.V., Tkachenko E.Ya., Kozaruk V.P., Latysheva T.V., Gilinsky M.A. Effects of slow and rapid cooling on catecholamine concentration in arterial plasma and the skin // Am. J. Physiol. Regul. Integr. 1999. V. 45. P. R1668–R1672.

Lee H., Iida T., Mizuno A., Suzuki M., Caterina M.J. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4 // J. Neurosci. 2005. V. 25. No. 5. P. 1304–1310.

Lin M.T., Tsay H.J., Su W.H., Chueh F.Y. Changes in extracellular serotonin in rat hypothalamus affect thermoregulatory function // Am. J. Physiol. 1998. V. 274. No. 5. Pt 2. P. R1260–1267.

McKemy D.D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold // Mol. Pain. 2005. V. 1. No. 1. P. 16–22.

McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // Nature. 2002. V. 416. No. 6876. P. 52–58.

Nakayama T., Eisenman J.S., Hardy J.D. Single unit activity of anterior hypothalamus during local heating // Science. 1961. V. 134. No. 3478. P. 560–561.

Nicholas A.C., Seiden L.S. Ambient temperature influences core body temperature response in rat lines bred for differences in sensitivity to 8-hydroxy-dipropylaminotetralin // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. No. 1. P. 368–374.

Oerther S. Temperature set-point changes induced by DA D2/3 and 5-HT1A receptor agonists in the rat // Neuroreport. 2000. V. 11. No. 18. P. 3949–3951.

Patapoutian A., Peier A.M., Story G.M., Viswanath V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation // Neuroscience. 2003. V. 4. No. 7. P. 529–539.

Popova N.K., Konusova A.V. Brain and peripheral effects of serotonin on thermoregulation // Biogenic Amines. 1985. V. 3. No. 2. P. 125–134.

Ramsey I.S., Delling M., Clapham D.E. An introduction to TRP channels // Annu. Rev. Physiol. 2006. V. 68. P. 619–647.

Tajino K., Matsumura K., Kosada K., Shibakusa T., Inoue K., Fushiki T., Hosokawa H., Kobayashi S. Application of menthol to the skin of whole trunk in mice induces autonomic and behavioral heat-gain responses // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2007. V. 293. No. 5. P. R2128–R2135.

Vay L., Gu Ch., McNaughton P.A., The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 165. No. 4. P. 787–801.

Voronova I.P., Kulikov A.V., Popova N.K., Kozyreva T.V. Expression of the 1a and 2a serotonin receptor genes in the brain of rats adapted to warm and cold // J. Thermal Biol. 2007. V. 32. P. 188–192.

Voronova I.P., Tuzhikova A.A., Kozyreva T.V. Gene expression of thermosensitive TRP ion channels in the rat brain structures: Effect of adaptation to cold // J. Thermal. Biol. 2013. V. 38. P. 300–304.

Watanabe T., Morimoto A., Murakami N. Effect of amine on temperature-responsive neurons in slice preparation of rat brain stem // Am. J. Physiol. 1986. V. 250. No. 4. Pt 2. P. R553–R559.

INVOLVEMENT OF NEUROGENOMIC REGULATION IN THE MAINTENANCE OF TEMPERATURE HOMEOSTASIS IN THE COLD

T.V. Kozyreva, I.P. Voronova

Institute of Physiology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: kozyreva@physiol.ru

Summary

The article presents data from several studies, which testify to the important role of the genome in the regulation of temperature homeostasis.

Long-term adaptation to cold causes specific changes in the expression of genes for thermosensitive TRP ion channels (TRPV3) and serotonin receptors (5HT-2A) in the hypothalamus. These changes are specific for the hypothalamus, the center of thermoregulation, and they are not observed in other brain divisions. This may indicate that adaptive changes in the thermal sensitivity of hypothalamic neurons involve at least two adaptive genomic mechanisms, which regulate changes in the ratio between thermosensitive TRP ion channels and mediator receptors located in a neuron. These two mechanisms can complement each other.

With regard to the important role of ion channel TRPM8 in the formation of cold-defense thermoregulatory, metabolic, and immune responses, it is reasonable to assume that variations in the functioning of the ion channel lead to the formation of diverse individual defense responses to environmental changes.

Studies on humans provide evidence for the role of the rs11562975 single nucleotide polymorphism in the TRPM8 gene in the variability of temperature perception and, consequently, the development of cold defense response. Individuals with the heterozygous genotype GC are more sensitive to cold and less sensitive to menthol, agonist of the TRPM8 ion channel, compared with people with the homozygous GG genotype. In addition, this polymorphism results in the hypometabolic response to cooling, which is less energy-consuming.

Key words: temperature, gene expression, polymorphism, TRP ion channels, serotonin receptors.

УДК 577.25

ВЛИЯНИЕ ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА (GDNF) НА УРОВЕНЬ мРНК ГЕНОВ АПОПТОЗА Bax И Bcl-xl В МОЗГЕ МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ПАТОЛОГИЧЕСКОМУ ПОВЕДЕНИЮ

© 2014 г. **А.С. Цыбко, Т.В. Ильчибаева, В.С. Науменко**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: antoncybko@mail.ru

Поступила в редакцию 14 сентября 2014 г. Принята к публикации 6 ноября 2014 г.

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), как и другие нейротрофические факторы, обладает способностью подавлять процессы апоптоза *in vitro*. В то же время ничего не известно про антиапоптотическую активность GDNF *in vivo*. В работе исследован эффект центрального введения GDNF на уровень мРНК генов проапоптотического белка Bax и антиапоптотического белка Bcl-xl в мозге мышей линии ASC, характеризующихся генетической предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению, и «недепрессивной» родительской линии CBA. Показано, что инъекция GDNF приводит к увеличению уровня мРНК гена Bcl-xl в гиппокампе мышей обеих линий ($p < 0,05$), а также мРНК гена Bax ($p < 0,01$) в гиппокампе мышей ASC. Таким образом, мы обнаружили как анти-, так и проапоптотические эффекты GDNF *in vivo*, которые, по-видимому, в значительной степени зависят от генотипа животных. Также выявлены существенные межлинейные различия в уровне мРНК генов Bax и Bcl-xl. Было показано, что у мышей линии ASC существенно повышен уровень мРНК гена Bax ($p < 0,001$; $p < 0,01$) во всех исследованных структурах, а также уровень мРНК гена Bcl-xl ($p < 0,01$) в среднем мозге. Полученные результаты указывают как на активацию процессов апоптоза у мышей ASC, так и на существенные компенсаторные изменения, вероятно, направленные на повышение у них порога нейронального апоптоза.

Ключевые слова: гены апоптоза, депрессивно-подобное поведение, Bax, Bcl-xl, GDNF, мыши ASC.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время существует значительное число доказательств того, что депрессивные расстройства сопряжены с активацией иммунных, воспалительных, оксидативных и нитрозативных стрессовых путей (Maes, 2008; Maes *et al*., 2011; Moylan *et al*., 2013). Внешние стрессовые факторы в совокупности с внутренними стрессорами (например с воспалением) могут индуцировать указанные пути, что подтверждает их вовлечение в этиологию депрессии (Maes, 2008; Anisman, 2009; Miller *et al.*, 2009). Кроме того, известно, что депрессия сопровождается структурными изменениями в гиппокампе, префронтальной коре, миндалине, опоясывающей извилине и базальных ганглиях (Campbell, MacQueen, 2006). Одним из основных механизмов, подавляющих нейрогенез и провоцирующих депрессивные состояния, являются процессы апоптоза (Kubera *et al.*, 2011). Существуют два основных пути клеточной смерти – внешний, опосредуемый рецепторами фактора некроза опухоли, и внутренний (также называемый митохондриальным), контролируемый белками семейства Bcl-2 (Youle, Strasser, 2008). Белки данного семейства подразделяются на три группы: ингибиторы апоптоза, белки с проапоптотической активностью, а также отдельная группа регуляторных белков (Youle,

Strasser, 2008). Белки ингибиторы апоптоза обладают выраженным функциональным антагонизмом по отношению к Bax (Kim *et al*., 2005). Особый интерес среди антиапоптотических белков представляет Bcl-xl, который проявляет чувствительность к стрессовым воздействиям, антидепрессантам и стабилизаторам настроения (Kosten *et al*., 2008; Kubera *et al*., 2011; Dygalo *et al*., 2012; Shishkina *et al*., 2012).

Представление о том, что эффективность антидепрессантов в значительной степени зависит от усиления процессов нейрогенеза и нейрональной пластичности (Duman, Aghajanian, 2012), способствует интенсивному изучению нейротрофических факторов как мишеней для антидепрессантной терапии. Более того, нейротрофический фактор мозга (BDNF) уже долгое время рассматривается как антидепрессантный агент (Siuciak *et al*., 1997; Shirayama *et al*., 2002; Hoshaw *et al*., 2005; Naumenko *et al*., 2012). Глиальный нейротрофический фактор (GDNF), известен, в первую очередь, как перспективное средство для лечения болезни Паркинсона (Peterson, Nutt, 2008), однако сведения об участии GDNF в патогенезе депрессии (Liu *et al*., 2012) позволили рассматривать его как потенциальный антидепрессантный агент. Хотя в наших предыдущих исследованиях GDNF не оказал отчетливого антидепрессантного действия, нами был выявлен ряд интересных эффектов на поведение мышей линии ASC (Antidepressant Sensitive Catalepsy) и экспрессию у них ключевых генов 5-НТ системы (Семенова и др., 2013; Naumenko *et al*., 2013). Немаловажным свойством нейротрофических факторов является их антиапоптотическая активность, направленная на подавление про- и активацию антиапоптотических белков, в том числе Bcl-xl. На сегодняшний день данные свойства обнаружены практически у всех основных нейротрофинов и ростовых факторов, таких как NGF (Mogi *et al*., 2000), FGF-2 (Kim *et al*., 2012), TGF-β1 (Buisson *et al*., 2003), BDNF (Chao *et al*., 2011) и GDNF (Cao *et al*., 2013). Однако практически все антиапоптотические эффекты GDNF продемонстрированы в культурах клеток. Существует единственная публикация, посвященная антиапоптотическому эффекту GDNF *in vivo* (Oo *et al*., 2003), не объясняющая возможный механизм, которым этот эффект достигается. Кроме того, известно лишь, что GDNF активирует экспрессию Bcl-2, но нет данных о влиянии на экспрессию Bcl-xl. Другим важным вопросом является оценка эффекта GDNF у мышей ASC. Данная линия была создана А.В. Куликовым в ИЦиГ СО РАН путем селекции на высокую предрасположенность к каталепсии. Мыши ASC характеризуются выраженными депрессивно-подобными чертами поведения и проявляют чувствительность к антидепрессантам, т. е. соответствуют критериям генетической модели депрессии (Kulikov *et al*., 2008; Tikhonova *et al*., 2013).

Таким образом, целью данной работы стало выявление эффекта центрального введения GDNF на уровень мРНК генов белков апоптоза Bax и Bcl-xl в мозге мышей с генетически детерминированным депрессивно-подобным поведением и мышей родительской «недепрессивной» линии СВА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Опыты проводили на взрослых самцах мышей линии ASC, отличающихся наследственной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению (Kulikov *et al*., 2008), и мышах родительской «недепрессивной» линии СВА. Животных содержали в пластиковых клетках размером 40 × 30 × 15 см в стандартных условиях (температура 18–22 °С, относительная влажность 50–60 %, естественное освещение – 12 ч света и 12 ч темноты) со свободным доступом к стандартной пище и воде. За 2 дня до проведения эксперимента мышей рассаживали в индивидуальные клетки для снятия групповых эффектов. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996).

Препарат. GDNF человека («Peprotech», США) растворяли в стерильной воде и вводили мышам в левый боковой желудочек мозга (AP: –0,5 мм, L: –1,6 мм, DV: 2 мм) (Slotnick, Leonard, 1975) в дозе 800 нг на животное. Выбор низкой дозы препарата (менее 0,1 мкг) продиктован имеющимися в литературе данными об отсутствии токсических эффектов GDNF при его введении в небольшой концентрации (Taylor

et al., 2013). Перед процедурой центрального введения препарата животных подвергали кратковременному (20–30 с) эфирному наркозу. Животные контрольной группы получали инъекции стерильной воды. Объем жидкости, вводимой центрально, составлял 5 мкл. Через 21 день животные были декапитированы, были взяты средний мозг, гиппокамп и фронтальная кора. Образцы хранились при температуре –70 °С до процедуры выделения РНК.

Выделение общей РНК. Общая РНК была выделена с помощью TRIzol Reagent («Life technologies», USA) в соответствии с инструкцией производителя. РНК была разведена водой до концентрации 0,125 мкг/мкл и хранилась при –70 °С. Присутствие примесей геномной ДНК в препаратах РНК определяли в соответствии с протоколом, описанным ранее (Науменко, Куликов, 2006; Naumenko *et al*., 2008).

Реакция обратной транскрипции. Общая РНК (8 мкл, или 1 мкг) была смешана со 180 нг статистического праймера длиной 6 нуклеотидов (конечная концентрация праймера составила 5 мкМ) и 2,25 мкМ стерильного KCl в объеме 16 мкл, денатурирована при 94 °С в течение 5 мин на амплификаторе Hybaid Omn-E (UK), после чего был проведен отжиг при 41 °С в течение 15 мин, затем было добавлено 15 мкл смеси, содержащей обратную транскриптазу M-MLV (200 ед.), Tris-HCl (pH = 8,3, 0,225 мкмоль), смесь dNTP (0,015 мкмоль каждого), DTT (0,225 мкмоль) и $MnCl_2$ (0,03 мкмоль). Полученная смесь (конечным объемом 31 мкл) была инкубирована при 41 °С в течение 60 мин. Синтезированная кДНК хранилась при температуре –20 °С.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (real-time PCR). Праймеры, используемые для амплификации кДНК исследуемых генов (табл.), разработаны на основе последовательностей, опубликованных в базе данных EMBL Nucleotide database, и синтезированы в компании «Биосан» (г. Новосибирск). 1 мкл кДНК смешивали с 2,5 мкл ПЦР буфера (содержит интеркалирующий краситель SYBR green I и референсный краситель ROX), 2,5 мкл 2,5 мМ дНТФ, 2,5 мкл 25 мМ $MgCl_2$, 2,5 мкл смеси праймеров (прямого и обратного), 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы и стерильной воды до конечного объема 25 мкл. При приготовлении реакционной смеси были использованы наборы реагентов «Синтол» (г. Москва, Россия). ПЦР была проведена на амплификаторе C1000 Thermo cycler (Bio-Rad, USA) в соответствии со следующим протоколом: 3 мин 94 °С, 1 цикл; 10 с при 94 °С, 30 с при 59 °С (ГФД) или 64 °С (Bax, Bcl-xl), 30 с при 72 °С, 40 циклов. Серия разведений геномной ДНК с концентрацией 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 нг/мкл амплифицировалась одновременно в отдельных пробирках и использовалась как внешний экзогенный стандарт для построения калибровочной кривой. Калибровочная кривая в координатах Ct (значение порогового цикла) – log P (десятичный логарифм количества стандарта ДНК) была построена автоматически программным обеспечением Bio-Rad. Экспрессия генов представлена как отношение количества кДНК исследуемого гена к 100 копиям гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГФД), выполняющей функцию внутреннего стандарта.

Статистическая обработка результатов. Результаты были представлены как m ± SEM и сравнивались с использованием двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным множественным сравнением

Таблица

Нуклеотидные последовательности праймеров и их характеристики

Ген	Нуклеотидная последовательность	$T_{отж.}$, °С	Длина продукта ПЦР, п.н.
Bax	F5′-catctttgtggctggagtcctc-3′ R5′-aagtggacctgaggtttattggc-3′	64	216
Bcl-xl	F5′-tggatctctacgggaacaatgc-3′ R5′-gtggctgaagagagagttgtgg-3′	64	197
ГФД	F5′-gcaaggtcatcccagagctg-3′ R5′-gtccaccaccctgttgctgtag-3′	59	326

по Фишеру с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0.

Работа с животными выполнялась в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (гранты Минобрнауки России №RFMEFI61914X0005 и №RFMEFI62114X0010).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект GDNF ($F_{1,30} = 10,9$; $p < 0,01$) и линии ($F_{1,30} = 36,02$; $p < 0,001$), но не взаимодействия этих факторов ($F_{1,30} = 1,07$; $p > 0,05$) на уровень мРНК гена, кодирующего проапоптотический белок Bax в гиппокампе (рис. 1). Апостериорное сравнение показало, что внутрижелудочковое введение GDNF привело к значительному повышению уровня мРНК Bax у мышей ASC ($p < 0,01$), но не у мышей CBA ($p = 0,09$). Вместе с этим у мышей ASC наблюдается более высокий уровень мРНК гена Bax по сравнению с мышами CBA ($p < 0,01$). В среднем мозге и фронтальной коре также выявлен сильный эффект линии ($F_{1,30} = 98,3$; $p < 0,001$ в среднем мозге и $F_{1,29} = 10,2$; $p < 0,01$ во фронтальной коре), но не GDNF ($F_{1,30} = 1,35$; $p > 0,05$ в среднем мозге и $F_{1,29} = 2,7$; $p > 0,05$ во фронтальной коре) и взаимодействия GDNF × линия ($F_{1,30} = 1,39$; $p > 0,05$ в среднем мозге и $F_{1,29} = 0,9$); $p > 0,05$ во фронтальной коре). Апостериорное сравнение показало, что и в среднем мозге, и во фронтальной коре у мышей ASC повышен уровень мРНК гена Bax по сравнению с мышами линии CBA ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно) (рис. 1).

Внутрижелудочковая инъекция GDNF оказала существенный эффект на уровень мРНК гена антиапоптотического белка Bcl-xl в гиппокампе мышей ASC и CBA (рис. 2). Двухфакторный дисперсионный анализ показал эффект линии ($F_{1,30} = 5,53$; $p < 0,05$), GDNF ($F_{1,30} = 11,9$; $p < 0,01$), но не взаимодействия факторов ($F < 1$; $p > 0,05$). GDNF вызвал повышение уровня мРНК Bcl-xl как в гиппокампе мышей ASC ($p < 0,05$), так и мышей CBA ($p < 0,05$). Также выявлен эффект GDNF во фронтальной коре

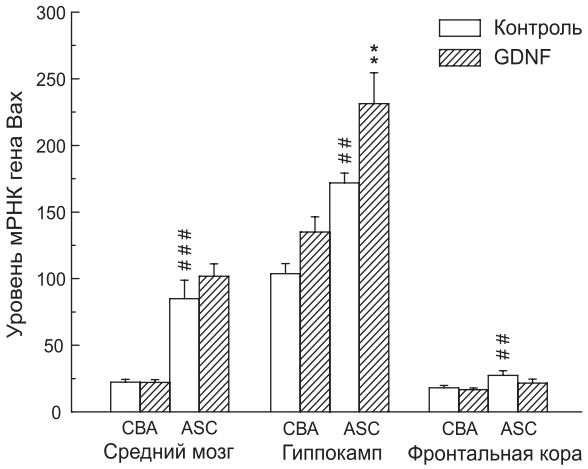


Рис. 1. Влияние GDNF на уровень мРНК гена Bax в структурах мозга мышей ASC и CBA.

Число копий кДНК Bax отнесено на 100 копий кДНК ГФД. $n \geq 8$. ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем ASC; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ по сравнению с контролем CBA.

Fig. 1. Effect of GDNF on the Bax mRNA level in brain divisions of ASC and CBA mice.

The level of Bax gene expression is assessed as the number of cDNA copies per 100 copies of GAPDH cDNA. The data are presented as the mean ± SEM for at least eight animals, and the groups are compared using two-way ANOVA. ** $p < 0,01$ with reference to control ASC animals; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ with reference to control CBA animals.

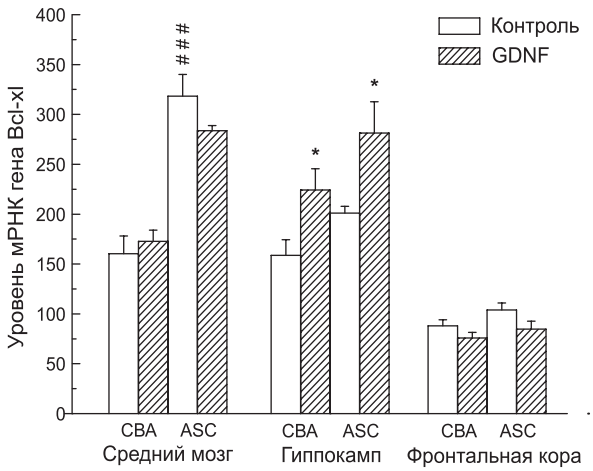


Рис. 2. Влияние GDNF на уровень мРНК гена Bcl-xl в структурах мозга мышей ASC и CBA.

Число копий кДНК Bax отнесено на 100 копий кДНК ГФД. $n \geq 8$. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем ASC и CBA; ### $p < 0,001$ по сравнению с контролем CBA.

Fig. 2. Effect of GDNF on the Bcl-xl mRNA level in brain divisions of ASC and CBA mice.

The level of Bcl-xl gene expression is assessed as the number of cDNA copies per 100 copies of GAPDH cDNA. The data are represented as the mean ± SEM for at least eight animals, and the groups are compared using two-way ANOVA. * $p < 0,05$ with reference to control ASC and CBA animals; ### $p < 0,001$ with reference to control CBA animals.

($F_{1,28} = 5,5$; $p < 0,05$), который, однако, не подтвердился при апостериорном сравнении, показавшем лишь тенденцию к понижению уровня мРНК Bcl-xl у мышей линии ASC ($p = 0,06$). В среднем мозге выявлен лишь эффект линии ($F_{1,29} = 63,3$; $p < 0,001$) (рис. 2), выраженный в существенно более высоком уровне мРНК гена Bcl-xl у мышей ASC по сравнению с мышами CBA ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами впервые показано, что GDNF способен увеличивать уровень мРНК антиапоптотического белка Bcl-xl *in vivo*. Активирующий эффект GDNF на экспрессию антиапоптотического белка Bcl-xl в гиппокампе мышей ASC и CBA сходен с эффектом антидепрессантов ингибиторов МАО А и обратного захвата серотонина. Известно, что обработка флюоксетином и моклобемидом стволовых клеток, полученных из гиппокампа крысы, существенно повышает экспрессию Bcl-xl и Bcl-2 (Chiou *et al*., 2006; Chen *et al*., 2007); антидепрессанты ребоксетин и транилципромин повышают экспрессию Bcl-xl в гиппокампе крыс *in vivo* (Kosten *et al*., 2008). Также показано увеличение экспрессии гена Bcl-xl в стволе мозга крыс после хронического введения флюоксетина на фоне стресса (Shishkina *et al*., 2012). Усиление экспрессии гена Bcl-xl, наблюдавшееся у животных, получивших инъекцию GDNF, вероятно, также направлено на минимизацию эффектов проапоптотических белков. Молекулярные механизмы, путем которых GDNF может регулировать экспрессию Bcl-xl, в точности не известны. Можно предположить, что GDNF оказывает воздействие на MAPK сигнальный путь и транскрипционный фактор NF-kB, подобно BDNF, для которого уже показан подобный путь регуляции белков группы Bcl-2 (Kosten *et al*., 2008; Dygalo *et al*., 2012).

В экспериментах на культурах клеток было показано снижение экспрессии гена Bax после обработки GDNF (Cao *et al*., 2013), однако *in vivo* GDNF, напротив, увеличил уровень мРНК Bax в гиппокампе мышей ASC. Подобный эффект может быть связан с особенностями самих мышей данной линии. Ранее нами неоднократно была продемонстрирована повышенная чувствительность мышей ASC к действию нейротрофических факторов BDNF и GDNF (Naumenko *et al*., 2012, 2013). В частности, это выражалось в изменении экспрессии ключевых генов серотониновой системы, не наблюдавшемся у мышей CBA. Не исключено, что у мышей ASC повышенную чувствительность к GDNF проявляют не только 5-HT система, но и ряд других важных систем, в том числе тех, что контролируют процессы апоптоза. Важно и то, что повышение уровня мРНК гена Bax также сопровождалось повышением уровня мРНК гена Bcl-xl, что еще раз подчеркивает важность сохранения баланса про- и антиапоптотических молекул для поддержания достаточной стрессоустойчивости животных.

Интересным результатом данной работы являются выявленные нами межлинейные различия в уровне мРНК генов Bax и Bcl-xl. Во всех исследованных структурах мозга у мышей линии ASC наблюдается существенно более высокий уровень мРНК гена Bax, чем у мышей линии CBA. Ранее у мышей ASC были выявлены нейроанатомические изменения, выраженные в уменьшении размеров промежуточного мозга (включая гипоталамус) и стриатума (Tikhonova *et al*., 2013). Наличие нейродегенеративных изменений может свидетельствовать об усилении процессов апоптоза, о чем можно судить по увеличению экспрессии гена одного из основных проапоптотических белков – Bax. С другой стороны, в среднем мозге мышей ASC нами выявлен повышенный уровень мРНК гена Bcl-xl. Известно, что в ответ на острый стресс существенно повышается экспрессия Bcl-xl (Shishkina *et al*., 2012). Повышение уровня мРНК Bcl-xl по отношению к уровню мРНК Bax может повышать порог нейронального апоптоза (Dygalo *et al*., 2012; Shishkina *et al*., 2012), что, в свою очередь, может усиливать стрессоустойчивость животных. Наличие же высокого уровня мРНК Bcl-xl в мозге мышей ASC свидетельствует о глубоких компенсаторных изменениях, возможно, направленных на устранение эффектов Bax.

Таким образом, нами впервые показано, что центральная инъекция GDNF приводит к существенному увеличению уровня мРНК белков апоптоза Bax и Bcl-xl. Кроме того, нами выявлены существенные изменения в уровне

мРНК Bax и Bcl-xl у животных с наследственной предрасположенностью к депрессивно-подобному поведению, что может свидетельствовать о повышении у них порога нейронального апоптоза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (грант № 14-25-00038).

ЛИТЕРАТУРА

Науменко В.С., Куликов А.В. Количественное определение экспрессии гена 5-НТ1А серотонинового рецептора в головном мозге // Молекуляр. биология. 2006. Т. 40. С. 37–44.
Naumenko V.S., Kulikov A.V. Quantitative assay of 5-HT(1A) serotonin receptor gene expression in the brain // Mol. Biol. (Mosc). 2006. V. 40. No. 1. P. 37–44. (In Russian).

Семенова А.А., Базовкина Д.В., Цыбко А.С., Науменко В.С., Попова Н.К. Влияние GDNF на поведение мышей линии ASC с высокой наследственной предрасположенностью к каталепсии // Журн. высш. нерв. деятельности. 2013. Т. 63. С. 495–501.
Semenova A.A., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Naumenko V.S., Popova N.K. Effect of GDNF on the behavior of ASC mice with high hereditary predisposition to catalepsy // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. Im. I.P. Pavlova. 2013. V. 63. No. 4. P. 495–501. (In Russian).

Anisman H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder // J. Psychiatry Neurosci. 2009. V. 34. P. 4–20.

Buisson A., Lesne S., Docagne F., Ali C., Nicole O., MacKenzie E.T., Vivien D. Transforming growth factor-beta and ischemic brain injury // Cell Mol. Neurobiol. 2003. V. 23. No. 4/5. P. 539–550.

Campbell S., MacQueen G. An update on regional brain volume differences associated with mood disorders // Curr. Opin. Psychiatry. 2006. V. 19. No. 1. P. 25–33.

Cao J.P., Niu H.Y., Wang H.J., Huang X.G., Gao D.S. NF-κB p65/p52 plays a role in GDNF up-regulating Bcl-2 and Bcl-w expression in 6-OHDA-induced apoptosis of MN9D cell // Int. J. Neurosci. 2013. V. 123. No. 10. P. 705–710.

Chao C.C., Ma Y.L., Lee E.H. Brain-derived neurotrophic factor enhances Bcl-xL expression through protein kinase casein kinase 2-activated and nuclear factor kappa B-mediated pathway in rat hippocampus // Brain Pathol. 2011. V. 21. No. 2. P. 150–162.

Chen S.J., Kao C.L., Chang Y.L., Yen C.J., Shui J.W., Chien C.S., Chen I.L., Tsai T.H., Ku H.H., Chiou S.H. Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotoninergic differentiation through bcl-2 // Curr. Neurovasc. Res. 2007. V. 4. No. 1. P. 19–29.

Chiou S.H., Ku H.H., Tsai T.H., Lin H.L., Chen L.H., Chien C.S., Ho L.L., Lee C.H., Chang Y.L. Moclobemide upregulated Bcl-2 expression and induced neural stem cell differentiation into serotoninergic neuron via extracellular-regulated kinase pathway // Br. J. Pharmacol. 2006. V. 148. No. 5. P. 587–598.

Duman R.S., Aghajanian G.K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets // Science. 2012. V. 338. No. 6103. P. 68–72.

Dygalo N.N., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Shishkina G.T. Increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain is associated with resilience to stress-induced depression-like behavior // Cell. Mol. Neurobiol. 2012. V. 32. No. 5. P. 767–76.

Hoshaw B.A., Malberg J.E., Lucki I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects // Brain Res. 2005. V. 1037. P. 204–208.

Kim H.R., Heo Y.M., Jeong K.I., Kim Y.M., Jang H.L., Lee K.Y., Yeo C.Y., Kim S.H., Lee H.K., Kim S.R., Kim E.G., Choi J.K. FGF-2 inhibits TNF-2 mediated apoptosis through upregulation of Bcl2-A1 and Bcl-xL in ATDC5 cells // BMB Rep. 2012. V. 45. No. 5. P. 287–292.

Kim R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 333. No. 2. P. 336–343.

Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S., Russell D.S., D'Sa C. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures // Neuropsychopharmacology. 2008. V. 33. P. 1545–1558.

Kubera M., Obuchowicz E., Goehler L., Brzeszcz J., Maes M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2011. V. 35. No. 3. P. 744–759.

Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice // Genes Brain Behav. 2008. V. 7. P. 506–512.

Liu Q., Zhu H.Y., Li B., Wang Y.Q., Yu J., Wu G.C. Chronic clomipramine treatment restores hippocampal expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of depression // J. Affect. Disord. 2012. V. 141. No. 2/3. P. 367–372.

Maes M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative and nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression // Neuro. Endocrinol. Lett. 2008. V. 29. No. 3. P. 287–291.

Maes M., Galecki P., Chang Y.S., Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2011. V. 35. No. 3. P. 676–692.

Miller A.H., Maletic V., Raison C.L. Infammation and its discontents: the role of cytokinesin in the pathophysiology of major depression // Biol. Psychiatry. 2009. V. 65. P. 732–741.

Mogi M., Kondo A., Kinpara K., Togari A. Anti-apoptotic action of nerve growth factor in mouse osteoblastic cell line // Life Sci. 2000. V. 67. No. 10. P. 1197–1206.

Moylan S., Maes M., Wray N.R., Berk M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to dis-

ease evolution and resistance, and therapeutic implications // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. No. 5. P. 595–606.

Naumenko V.S., Bazovkina D.V., Semenova A.A., Tsybko A.S., Il'chibaeva T.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in mouse strains genetically predisposed to behavioral disorders // J. Neurosci. Res. 2013. V. 91. No. 12. P. 1628–1638.

Naumenko V.S., Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Tsybko A.S., Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Popova N.K. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains // Neuroscience. 2012. V. 214. P. 59–67.

Naumenko V.S., Osipova D.V., Kostina E.V., Kulikov A.V. Utilization of a two-standard system in real-time PCR for quantification of gene expression in the brain // J. Neurosci. Methods. 2008. V. 170. P. 197–203.

Oo T.F., Kholodilov N., Burke R.E. Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal glial cell line-derived neurotrophic factor *in vivo* // J. Neurosci. 2003. V. 23. No. 12. P. 5141–5148.

Peterson A.L., Nutt J.G. Treatment of Parkinson's disease with trophic factors // Neurotherapeutics. 2008. V. 5. No. 2. P. 270–280.

Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression // J. Neurosci. 2002. V. 22. P. 3251–3261.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior // Neuropharmacology. 2012. V. 62. No. 1. P. 177–183.

Siuciak J.A., Lewis D.R., Wiegand S.J., Lindsay R.M. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) // Pharmacol. Biochem. Behav. 1997. V. 56. P. 131–137.

Slotnick B.M., Leonard C.M. A Stereotaxic Atlas of the Albino Mouse Forebrain. Rockville. Maryland: U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, 1975.

Taylor H., Barua N., Bienemann A., Wyatt M., Castrique E., Foster R., Luz M., Fibiger C., Mohr E., Gill S. Clearance and toxicity of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHu GDNF) following acute convection-enhanced delivery into the striatum // PLoS One. 2013. V. 8. No. 3. e56186.

Tikhonova M.A., Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Tsybko A.S., Bazhenova E.Y., Naumenko V.S., Akulov A.E., Moshkin M.P., Popova N.K. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response // Behav. Brain Res. 2013. V. 243. P. 53–60.

Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2008. V. 9. No. 1. P. 47–59.

THE EFFECT OF GLIAL CELL-LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF) ON mRNA LEVEL OF APOPTOTIC GENES Bax AND Bcl-xL IN BRAIN OF MICE GENETICALLY PREDISPOSED TO PATHOLOGICAL BEHAVIOR

A.S. Tsybko, T.V. Il'chibaeva, V.S. Naumenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: antoncybko@mail.ru

Summary

Like other neurotrophic factors, GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) can inhibit apoptosis *in vitro*. However, we know nothing about the antiapoptotic activity of GDNF *in vivo*. An important question is the assessment of GDNF effect in cataleptic ASC mice, genetically predisposed to depressive-like behavior. This prompted us to investigate the effects of central GDNF administration on the levels of mRNAs for the pro-apoptotic protein Bax and anti-apoptotic protein Bcl-xl in brains of the «depressive» ASC mouse strain or the parental «nondepressive» CBA strain. We found that GDNF injection led to an increase in Bcl-xl mRNA level in the hippocampi of both strains ($p < 0,05$), as well as the Bax mRNA level ($p < 0,01$) in the hippocampi of ASC mice. Surprisingly, the obtained data showed not only anti- but also pro-apoptotic effects of GDNF *in vivo*, which could be genotype-dependent. Moreover, we found significant interstrain differences in Bax and Bcl-xl mRNA levels. The Bax mRNA level was elevated ($p < 0,001$; $p < 0,01$) in all investigated brain divisions of ASC mice, and Bcl-xl mRNA level was elevated in the midbrain ($p < 0,01$). To sum up, our data demonstrate both an activation of apoptosis processes in brains of ASC mice and significant compensatory changes probably directed to the rise of the threshold for neuronal apoptosis.

Key words: apoptotic genes, depressive-like behavior, Bax, Bcl-xl, GDNF, ASC mice.

УДК 577.112:591.51:591.481

ЭКСПРЕССИЯ ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ-2 И BCL-XL В МОЗГЕ КРЫС ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ И ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

© 2014 г. **Г.Т. Шишкина[1], Т.С. Калинина[1, 2], В.В. Булыгина[1], Е.В. Баблюк[1], Н.Н. Дыгало[1, 2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 29 сентября 2014 г. Принята к публикации 7 ноября 2014 г.

Стресс сопровождается изменением в мозге экспрессии множества генов и их белковых продуктов, однако механизмы этих изменений, а также их значение для развития или, напротив, противодействия индуцируемой стрессом депрессии остаются неясными. Имеющиеся в литературе сведения указывают на чувствительность ключевого фермента синтеза серотонина (5-НТ) в мозге триптофангидроксилазы-2 (tryptophan hydroxylase-2; TPH2) к стрессорным воздействиям, индуцирующим депрессивно-подобное состояние у животных, а также на противодействие антиапоптозного белка Bcl-xL формированию этого состояния. Для выяснения неясных взаимоотношений TPH2 и Bcl-xL в ходе развития индуцированной стрессом психопатологии в работе проведено сравнительное исследование экспрессий их генов и белков в областях локализации клеточных тел 5-НТ нейронов в течение повторяющихся стрессорных воздействий. Экспрессию генов оценивали по уровню мРНК, белков – иммуногистохимически, в клетках дорсального и медианного ядер через сутки после повторного и 14-го сеансов принудительного плавания. Обнаруженное повышение экспрессии белка Bcl-xL в 5-НТ клетках обоих ядер после повторного плавания, очевидно, направлено на экстренную защиту этих клеток от повреждающего действия стресса. Свидетельством активации этой защиты служит ассоциированное с Bcl-xL увеличение в клетках количества белка TPH2. В ходе же последующих стрессорных воздействий степень ответного повышения экспрессии Bcl-xL снижалась. Ослабленная в связи с этим защита 5-НТ нейронов сопровождалась уменьшением в них биосинтетических процессов и компенсаторной активацией гена фермента. В целом результаты являются первым свидетельством в пользу наличия в 5-НТ нейронах взаимосвязей между Bcl-xL и TPH2. Помимо потенциальной возможности влиять на предрасположенность или устойчивость организма к формированию индуцируемой стрессом депрессии, эти взаимосвязи могут лежать в основе парадоксального увеличения уровня мРНК *tph2* в ядрах шва головного мозга больных депрессией.

Ключевые слова: стресс вынужденного плавания, триптофангидроксилаза-2, Bcl-xL, депрессия.

СЕРОТОНИН МОЗГА И ДЕПРЕССИЯ

Данные экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о важной роли серотонинергической (5-НТ) системы мозга в развитии и терапии депрессивных расстройств. Нарушение функции 5-НТ системы, преимущественно ее ослабление, многие годы рассматривается в качестве одного из ключевых факторов формирования этой психопатологии (Owens, Nemeroff, 1994; Canli, Lesch, 2007), поэтому неудивительно, что наиболее употребляемые в настоящее время антидепрессанты нацелены на усиление 5-НТ сигнала путем блокады обратного захвата нейромедиатора или активации его рецепторов. Вместе с тем эффек-

тивность этих препаратов оказалась не очень высокой (Celada *et al*., 2013), что обусловливает необходимость новых подходов к увеличению активности 5-НТ нейротрансмиссии. Ключевым ферментом синтеза серотонина специфически в центральной нервной системе является триптофангидроксилаза-2 (tryptophan hydroxylase-2, TPH2) (Walther *et al*., 2003), генная экспрессия которого ограничена ядрами шва головного мозга (Walther, Bader, 2003). Активация синтеза серотонина в мозге воздействием на TPH2 может быть дополнительной возможностью терапии психоэмоциональных расстройств.

В пользу потенциальной эффективности такого пути свидетельствуют выявленные в некоторых работах (например, Zill *et al*., 2004; Tsai *et al*., 2009; Mandelli *et al*., 2012) ассоциации аллельных вариантов гена *tph2* с симптомами болезни. Однако умеренный оптимизм относительно рассмотрения такой возможности существенно снижается отсутствием ассоциации в других исследованиях (например, Mann *et al*., 2008). Важно, что и мета-анализ данных обширных полногеномных исследований не выявил достоверной ассоциации для наиболее распространенного депрессивного расстройства, – так называемой «большой» депрессии, – ни с одним из исследованных генетических маркеров (Ripke *et al*., 2013).

Кроме того, вопреки установившемуся мнению о снижении содержания серотонина в мозге при депрессии, исследование депрессивных больных после суицидального исхода выявило в ряде работ парадоксальное увеличение экспрессии и гена (Bach-Mizrachi *et al*., 2008), и белка (Boldrini *et al*., 2005) фермента в областях локализации клеточных тел 5-НТ нейронов. Однако по данным других исследований, уровень мРНК *tph2* в дорсальном ядре шва не различался между депрессивными и здоровыми людьми (Goswami *et al*., 2010). Также не внесло ясности в понимание роли TPH2 в психопатологии и исследование полных нокаутов по гену фермента: вместо ожидаемого депрессивно-подобного поведенческого фенотипа, животные не отличались по его характеристикам от мышей «дикого» генотипа (Fernandez, Gaspar, 2012).

Для объяснения противоречия между копившимися десятилетиями свидетельствами ключевой роли 5-НТ системы мозга в регуляции психоэмоциональных состояний и явным отсутствием прямой связи этих состояний с генетической изменчивостью фермента, вплоть до полного отсутствия *tph2* в геноме, приводят ряд аргументов. Результаты исследований нокаутов по *tph2* объясняют разобщением у них в процессе развития механизмов, регулирующих поведение и уровень серотонина, а также неизмененным уровнем нейрогенеза в гиппокампе (Klempin *et al*., 2013), последнее, согласно современным представлениям, способно обеспечить нормальный психо-поведенческий фенотип (Kempermann, Kronenberg, 2003). В качестве же возможных причин повышенной экспрессии фермента синтеза серотонина в мозге депрессивных больных, исследованных после их суицида, предполагают гомеостатический ответ на дефицит индоламина у таких больных, реакцию на какие-то обстоятельства перед суицидом, а также последствия неблагоприятного протекания раннего онтогенеза. Отрицательные результаты полногеномных исследований пытаются объяснить все еще недостаточным объемом выборок, небольшим эффектом гена, а также зависимостью его проявления от взаимодействия с другими генетическими системами и со средовыми факторами (Mandelli *et al*., 2012). Безотносительно к надежности вышеизложенных аргументов имеющиеся в настоящее время сведения, безусловно, свидетельствуют о нелинейной связи активности 5-НТ системы мозга и ее ключевого компонента – TPH2, с психопатологией. Эта связь явно осложнена взаимодействиями с внешними для организма факторами, например, стрессорами, провоцирующими депрессивное состояние (Kendler *et al*., 1999; Kessing *et al*., 2003), а также с генетическими системами организма, противодействующими повреждающим эффектам стресса на мозг.

TPH2 В МОЗГЕ ПРИ СТРЕССЕ

Основным источником 5-НТ иннервации структур мозга, включая и ключевые для психоэмоциональной регуляции, служат 5-НТ клетки ядер шва среднего и продолговатого мозга. Уровень 5-НТ нейротрансмиссии в мозге является важным компонентом ответа на стресс, и неадекватность этого ответа у чув-

ствительных к неблагоприятным воздействиям индивидов может привести к депрессии. Все большее количество данных указывает на высокую чувствительность экспрессии гена *tph2* к стрессорным воздействиям (Chamas *et al*., 2004) и вовлеченность изменяемой стрессом экспрессии в психоэмоциональные ответы (Shishkina *et al*., 2007, 2012; Hale *et al*., 2011; Chen, Miller, 2012, 2013; Boyarskikh *et al*., 2013). Вместе с тем направление опубликованных после стресса изменений довольно противоречивое. Например, психосоциальный стресс в течение 5 дней приводил к снижению мРНК *tph2* в дорсальном ядре шва обезьян (Bethea *et al*., 2013). Такой же эффект наблюдался у мышей после хронического, в течение 3 недель, стресса социального поражения (Boyarskikh *et al*., 2013). Однако у взрослых крыс, перенесших в период со 2-го по 14-й дни постнатального развития ежедневное в течение 180 мин отделение от матери, уровень мРНК *tph2* в дорсальном ядре шва после однократного стресса социального поражения был повышен (Gardner *et al*., 2009). Другое стрессорное воздействие – ограничение подвижности взрослых крыс – вызывало увеличение мРНК фермента в дорсальном ядре шва как после воздействия, примененного однократно, так и в течение 3 и 7 дней (Chamas *et al*., 2004). Противоречивость этих изменений может быть обусловлена природой и силой стрессорного воздействия, его продолжительностью, историей предшествующих воздействий и т. д. Кроме того, выявлена неодинаковая чувствительность отдельных ядер к действию стресса (Chamas *et al*., 2004), что может маскировать эффект при их совместном анализе, например, в составе обычно анализируемых в едином образце ткани среднего или стволового отделов мозга.

Психоэмоциональные расстройства могут сопровождаться морфологическими изменениями в области 5-НТ ядер шва, например, уменьшением размера дорсального ядра у депрессивных больных (Matthews, Harrison, 2012) или снижением (на 31 %) количества нейронов в вентролатеральном субрегионе этого ядра (Baumann *et al*., 2002). Эти морфологические изменения предполагают участие регуляторов жизнеспособности клеток, например, белков апоптоза, в эффектах стресса на 5-НТ систему, так же, как, по-видимому, и на психоэмоциональные реакции. Такое стрессорное воздействие, как длительное содержание крыс в полной темноте, приводило к ассоциированному с поведенческими симптомами депрессии увеличению апоптоза в моноаминергических нейронах, включая и 5-НТ нейроны (Gonzalez, Aston-Jones, 2008). Длительное введение антидепрессантов ослабляло проявление депрессивно-подобного состояния животных в тесте Порсолта, и это ослабление сопровождалось увеличением экспрессии Bcl-xL в стволе мозга – области локализации медианного ядра шва (Shishkina *et al*., 2012). С целью выявления возможной взаимосвязи экспрессии Bcl-xL и ТРН2 в ходе развития индуцируемой стрессом депрессии в экспериментах на взрослых самцах крыс нами были получены данные об изменении уровней мРНК и белков этих генов в дорсальном и медианном ядрах шва головного мозга.

ЭКСПРЕССИЯ ТПГ-2 И BCL-XL В ДОРСАЛЬНОМ И МЕДИАННОМ ЯДРАХ ШВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ НЕПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО И ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

В качестве стрессорного воздействия, способного провоцировать у крыс развитие депрессивно-подобного состояния, было использовано принудительное плавание в неизбегаемых условиях, впервые предложенное еще в 1978 г. (Porsolt *et al*., 1978) для преклинической оценки антидепрессантной эффективности препаратов. Это воздействие также широко используется в экспериментальных исследованиях механизмов депрессии (Cryan, Mombereau, 2004; Krishnan, Nestler, 2011; Stepanichev *et al*., 2014). В классическом варианте для крыс принудительное плавание применяется, как правило, один раз в день в течение двух последовательных дней. После повторного воздействия обнаружено увеличение экспрессии гена *tph2* (Shishkina *et al*., 2007) и функциональной активности 5-НТ нейронов (по c-fos-иммунореактивности) в дорсальном ядре шва (Drugan *et al*., 2013). Следует отметить, что некоторые исследователи рассматривают увеличение продолжительности замирания при повторной процедуре плавания как элемент адаптивного поведения, направленного на со-

хранение жизненных сил. В этой связи недавно было обнаружено, что чем больше выражено это «адаптивное» поведение в тесте, тем в меньшей степени животное оказывалось способным противостоять эффектам последующих стрессирующих воздействий на развитие другого общепринятого показателя депрессивно-подобного состояния – ангедонии (Zheng L., Zheng X., 2014). Увеличение числа плаваний усугубляет выраженность симптомов депрессивно-подобного состояния и увеличивает чувствительность к антидепрессантному действию препаратов (Mezadri *et al*., 2011). Поэтому последовательное увеличение числа стрессорных воздействий плаванием может быть использовано в качестве экспериментальной модели, способной вскрыть важные нейробиологические механизмы чувствительности и/или устойчивости к негативным психоэмоциональным эффектам стресса. В нашей работе животные подвергались стрессу принудительного плавания один раз в день (15 мин) в течение 2 или 14 последовательных дней. Через сутки после последнего сеанса плавания в дорсальном и медианном ядрах шва анализировали экспрессию Bcl-xL и TPH2 путем определения уровней их мРНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени и белков – методом флюоресцентной иммуногистохимии, как это было описано в наших работах ранее (Shishkina *et al*., 2007, 2010, 2014).

Проведенные исследования обнаружили увеличение экспрессии гена *tph2* в дорсальном ядре шва после как краткосрочного, так и хронического стресса (рис., а). При этом, однако, значительных изменений количества белка фермента в этом ядре не наблюдалось. В медианном ядре уровень мРНК *tph2* был также достоверно увеличен после хронического стресса, но в отличие от дорсального ядра снижен после повторного плавания. Количество белка фермента в медианном ядре было увеличено после повторного плавания и не отличалось от контроля после длительного стрессорного воздействия. Полученные результаты свидетельствуют о сходстве ответов гена и белка TPH2 в дорсальном и медианном ядрах на длительный стресс и о различии ответов гена фермента в этих ядрах на непродолжительное воздействие. Рассогласование изменений экспрессии гена и белка фермента в исследованных целых ядрах шва может быть обусловлено специфическими особенностями ответов отдельных субрегионов этих ядер, что требует проведения дальнейшего более детального анализа.

Экспрессия гена *bcl-xl* в дорсальном ядре шва демонстрировала тенденцию к увеличению

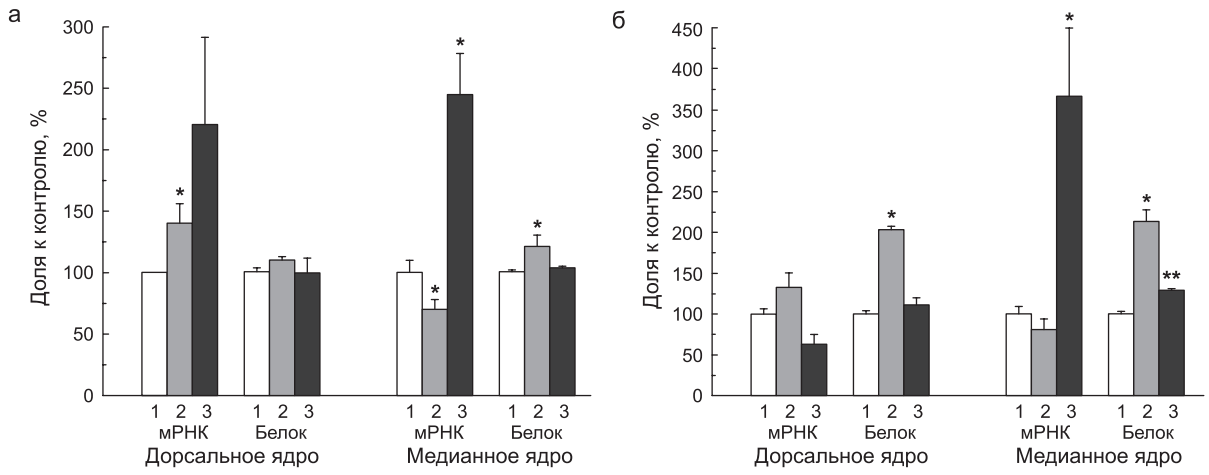


Рис. Экспрессия генов и белков TPH2 (а) и Bcl-xL (б) после стресса принудительного плавания.

1 – контроль (нестрессированные животные), 2 – после двух дней стресса, 3 – после стресса в течение 14 дней. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0,05$ по сравнению с двухдневным воздействием.

Fig. Gene and protein expression of TPH2 (a) and Bcl-xL (b) after the forced swim stress.

1 – control (unstressed animals), 2 – after the second stress, 3 – after stress for 14 days. * $p < 0,05$ vs. an appropriate control; ** $p < 0,05$ vs. the second stress.

($p < 0{,}069$) после непродолжительного воздействия, но к снижению ($p < 0{,}065$) – после длительного воздействия (рис., б). В медианном ядре непродолжительный стресс не влиял на экспрессию гена *bcl-xl*, в то время как длительное воздействие достоверно увеличивало экспрессию антиапоптозного фактора. Уровень белка Bcl-xL был достоверно увеличен в обоих ядрах после непродолжительного воздействия. После двухнедельного принудительного плавания количество антиапоптозного белка в медианном ядре продолжало оставаться повышенным, хотя и в значительно меньшей степени по сравнению с двухдневным воздействием, в то время как в дорсальном ядре содержание Bcl-xL после двух недель не отличалось от уровня у контрольных нестрессированных животных.

Характер индуцированных стрессом изменений экспрессии антиапоптозного белка, а именно повышение уровня белка Bcl-xL, обнаруженное после повторного плавания, может быть проявлением экстренного адаптивного ответа, направленного на защиту нейронов, в том числе и серотонинергических, от повреждающего действия стресса. Острые стрессорные воздействия, среди которых и принудительное плавание, как было показано, индуцируют в мозге гибель клеток (Heine *et al*., 2004). Определенным свидетельством положительного действия Bcl-xL на 5-НТ нейроны после повторного плавания могут служить достоверное увеличение в это время уровня белка ТРН2 в нейронах медианного ядра и небольшая тенденция к такому увеличению, хотя и не достигающему уровня достоверности, в дорсальном ядре. В процессе повторяющихся плаваний ответ белка Bcl-xL на стресс снижается, что может сопровождаться уменьшением защитного эффекта и, возможно, явиться причиной ослабления активности 5-НТ нейронов и, соответственно, 5-НТ нейротрансмиссии в ключевых для психоэмоциональной регуляции структурах мозга. В этих условиях для поддержания базального уровня белка фермента, по крайней мере, в клеточных телах нейронов, очевидно, необходимо повышение активности системы его синтеза. Достоверное увеличение уровня мРНК *tph2* в обоих исследованных ядрах может быть показателем такой компенсаторной активации 5-НТ системы. Хотя представленная гипотеза нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке, она предлагает первый реальный механизм парадоксального увеличения экспрессии гена *tph2* (Bach-Mizrachi *et al*., 2008) и уровня его белка (Boldrini *et al*., 2005) в ядрах шва депрессивных больных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выполнение работы поддержано грантами РФФИ (№ 12-04-01102-а и № 13-04-40014Н\13), средствами бюджетного проекта VI.53.2.2, а также грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

ЛИТЕРАТУРА

Bach-Mizrachi H., Underwood M.D., Tin A., Ellis S.P., Mann J.J., Arango V. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides // Mol. Psychiatry. 2008. V. 13. No. 5. P. 507–513.

Baumann B., Bielau H., Krell D., Agelink M.W., Diekmann S., Wurthmann C., Trübner K., Bernstein H.G., Danos P., Bogerts B. Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders // Psychol. Med. 2002. V. 32. No. 1. P. 93–103.

Bethea C.L., Phu K., Reddy A.P., Cameron J.L. The effect of short-term stress on serotonin gene expression in high and low resilient macaques // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2013. V. 44. P. 143–153.

Boldrini M., Underwood M.D., Mann J.J., Arango V. More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides // Brain Res. 2005. V. 1041. No. 1. P. 19–28.

Boyarskikh U.A., Bondar N.P., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Downregulation of serotonergic gene expression in the Raphe nuclei of the midbrain under chronic social defeat stress in male mice // Mol. Neurobiol. 2013. V. 48. No. 1. P. 13–21.

Canli T., Lesch K.P. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition // Nat. Neurosci. 2007. V. 10. No. 9. P. 1103–1109.

Celada P., Bortolozzi A., Artigas F. Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research // CNS Drugs. 2013. V. 27. No. 9. P. 703–716.

Chamas F.M., Underwood M.D., Arango V., Serova L., Kassir S.A., Mann J.J., Sabban E.L. Immobilization stress elevates tryptophan hydroxylase mRNA and protein in the rat raphe nuclei // Biol. Psychiatry. 2004. V. 55. No. 3. P. 278–283.

Chen G.L., Miller G.M. Advances in tryptophan hydroxylase-2 gene expression regulation: new insights into serotonin-stress interaction and clinical implications // Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2012. V. 159B. No. 2. P. 152–171.

Chen G.L., Miller G.M. Tryptophan hydroxylase-2: an emerg-

ing therapeutic target for stress disorders // Biochem. Pharmacol. 2013. V. 85. No. 9. P. 1227–1233.

Cryan J.F., Mombereau C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice // Mol. Psychiatry. 2004. V. 9. No. 4. P. 326–357.

Drugan R.C., Hibl P.T., Kelly K.J., Dady K.F., Hale M.W., Lowry C.A. Prior cold water swim stress alters immobility in the forced swim test and associated activation of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus // Neuroscience. 2013. V. 253. P. 221–234.

Fernandez S.P., Gaspar P. Investigating anxiety and depressive-like phenotypes in genetic mouse models of serotonin depletion // Neuropharmacology. 2012. V. 62. No. 1. P. 144–154.

Gardner K.L., Hale M.W., Oldfield S., Lightman S.L., Plotsky P.M., Lowry C.A. Adverse experience during early life and adulthood interact to elevate tph2 mRNA expression in serotonergic neurons within the dorsal raphe nucleus // Neuroscience. 2009. V. 163. No. 4. P. 991–1001.

Gonzalez M.M., Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. No. 12. P. 4898-4903.

Goswami D.B., May W.L., Stockmeier C.A., Austin M.C. Transcriptional expression of serotonergic regulators in laser-captured microdissected dorsal raphe neurons of subjects with major depressive disorder: sex-specific differences // J. Neurochem. 2010. V. 112. No. 2. P. 397–409.

Hale M.W., Shekhar A., Lowry C.A. Development by environment interactions controlling tryptophan hydroxylase expression // J. Chem. Neuroanat. 2011. V. 41. No. 4. P. 219–226.

Heine V.M., Maslam S., Zareno J., Joëls M., Lucassen P.J. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible // Eur. J. Neurosci. 2004. V. 19. No. 1. P. 131–144.

Kempermann G., Kronenberg G. Depressed new neurons – adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression // Biol. Psychiatry. 2003. V. 54. No. 5. P. 499–503.

Klempin F., Beis D., Mosienko V., Kempermann G., Bader M., Alenina N. Serotonin is required for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // J. Neurosci. 2013. V. 33. No. 19. P. 8270–8275.

Kendler K.S., Karkowski L.M., Prescott C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression // Am. J. Psychiatry. 1999. V. 156. No. 6. P. 837–841.

Kessing L.V., Agerbo E., Mortensen P.B. Does the impact of major stressful life events on the risk of developing depression change throughout life? // Psychol. Med. 2003. V. 33. No. 7. P. 1177–1184.

Krishnan V., Nestler E.J. Animal models of depression: molecular perspectives // Curr. Top. Behav. Neurosci. 2011. V. 7. P. 121–147.

Mandelli L., Antypa N., Nearchou F.A., Vaiopoulos C., Stefanis C.N., Serretti A., Stefanis N.C. The role of serotonergic genes and environmental stress on the development of depressive symptoms and neuroticism // J. Affect. Disord. 2012. V. 142. No. 1–3. P. 82–89.

Mann J.J., Currier D., Murphy L., Huang Y.Y., Galfalvy H., Brent D., Greenhill L., Oquendo M. No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover // J. Affect. Disord. 2008. V. 106. No. 1/2. P. 117–121.

Matthews P.R., Harrison P.J. A morphometric, immunohistochemical, and *in situ* hybridization study of the dorsal raphe nucleus in major depression, bipolar disorder, schizophrenia, and suicide // J. Affect. Disord. 2012. V. 137. No. 1/3. P. 125–134.

Mezadri T.J., Batista G.M., Portes A.C., Marino-Neto J., Lino-de-Oliveira C. Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants // J. Neurosci. Methods. 2011. V. 195. No. 2. P. 200–205.

Owens M.J., Nemeroff C.B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter // Clin. Chem. 1994. V. 40. No. 2. P. 288–295.

Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments // Eur. J. Pharmacol. 1978. V. 47. No. 4. P. 379–391.

Ripke S., Wray N.R., Lewis C.M. *et al*. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. No. 4. P. 497–511.

Shishkina G.T., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Behavioral effects of glucocorticoids during the first exposures to the forced swim stress // Psychopharmacology (Berl). 2014. [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s00213-014-3718-8

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression // Behav. Brain Res. 2010. V. 213. No. 2. P. 218–224.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior // Neuropharmacology. 2012. V. 62. No. 1. P. 177–183.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect // Neuroscience. 2007. V. 150. No. 2. P. 404–412.

Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G., Shishkina G.T., Gulyaeva N. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers // Biomed. Res. Int. 2014. 2014:932757.

Tsai S.J., Hong C.J., Liou Y.J., Yu Y.W., Chen T.J., Hou S.J., Yen F.C. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depression and antidepressant treatment response // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2009. V. 33. No. 4. P. 637–641.

Walther D.J., Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform // Biochem. Pharmacol. 2003. V. 66. No. 9. P. 1673–1680.

Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform // Science. 2003.

V. 299. No. 5603. P. 76.
Zheng L., Zheng X. Integration of animal behaviors under stresses with different time courses // Neural Regen Res. 2014. V. 9. No. 15. P. 1464–1473.
Zill P., Baghai T.C., Zwanzger P., Schüle C., Eser D., Rupprecht R., Möller H.J., Bondy B., Ackenheil M. SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression // Mol. Psychiatry. 2004. V. 9. No. 11. P. 1030–1036.

TRYPTOPHAN HYDROXYLASE 2 AND BCL-XL IN THE RAT RAPHE NUCLEUS AFTER ACUTE AND CHRONIC FORCED SWIM STRESS

G.T. Shishkina[1], T.S. Kalinina[1, 2], V.V. Bulygina[1], E.V. Babljuk[1], N.N. Dygalo[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Stressful events induce changes in the expression of numerous genes and their protein products in the brain. However, the mechanisms mediating these changes, as well as their significance for the development of stress-induced depression or for coping with stress, remain obscure. Evidence for the sensitivity of tryptophan hydroxylase-2 (TPH2), the rate-limiting enzyme of the serotonin (5-HT) pathway, to stress is concisely reviewed, as well as the neuroprotective function of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain. The aim of our experiments was to investigate the gene and protein expression of TPH2 and Bcl-xL in the dorsal (DRN) and median (MRN) raphe nuclei during repeated stress events. Gene (RT PCR) and protein (immunohistochemistry) expression was assessed 24 hours after the second and fourteenth forced swim sessions. The increase in TPH2 protein expression observed after the second swim stress exposure might reflect the protective action of Bcl-xL. During the subsequent stressful events, the stress-induced increase in Bcl-xL expression decreased. This effect was associated with the weakening of serotonergic neuron function evidenced by the compensatory activation of the TPH2 gene expression without TPH2 protein increase. Thus, short- and long-term forced swimming resulted in qualitatively different alterations in brain expression of TPH and Bcl-xL, suggesting their specific roles during acute and chronic stages in the development of stress-induced psychopathology. These changes may constitute a component of the mechanisms underlying elevated *tph2* gene expression in depressed patients.

Key words: forced swim stress, tryptophan hydroxylase-2, Bcl-xL, depression.

УДК 575.117.2:577.175:612.017

ЭКСПРЕССИЯ В МОЗГЕ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОЯВЛЕНИЯМИ ДЕПРЕССИИ

© 2014 г. **Н.Н. Дыгало[1, 2], М.Ю. Степаничев[3], Н.В. Гуляева[3], Г.Т. Шишкина[1]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;
[3] Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия

Поступила в редакцию 29 сентября 2014 г. Принята к публикации 7 ноября 2014 г.

Мета-анализ результатов полногеномных исследований на выборках, насчитывающих тысячи пациентов и здоровых людей, не обнаружил существенных генетических ассоциаций для большой депрессии (Ripke *et al*., 2013), что может быть связано с неоднородностью этой патологии. Для выявления наследственной основы депрессии, очевидно, необходима оценка вклада аллелей не только отдельных генов, но и комплекса генов, вовлеченных в формирование патологии через совместное изменение активности важных для ее проявления молекулярных путей. Круг генов, изменчивость которых вносит вклад в наследственную предрасположенность к проявлению депрессии, включает гены, обеспечивающие активность систем нейротрансмиссии, стрессорного, а также иммунного ответа, нейротрофических и апоптотических процессов. Способствуют патологии нарушения в мозге функции глутамата, норадреналина, ГАМК, серотонина (5-НТ) и других нейротрансмиттеров. Хотя вклад аллелей отдельных генов нейротрансмиттерных систем в формирование депрессивного состояния оказался невелик, суммирование эффектов аллелей нескольких генов, увеличивающих риск патологии, а также неблагоприятных жизненных обстоятельств, могут предрасполагать к развитию депрессии. Стресс переводит наследственную предрасположенность в психопатологию, осуществляя эпигенетическую регуляцию активности генов. Существенным для психопатологии оказывается вклад нейропластических и воспалительных процессов в мозге, зависящих от функции нейротрофинов и интерлейкинов. Важным компонентом чувствительности или невосприимчивости индивида к формированию депрессивного состояния является устойчивость структуры мозга и его клеток к повреждающим генетическим и/или средовым факторам. Патогенному нарушению структуры мозга противодействуют эффекты нейротрофинов, активирующие экспрессию белков, защищающих клетки от гибели, таких как антиапоптозные белки Bcl-2 и Bcl-xL. Очевидно, взаимодействие разнообразных наборов аллелей, предрасполагающих или противодействующих формированию патологии со средовыми факторами, такими как стресс, обусловливает индивидуальные различия по устойчивости к проявлению депрессии.

Ключевые слова: депрессия, экспрессия генов, серотонинергическая система, система стресса, нейротрофины, факторы иммунной системы, белки жизнеспособности клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Начиная со второй половины XX в. депрессию (Major Depressive Disorder) признали быстро распространяющимся заболеванием, создающим значительные медицинские и социально-экономические проблемы. Процент особей, склонных к депрессии, различается в разных странах: от 3 % в Японии до 16,9 % – в США, типичным считается 8–12 % (Kessler, 2012; Flint, Kendler, 2014). Около 20 % подростков испытывают хотя бы один эпизод депрессии,

и существует большая вероятность повторного эпизода в течение последующих 5 лет (Curry *et al*., 2011). Помимо сопутствующих патологий и повышенной смертности, депрессия сопряжена со значительными расходами как для отдельного индивида, так и для всего общества. Например, применение только антидепрессантов в США возросло в 5 раз за период с 1988 г. по 2008 г. (Fitzgerald, Bronstein, 2013). В Европе депрессия занимает в настоящее время третье место среди причин нетрудоспособности, а к 2020 г. прогнозируется ее выход на второе место (Flint, Kendler, 2014).

Семейный, близнецовый и эпидемиологический анализы указывают на существенный генетический вклад в риск развития заболевания. Вместе с тем генетическая составляющая депрессии может зависеть от ее тяжести. Если в целом наследуемость этого психоэмоционального расстройства относительно низка, на уровне 38 %, то для клинически серьезного заболевания – уже 48–75 % (Uher, 2014). На основании имеющейся информации о потенциальных нейробиологических механизмах депрессии были предложены гены-кандидаты и проведен поиск возможных ассоциаций их аллелей с симптомами болезни, давший, однако, весьма противоречивые сведения (Flint, Kendler, 2014). Прогресс в этой области далее связывали со ставшим доступным выявлением факторов риска заболеваний во всем геноме (Genome-Wide Association Study – GWAS). Были созданы крупные международные консорциумы, анализирующие ассоциации на выборках, включающих тысячи пациентов и здоровых людей, но мета-анализ результатов этих GWAS не обнаружил каких-либо существенных генетических ассоциаций для большой депрессии (Ripke *et al.*, 2013), что, возможно, связано с разнородностью этой патологии. Для выявления наследственной основы депрессии, следовательно, необходима разработка новых методов, которые могут быть основаны на оценке вклада аллелей не только отдельных генов, но и комплекса генов, вовлеченных в формирование патологии через совместное изменение активности важных для ее проявления молекулярных путей. Круг наследственных факторов, изменчивость которых способна вносить вклад в наследственную предрасположенность к проявлению депрессии, включает гены, обеспечивающие активность систем нейротрансмиссии, стрессорного и иммунного ответов, нейротрофических и апоптотических процессов.

ГЕНЫ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРНЫХ СИСТЕМ

Основной причиной депрессивных расстройств долгое время считался дефицит серотонинергической (5-НТ) нейротрансмиссии, поэтому наиболее используемые в настоящее время антидепрессанты нацелены на ее коррекцию (Krishnan, Nestler, 2008; Sharp, Cowen, 2011). Наибольшее внимание в качестве потенциального модулятора 5-НТ нейротрансмиссии получил ген серотонинового транспортера *slc6a4*. Было обнаружено, что этот ген содержит функциональный полиморфизм (*5-httlpr*) в промоторной области. Носители длинного аллеля гена характеризовались значительно более высоким уровнем его транскрипции по сравнению с носителями короткого аллеля. Путем использования этого полиморфизма в ряде работ, хотя и не во всех, были выявлены достоверные ассоциации между аллельными вариантами гена транспортера и симптомами депрессии (Fabbri *et al*., 2014; Flint, Kendler, 2014). Серотонинергические препараты, внедренные в клинику и получившие там наибольшее применение, специфически блокируют работу транспортера, препятствуя обратному переносу медиатора в клетку и тем самым увеличивая его сигнальную трансдукцию. Вместе с тем исследование больных депрессией не выявило в мозге отличий в мРНК транспортера от уровня у здоровых людей (Anisman *et al*., 2008; Goswami *et al*., 2010), хотя в более ранней работе обнаружено увеличение уровня транскрипта при пересчете на отдельный нейрон (Arango *et al*., 2001). В настоящее время в некоторых работах значение полиморфизма гена серотонинового транспортера в провоцировании симптомов депрессии рассматривается во взаимодействии со стрессорными событиями (Karg *et al*., 2011).

Серотонин осуществляет свое действие через 15 идентифицированных типов 5-НТ рецепторов. Среди этих рецепторов 5-НТ1А тип активно участвует в контроле активности 5-НТ системы, однако поиски ассоциаций аллельных вариантов гена этих рецепторов с симптомами

депрессии не увенчались успехом (Mandelli *et al*., 2012). Вместе с тем в ряде работ обнаружены ассоциации между C(-1019)G полиморфизмом в промотерной области *htr1a* гена, приводящим к увеличению числа ауторецепторов и, соответственно, к ослаблению 5-НТ сигнала, и ответом на антидепрессанты (Samuels *et al*., 2011). Связь этих событий подтверждается результатами на трансгенных мышах: животные со сниженным количеством 5-НТ1А рецепторов (важно, что это снижение было всего 30 %-м, соответствующим естественным вариациям у человека) были более устойчивыми к развитию индуцируемого стрессом депрессивно-подобного состояния (Richardson-Jones *et al*., 2010). На участие гена *htr1a* рецепторов в антидепрессантных эффектах препаратов указывает и изменение уровня мРНК гена после введения этих препаратов (Shishkina *et al*., 2008; 2012a).

Из других генов 5-НТ системы в качестве потенциальных генов-кандидатов депрессии и, следовательно, мишеней терапевтических воздействий исследуется ген 5-НТ2А рецепторов (*htr2a*)-типа и в последнее время – гены ферментов синтеза серотонина триптофангидроксилазы, *tph1* и *tph2*, особенно вариант *tph2*, специфический для центральной нервной системы. Аллельные варианты этих генов показали в отдельных работах достоверные ассоциации с симптомами депрессии и ответами на антидепрессантную терапию (Kishi *et al*., 2013; Fabbri *et al*., 2014). Исследования же мРНК *tph2* в головном мозге депрессивных больных дали неоднозначные результаты, свидетельствующие в одних работах о повышении экспрессии гена фермента (например, Bach-Mizrachi e*t al*., 2008), в других – об отсутствии каких-либо изменений (например, Goswami *et al*., 2010). В опытах на животных было показано, что формирование депрессивно-подобного состояния, а также ослабление симптомов этого состояния введением антидепрессантных препаратов могут сопровождаться изменениями уровня мРНК генов 5-НТ системы, включая и *tph2* (Dygalo *et al*., 2006; Shishkina *et al*., 2007, 2008, 2012b). Выявляемые изменения зависели от отдела мозга, условий раннего онтогенеза, продолжительности действия стресса или антидепрессантов и, как правило, существенно отставали по времени от данных воздействий (Bethea *et al*., 2013).

В целом известные факты свидетельствуют о лишь небольшом вкладе аллелей каждого из отдельных генов 5-НТ системы в формирование депрессивного состояния. Вместе с тем суммирование эффектов аллелей нескольких генов, способствующих патологии, а также неблагоприятных жизненных обстоятельств может предрасполагать к развитию депрессии. В недавнем исследовании на выборке в 4 498 человек обнаружен достоверный эффект тройного взаимодействия патогенных аллелей *tph2*, *5-htt* и стресса в раннем онтогенезе на предрасположенность жителей Померании к депрессии (Van der Auwera *et al*., 2014). Было показано, что полиморфные варианты генов *tph2* (G-703T) и серотонинового транспортера (*5-httlpr*) могут также взаимодействовать, модулируя клинический ответ к блокатору обратного захвата медиатора циталопраму у детей и подростков (Rotberg *et al*., 2013).

Из других нейротрансмиттерных систем, хотя в гораздо меньшей степени, чем 5-НТ системы, исследуются гены норадренергической, дофаминергической и глутаматергической систем. Причем следует отметить, что гены, чаще рассматриваемые в связи с функционированием норадренергической системы, такие как гены моноаминооксидазы А (*maoa*) или катехоламинотрансферазы (*comt*), участвуют в обеспечении активности и других систем, прежде всего дофаминергической, но также и 5-НТ (*maoa*) системы.

Относительно недавно с патофизиологией депрессии была связана и дисфункция глутаматергической системы (Sanacora *et al*., 2012). В астроцитах префронтальной коры депрессивных больных обнаружено снижение экспрессии генов транспортера глутамата и фермента глутаматсинтетазы (Choudary *et al*., 2005). В астроцитах префронтальной коры (Choudary *et al*., 2005) и в норадренергических нейронах синего пятна (Chandley *et al*., 2014) при депрессии изменялась и экспрессия генов рецепторов глутамата. Однако в некоторых работах изменений в экспрессии генов глутаматных рецепторов в префронтальной коре обнаружено не было (Chandley *et al*., 2014; Muguruza *et al*., 2014). Кроме того, выявлена ассоциация полиморфных аллелей генов, участвующих в глутаматергической нейротрансмиссии с про-

явлениями биполярной депрессии (Nurnberger *et al*., 2014).

ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНОКОРТИКАЛЬНАЯ СИСТЕМА (ГГАС)

Стресс является одним из наиболее изученных факторов, переводящих наследственную предрасположенность в психопатологию. Мета-анализ на выборке из 14 250 участников четко продемонстрировал значительную ассоциацию стрессорных событий с риском развития депрессии (Risch *et al*., 2009). Одной из наиболее устойчивых характеристик депрессивных расстройств является гиперактивность ГГАС (Holsboer, 2000). Центральным регулятором системы является кортиколиберин, повышенная экспрессия его гена (*crh*) отмечается у депрессивных больных в голубом пятне продолговатого мозга, дорсолатеральной и вентромедиальной областях префронтальной коры, а также в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Raadsheer *et al*., 1995; Merali *et al*., 2006). Высокому уровню мРНК *crh* сопутствует повышенная экспрессия генов, участвующих в эффектах нейрогормона, таких как, например, рецепторы кортиколиберина (Wang *et al*., 2008). Изменения могут коснуться и рецепторов кортикостероидов – последнего продукта активации ГГАС. Так, у больных депрессией обнаружен сниженный уровень мРНК высокоаффинных (минералокортикоидных) рецепторов в префронтальной коре и паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Qi *et al*., 2013).

Важным механизмом, посредством которого система стресса влияет на психопатологию и осложняет выявления ее наследственной основы, является эпигенетическая регуляция активности генов. Так, например, у больных депрессией обнаружено снижение чувствительности глюкокортикоидных рецепторов, что полагают причиной ослабления механизма обратной регуляции в ГГАС, сопровождающегося характерным для этого заболевания повышением ее активности. Снижение чувствительности рецепторов связывают с деметилированным аллелем гена белка шаперона FKBP5 (Menke *et al*., 2013). Например, вызванное травмой в детском возрасте деметилирование глюкокортикоид-чувствительного сайта гена этого белка повышает риск возникновения индуцируемых стрессом психопатологий во взрослом возрасте (Klengel *et al*., 2013). В экспериментах на мышах было также обнаружено, что увеличивающаяся с возрастом эпигенетическая активация экспрессии FKBP5 может избирательно ослабить психологическую устойчивость к стрессу без изменения других глюкокортикоид-зависимых физиологических процессов (Sabbagh *et al*., 2014). Некоторые полиморфные варианты гена *fkbp5* были ассоциированы с симптомами депрессии и ответом на антидепрессантную терапию (Lekman *et al*., 2008).

Нейробиологические исследования депрессии свидетельствуют о сложном характере изменений, которые наблюдаются на всех уровнях нейропластичности во многих структурах мозга, включая гиппокамп, фронтальную и префронтальную кору, миндалевидный комплекс, переднюю поясную извилину, области локализации клеточных тел моноаминергических нейронов (Krishnan, Nestler, 2008; Шишкина, Дыгало, 2010). Анализ аутопсийных образцов ткани мозга больных депрессией позволил выделить, наряду с генами ГГАС и нейротрансмиттерных систем, еще целый ряд групп генов, изменение экспрессии которых может иметь патогенетическое значение.

НЕЙРОТРОФИНЫ

У пациентов с клинически диагностированной депрессией обнаружены сниженный объем гиппокампа (Frodl *et al*., 2010) и структурные изменения в некоторых других отделах мозга. Эти данные привлекли внимание к нейротрофинам и особенно к мозговому нейротрофическому фактору (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), необходимым для дифференцировки и выживания нейронов и играющим ключевую роль в синаптической пластичности. Помимо клеточной атрофии, в гиппокампе депрессивных особей обнаружена сниженная экспрессия гена *bdnf* и других нейротрофинов, такой же эффект обнаружен в ряде модельных экспериментов на животных (Stein *et al*., 2008). Сниженная экспрессия генов *bdnf* и его высокоаффинного рецептора *trkb* была также обнаружена в некоторых работах в префронтальной коре депрес-

сивных особей (Dwivedi *et al*., 2003). Результаты этих исследований, однако, противоречивы, что свидетельствует о более сложной роли BDNF в психопатологии (Stein *et al*., 2008).

Наиболее исследованный генетический полиморфизм гена *bdnf* – rs6265. Показана ассоциация этого полиморфизма с ответом на антидепрессанты (Fabbri *et al*., 2014), однако исследование его связи с симптомами депрессии и объемами отделов переднего мозга, включая и гиппокамп, убедительных результатов пока не показало (Frazier *et al*., 2014). Носители аллельного варианта гена *val66met* характеризовались меньшими объемами гиппокампа и некоторых других отделов. В некоторых работах обнаружена также ассоциация этого аллеля с предрасположенностью к депрессии, но в целом результаты этих работ также не однородны (Stein *et al*., 2008).

ИНТЕРЛЕЙКИНЫ

Провоспалительные цитокины, такие как интерферон-альфа, используются в клинике для лечения некоторых заболеваний. Многие из больных демонстрировали в качестве побочного эффекта такого лечения клиническую депрессию, что указывает на связь между отклонениями в функционировании иммунной системы и патогенезом этой психопатологии (Loftis, Hauser, 2004). И действительно, многочисленные публикации демонстрируют увеличение уровней воспалительных цитокинов и их растворимых рецепторов в периферической циркуляции и цереброспинальной жидкости больных депрессией. У них также отмечается изменение экспрессии генов цитокинов в мозге, например в префронтальной коре было обнаружено увеличение экспрессии генов различных про- и антивоспалительных цитокинов, включающих *il-1α*, *il-2*, *il-3*, *il-5*, *il-8*, *il-9*, *il-10*, *il-12a*, *il-13*, *il-15*, *il-18*, интерферон-гамма (*ifnγ*) и лимфотоксин-гамма (Shelton *et al*., 2011). Сходные изменения обнаружены в некоторых (например, You *et al*., 2011; Diz-Chaves *et al*., 2012), но не во всех исследованиях на моделях депрессии у животных. Расхождение результатов может быть обусловлено спецификой провоцирующих симптомы депрессии воздействий, сроками исследования, региональными различиями вовлеченности структур мозга в патогенез депрессии и даже видом грызунов, использованных для моделирования патологии (Stepanichev *et al*., 2014).

Аллельные варианты генов интерлейкина 1-бета (*il-1β*) и фактора некроза опухоли (*tnf-α*) могут увеличивать риск депрессии, а однонуклеотидные полиморфизмы в генах *il-1β*, *il-6* и *il-11* могут ассоциироваться со снижением ответа к антидепрессантной терапии (Bufalino *et al*., 2013). Однако эти данные нуждаются в дальнейшей проверке.

ГЕНЫ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

В последнее время становится ясно, что важным компонентом предрасположенности или невосприимчивости индивида к формированию депрессивного состояния является устойчивость структуры мозга и его клеток к повреждающим генетическим и/или средовым факторам. Ярким недавним результатом явилось выявление ассоциации полиморфного варианта связывающего кальций белка с объемом гиппокампа (Enhancing Neuro Imaging …, 2012), уменьшение которого является биомаркером депрессии. Патогенному нарушению структуры мозга противодействуют эффекты нейротрофинов, активирующие экспрессию белков, защищающих клетки от гибели, таких как Bcl-2 и Bcl-xL. Вынужденное плавание, провоцирующее депрессивно-подобное состояние у крыс, увеличивало уровень мРНК и белка Bcl-xL в гиппокампе животных через 2 ч после этой стрессорной процедуры. Преобладание экспрессии Bcl-xL над проапоптозным белком Bax характерно для устойчивых к стрессу животных (Shishkina *et al*., 2010; Dygalo *et al*., 2012). Значительная отрицательная корреляция была обнаружена между отношением другого антиапоптозного члена Bcl-2 семейства, Bcl-2, к Bax в префронтальной коре и поведенческими маркерами депрессивно-подобного поведения на модели депрессии, индуцированной инфарктом миокарда (Wann *et al*., 2009). Естественный полиморфизм гена *bcl-2* вовлечен в формирование предрасположенности к психоэмоциональным расстройствам и у людей (Uemura *et al*., 2011). Частота полиморфного варианта гена *bcl-2*,

Рис. Основные группы генов и процессов, вносящих существенный вклад в формирование предрасположенности/устойчивости к проявлению депрессии.

Fig. The main groups of genes and processes that contribute to susceptibility/ resilience to depression.

детерминирующего сниженный уровень его экспрессии, достоверно выше у мужчин, страдающих депрессией, по сравнению с выборкой здоровых индивидов (Zhang *et al*., 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В развитие большинства психиатрических расстройств, включая и депрессию, вовлекается множество генов, как правило, с небольшим вкладом каждого из них, что делает задачу выявления роли конкретного гена чрезвычайно сложной. Различные генетические подходы к решению этой проблемы на животных моделях, например, с использованием трансгенных мышей, так же, как и исследования на людях, пока не позволили выявить специфические гены, обусловливающие множественные вариации депрессивно-подобного фенотипа. Однако эти работы проложили путь для идентификации многих новых потенциальных мишеней воздействия для препаратов, включающих рецепторы нейротрансмиттеров, внутриклеточные сигнальные системы и белки нейротрофических каскадов.

Определенный успех возможен, по-видимому, при учете совместного вклада в патологию сразу нескольких генов, а также и средовых – стрессорных факторов (рис.). Судя по последним сведениям, именно взаимодействие набора аллелей, предрасполагающих к патологии, например, генов нейроспецифической триптофангидроксилазы и транспортера серотонина со средовым фактором, таким как стресс в раннем онтогенезе, обусловливает проявление депрессии и обнаруживает достоверную ассоциацию с нею (Van der Auwera *et al*., 2014). При разнообразии психоэмоциональных расстройств и их патогенетических механизмов (Шишкина, Дыгало, 2010; Stepanichev *et al*., 2014) очевидно, что взаимодействие не только названных аллелей генов серотониновой системы и стресса в раннем онтогенезе, но и иных комбинаций обозначенных на рисунке генов и процессов способно оказаться причиной клинической депрессии. Для выявления этих комбинаций, однако, необходимы дальнейшие экспериментальные и медико-генетические популяционные исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-40014-Н\13 и средств бюджетного проекта VI.53.2.2.

ЛИТЕРАТУРА

Шишкина Г.Т., Дыгало Н.Н. Нейробиологические основы депрессивных расстройств и действия антидепрессантов // Журн. высш. нервн. деят-сти. 2010. Т. 60. № 2. С. 138–152.
Shishkina G.T., Dygalo N.N. Neurobiological mechanisms of depression and antidepressant therapy // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. 2010. V. 60. P. 138–152. (In Russian).

Anisman H., Du L., Palkovits M., Faludi G. *et al*. Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects // J. Psychiatry Neurosci. 2008. V. 33. P. 131–141.

Arango V., Underwood M.D., Boldrini M. *et al*. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims // Neuropsychopharmacol. 2001. V. 25. P. 892–903.

Bach-Mizrachi H., Underwood M.D., Tin A. *et al*. Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides // Mol. Psychiatry. 2008. V. 13. No. 5. P. 507–513.

Bethea C.L., Phu K., Reddy A.P., Cameron J.L. The effect of short-term stress on serotonin gene expression in high and low resilient macaques // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2013. V. 44. P. 143–153.

Bufalino C., Hepgul N., Aguglia E., Pariante C.M. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies // Brain Behav. Immun. 2013. V. 31. P. 31–47.

Chandley M.J., Szebeni A., Szebeni K. *et al*. Elevated gene expression of glutamate receptors in noradrenergic neurons from the locus coeruleus in major depression // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2014. V. 17. No. 10. P. 1569–1578.

Choudary P.V., Molnar M., Evans S.J. *et al*. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. No. 43. P. 15653–15658.

Curry J., Silva S., Rohde P., Ginsburg G., Kratochvil C., Simons A., Kirchner J., May D., Kennard B., Mayes T., Feeny N., Albano A.M., Lavanier S., Reinecke M., Jacobs R., Becker-Weidman E., Weller E., Emslie G., Walkup J., Kastelic E., Burns B., Wells K., March J. Recovery and recurrence following treatment for adolescent major depression // Arch. Gen. Psychiatry. 2011. V. 68. No. 3. P. 263–269.

Diz-Chaves Y., Pernía O., Carrero P., Garcia-Segura L.M. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice // J. Neuroinflammation. 2012. V. 9. article 71.

Dwivedi Y., Rizavi H.S., Conley R.R. *et al*. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects // Arch. Gen. Psychiatry. 2003. V. 60. P. 804–815.

Dygalo N.N., Kalinina T.S., Bulygina V.V., Shishkina G.T. Increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain is associated with resilience to stress-induced depression-like behavior // Cell. Mol. Neurobiol. 2012. V. 32. No. 5. P. 767–776.

Dygalo N.N., Shishkina G.T., Kalinina T.S. *et al*. Effect of repeated treatment with fluoxetine on tryptophan hydroxylase-2 gene expression in the rat brainstem // Pharmacol. Biochem. Behav. 2006. V. 85. No. 1. P. 220–227.

Enhancing Neuro Imaging Genetics through Meta-Analysis Consortium. Identification of common variants associated with human hippocampal and intracranial volumes // Nat. Genet. 2012. V. 44. No. 5. P. 552–561.

Fabbri C., Porcelli S., Serretti A. From pharmacogenetics to pharmacogenomics: the way toward the personalization of antidepressant treatmen // Can. J. Psychiatry. 2014. V. 59. No. 2. P. 62–75.

Fitzgerald K.T., Bronstein A.C. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure // Top Companion Anim. Med. 2013. V. 28. No. 1. P. 13–17.

Flint J., Kendler K.S. The genetics of major depression // Neuron. 2014. V. 81. No. 3. P. 484–503.

Frazier T.W., Youngstrom E.A., Frankel B.A. *et al*. Candidate gene associations with mood disorder, cognitive vulnerability, and fronto-limbic volumes // Brain Behav. 2014. V. 4. No. 3. P. 418–430.

Frodl T., Reinhold E., Koutsouleris N. *et al*. Interaction of childhood stress with hippocampus and prefrontal cortex volume reduction in major depression // J. Psychiatr. Res. 2010. V. 44. No. 13. P. 799–807.

Goswami D.B., May W.L., Stockmeier C.A., Austin M.C. Transcriptional expression of serotonergic regulators in laser-captured microdissected dorsal raphe neurons of subjects with major depressive disorder: sex-specific differences // J. Neurochem. 2010. V. 112. No. 2. P. 397–409.

Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression // Neuropsychopharmacology. 2000. V. 23. No. 5. P. 477–501.

Karg K., Burmeister M., Shedden K., Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation // Arch. Gen. Psychiatry. 2011. V. 68. No. 5. P. 444–454.

Kessler R.C. The costs of depression // Psychiatr. Clin. North. Am. 2012. V. 35. No. 1. P. 1–14.

Klengel T., Mehta D., Anacker C. *et al*. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions // Nat. Neurosci. 2013. V. 16. No. 1. P. 33–41.

Kishi T., Yoshimura R., Fukuo Y. *et al.* The serotonin 1A receptor gene confer susceptibility to mood disorders: results from an extended meta-analysis of patients with major depression and bipolar disorder // Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci. 2013. V. 263. No. 2. P. 105–118.

Krishnan V., Nestler E.J. The molecular neurobiology of depression // Nature. 2008. V. 455. No. 7215. P. 894–902.

Lekman M., Laje G., Charney D. *et al*. The FKBP5-gene in depression and treatment response – an association study in the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D) Cohort // Biol. Psychiatry. 2008. V. 63. No. 12. P. 1103–1110.

Mandelli L., Antypa N., Nearchou F.A. *et al*. The role of serotonergic genes and environmental stress on the development of depressive symptoms and neuroticism // J. Affect. Disord. 2012. V. 142. No. 1/3. P. 82–89.

Menke A., Klengel T., Rubel J. *et al*. Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression // Genes Brain Behav. 2013. V. 12. No. 3. P. 289–296.

Merali Z., Kent P., Du L. *et al*. Corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin B alterations in stress-relevant brain regions of suicides and control subjects // Biol. Psychiatry. 2006. V. 59. No. 7. P. 594–602.

Muguruza C., Miranda-Azpiazu P., Díez-Alarcia R. *et al.* Evaluation of 5-HT2A and mGlu2/3 receptors in postmortem prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder: Effect of antidepressant treatment // Neuropharmacology. 2014. V. 86. P. 311–318.

Nurnberger J.I. Jr., Koller D.L., Jung J. et Psychiatric Genomics Consortium Bipolar Group. Identification of pathways for bipolar disorder: a meta-analysis // JAMA Psychiatry. 2014. V. 71. No. 6. P. 657–664.

Qi X.R., Kamphuis W., Wang S. *et al*. Aberrant stress hormone receptor balance in the human prefrontal cortex and hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients // Psychoneuroendocrinology. 2013. V. 38. No. 6. P. 863–870.

Raadsheer F.C., van Heerikhuize J.J., Lucassen P.J. *et al*. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression // Am. J. Psychiatry. 1995. V. 152. P. 1372–1376.

Richardson-Jones J.W., Craige C.P., Guiard B.P. *et al*. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants // Neuron. 2010. V. 65. No. 1. P. 40–52.

Ripke S., Wray N.R., Lewis C.M. *et al*. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium // Mol. Psychiatry. 2013. V. 18. No. 4. P. 497–511.

Risch N., Herrell R., Lehner T. *et al*. Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis // JAMA. 2009. V. 301. No. 23. P. 2462–2471.

Rotberg B., Kronenberg S., Carmel M. *et al*. Additive effects of 5-HTTLPR (serotonin transporter) and tryptophan hydroxylase 2 G-703T gene polymorphisms on the clinical response to citalopram among children and adolescents with depression and anxiety disorders // J. Child. Adolesc. Psychopharmacol. 2013. V. 23. No. 2. P. 117–122.

Samuels B.A., Leonardo E.D., Gadient R. *et al.* Modeling treatment-resistant depression // Neuropharmacology. 2011. V. 61. V. 3. P. 408–413.

Sanacora G., Treccani G., Popoli M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders // Neuropharmacology. 2012. V. 62. No. 1. P. 63–77.

Sharp T., Cowen P.J. 5-HT and depression: is the glass half-full? // Curr. Opin. Pharmacol. 2011. V. 11. No. 1. P. 45–51.

Shelton R.C., Claiborne J., Sidoryk-Wegrzynowicz M. *et al*. Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression // Mol. Psychiatry. 2011. V. 16. No. 7. P. 751–762.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Dygalo N.N. Stress-induced activation of the brainstem Bcl-xL gene expression in rats treated with fluoxetine: correlations with serotonin metabolism and depressive-like behavior // Neuropharmacology. 2012b. V. 62. No. 1. P. 177–183.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V. *et al*. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression // Behav. Brain Res. 2010. V. 213. No. 2. P. 218–224.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Serotonergic changes produced by repeated exposure to forced swimming: correlation with behavior // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008. V. 1148. P. 148–153.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Effects of swim stress and fluoxetine on 5-HT1A receptor gene expression and monoamine metabolism in the rat brain regions // Cell Mol. Neurobiol. 2012a. V. 32. No. 5. P. 787–794.

Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect // Neuroscience. 2007. V. 150. No. 2. P. 404–412.

Stein D.J., Daniels W.M., Savitz J., Harvey B.H. Brain-derived neurotrophic factor: the neurotrophin hypothesis of psychopathology // CNS Spectr. 2008. V. 13. No. 11. P. 945–949.

Stepanichev M., Dygalo N.N., Grigoryan G. *et al.* Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers // Biomed. Res. Int. 2014; 2014: 932757.

Uemura T., Green M., Corson T.W. *et al*. Bcl-2 SNP rs956572 associates with disrupted intracellular calcium homeostasis in bipolar I disorder // Bipolar. Disord. 2011. V. 13. P. 41–51.

Uher R. Gene-environment interactions in severe mental illness // Front. Psychiatry. 2014. V. 5. Article 48.

Van der Auwera S., Janowitz D., Schulz A. *et al*. Interaction among childhood trauma and functional polymorphisms in the serotonin pathway moderate the risk of depressive disorders // Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci. 2014. Suppl. 1. S. 45–54.

Wang S.S., Kamphuis W., Huitinga I. *et al*. Gene expression analysis in the human hypothalamus in depression by laser microdissection and real-time PCR: the presence of multiple receptor imbalances // Mol. Psychiatry. 2008. V. 13. No. 8. P. 786–799.

Wann B.P., Bah T.M., Kaloustian S. *et al*. Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline // J. Psychopharmacol. 2009. V. 23. No. 4. P. 451–459.

You Z., Luo C., Zhang W. *et al*. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression // Behavioural Brain Res. 2011. V. 225. No. 1. P. 135–141.

Zhang C., Wu Z., Hong W. *et al*. Influence of BCL2 gene in major depression susceptibility and antidepressant treatment outcome // J. Affect. Disord. 2014. V. 155. P. 288–294.

DEPRESSION-RELATED GENE EXPRESSION IN THE BRAIN

N.N. Dygalo[1, 2], M.Yu. Stepanichev[3], N.V. Gulyaeva[3], G.T. Shishkina[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: dygalo@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
[3] Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS,
Moscow, Russia

Summary

Meta-analysis of genome-wide studies involving thousands of patients and healthy subjects did not reveal significant genetic associations with the major depressive disorder (Ripke *et al*., 2013), which may be due to the heterogeneity of this disease. Obviously, to identify the genetic bases of depression, it is necessary to assess the contributions of not only alleles of individual genes, but also the set of genes that alter the activity of molecular pathways important for the manifestation of the disease. Impairments of the functions of glutamate, norepinephrine, GABA, serotonin (5-HT), and other neurotransmitters in the brain contribute to the pathology. While the impact of an individual gene of a neurotransmitter system on the pathology can be small, summation of the effects of alleles of several genes that contribute to the disease and adverse life circumstances may predispose to depression. Stress converts the genetic predisposition into psychopathology involving epigenetic regulation of gene activity. Neuroplasticity and inflammatory processes in the brain that depend on the functions of neurotrophins and interleukins contribute significantly to psychopathology. The structural integrity of the brain and viability of its cells under damaging genetic and/or environmental influences are important for predisposition of an individual to depression. Neurotrophins activate the expression of proteins, such as anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, which protect cells from death and counteract the effects of pathogenic processes damaging brain structure. Obviously, the interaction of different sets of alleles that predispose or counteract the development of pathology with environmental factors, such as stress, is responsible for individual differences in resistance to the manifestation of depression.

Key words: major depression, gene expression, brain serotonergic system, stress system, neurotrophins, interleukins, proteins of cell viability.

УДК 57.026:575.83:57.084.1

АГРЕССИВНОЕ ПОВЕДЕНИЕ: ГЕНЕТИКО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

© 2014 г. **Н.Н. Кудрявцева[1], А.Л. Маркель[1, 2], Ю.Л. Орлов[1, 2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия,
e-mail: orlov@bionet.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 14 октября 2014 г. Принята к публикации 6 ноября 2014 г.

В статье дается обзор современной литературы, посвященной анализу генетической детерминации внутривидового агрессивного поведения – одной из наиболее сложных и универсальных форм социального поведения у животных, находящихся на различных ступенях эволюционной лестницы. Рассмотрены разные подходы к его изучению и перспективы, открывающиеся с появлением новых молекулярных технологий. Описывается комплексный подход к исследованию эволюционно-генетических и биологических корней агрессивности и ее проявлений при действии различных средовых и социальных факторов и при наличии определенных генетических предрасположенностей. Подчеркивается большая социальная значимость данной проблемы, решение многих аспектов которой связано с изучением генетико-физиологических механизмов агрессивного поведения как у людей, так и в эксперименте на животных. Обсуждается феноменология агрессии, ее стимулирующие и сдерживающие механизмы. Предполагается, что основным социальным механизмом, сдерживающим проявления агрессии в популяции, являются доминантно-субординантные отношения. Проанализированы нейробиологические детерминанты агрессии; представлено исследование роли наследственных факторов в контроле агрессивного поведения у животных. На примере нейрохимической перестройки мозга в процессе формирования агрессивного типа поведения у самцов мышей под влиянием повторного опыта агрессии в ежедневных межсамцовых конфронтациях показана модель исследования «от поведения – к гену». В обсуждении данных по генетике агрессивности у человека отмечено участие тех же генов, которые были выявлены в экспериментальных исследованиях на животных разных линий, а также нокаутных и трансгенных животных: генов транспортеров обратного захвата, рецепторов, ферментов биосинтеза и катаболизма серотонина и катехоламинов. В заключение рассмотрены перспективы использования транскриптомных исследований, вопросы эпигенетической регуляции агрессивного поведения.

Ключевые слова: генетика, поведение, агрессия, модели животных, экспрессия генов.

ВВЕДЕНИЕ

Проявление агрессии и агрессивного поведения в человеческом обществе является одной из важнейших социальных проблем. Обычно в качестве причин агрессивных столкновений в человеческом обществе рассматриваются факторы социальной и общественно-политической жизни. Однако большую роль играют личностные характеристики людей, которые при определенных условиях могут приводить к сложной психологической борьбе, а иногда и к физическим столкновениям. Исследования последних десятилетий позволяют сделать заключение, что агрессивное поведение следует рассматривать как некую особенность поведения человека, в основе которой лежит генетическая и социально-биологическая история его становления как

вида и как отдельной личности, а также история становления той социальной группы и среды, к которой он принадлежит. Для исследования агрессивного поведения анализ должен распространяться не только на агрессивное поведение человека, но и на соответствующие формы поведения животных, что оправдывается взглядом на агрессию как на общебиологическое явление, имеющее глубокие эволюционные корни.

Агрессия у животных является естественной эволюционно отработанной и адаптивной формой поведения. Агрессивное поведение позволяет животным существовать в условиях ограниченных ресурсов. Оно сопутствует конкуренции за пищу, за партнера при спаривании, за место обитания. У социальных животных агрессия является инструментом формирования иерархического сообщества. В результате доминантная особь имеет приоритет в доступе к пище и к половому партнеру (Lindenfors, Tullberg, 2011). Таким образом, агрессивное поведение часто является предметом полового отбора. Формирование социальной иерархии предупреждает необходимость постоянных конкурентных агрессивных столкновений, которые чреваты физическими травмами и гибелью членов популяции. Можно полагать, что низкий уровень агрессивности может плохо отразиться на жизнеспособности и воспроизводстве популяции, в то же время высокая агрессивность также оказывает отрицательное воздействие, так как она мешает реализации других важных для выживания функций, например, таких, как добыча корма, воспитание потомства. Высокая агрессивность может быть причиной массового травматизма и гибели животных (Packer *et al*., 1995). Таким образом, можно полагать, что оптимальный уровень агрессивности у животных находится под контролем стабилизирующего отбора, что подтверждается исследованиями, проведенными на самых разных видах, например, таких, как водомерки (Eldakar, Gallup, 2011) или бабуины (Packer *et al*., 1995).

Наличие значительной генетической компоненты в детерминации агрессивного поведения, казалось бы, является многообещающим условием для успешного поиска специфических генов агрессивности. Однако такой поиск отнюдь не прост, тем более что получить ответы на главные вопросы по генетике агрессивности, раскрыть нейроэндокринные механизмы регуляции агрессивного поведения практически невозможно, если базироваться на исследованиях, проводимых только на человеке.

В настоящем обзоре рассмотрены различные подходы к экспериментальному исследованию механизмов внутривидового агрессивного поведения у лабораторных животных и человека, а также перспективы, открывающиеся с использованием новых молекулярных технологий с акцентом на изучение роли в контроле агрессивного поведения как отдельных генов, так и средовых факторов, действие которых опосредуется через нейрофизиологические механизмы.

Феноменология агрессии

Агонистическое (конкурентное) поведение включает в себя проявления агрессии или подчинения особями, вступающими в конфликтные взаимодействия, и является одной из универсальных форм внутривидового поведения, встречающегося у животных, находящихся на разных ступенях эволюционной лестницы (Scott, 1971; Лоренц, 1994; Blanchard D.C., Blanchard R.J., 2003). Оно демонстрируется самцами при формировании в популяции иерархических отношений или при защите территории, в борьбе за самку, пищу, среду обитания. Агрессия является врожденной формой поведения, развивающейся по инстинктивному типу в провоцирующих условиях среды в ответ на появление или предъявление видоспецифических сигналов. Однако и в природе, и в эксперименте внутривидовая агрессия в явном виде проявляется животными довольно редко в силу существования множества ингибирующих механизмов. Основным фактором сдерживания внутривидовой агрессии в естественных и лабораторных популяциях являются установленные доминантно-субординантные отношения. Формирование подчиненного типа поведения происходит в результате опыта внутривидовых взаимодействий. Как правило, иерархию в популяции в значительной степени поддерживают подчиненные животные, избегая столкновений с сильным и агрессивным доминантным самцом.

Средовое окружение, в котором разворачиваются события, формируя мотивацию поведения, определяет тот или иной тип агонистического

внутривидового взаимодействия самцов. Различают *территориальную агрессию*, демонстрируемую при защите территории обитания, гнезда, потомства, а также *агрессию*, *вызванную страхом*, которая демонстрируется животными в ответ на нападение другой особи, когда животное вынуждено защищаться таким образом. Выделяют также агрессию, возникающую в ответ на болевое воздействие, отсутствие чего-либо или вызванную неожиданными или неприятными условиями: это *агрессия, вызванная раздражением* или фрустрацией в конфликтной ситуации. Все эти виды агрессии в природе относят к поведению защиты. К агрессии нападения относится *конкурентная агрессия*, демонстрируемая самцами на общей территории проживания при установлении и/или перемене доминантно-субординантных отношений или при других обстоятельствах.

Для характеристики агрессии у людей предложен ряд классификаций (Baron, Richardson, 1994). Исходя из наиболее признанного определения, агрессия – это любая форма поведения, направленная на оскорбление или ограничение возможностей («ущемление»), или причинение вреда любому другому существу, не желающему подобного обращения. Это не только прямая физическая, но и вербальная агрессия, наветы, интриги и т. д. Агрессия у человека может быть спровоцирована внешними факторами и стимулами, и тогда ее называют *импульсивной агрессией*, которая рассматривается аналогом таковой у животных. Чрезмерная или патологическая агрессия является проблемой здравоохранения, поскольку повторный опыт агрессии отмечается в структуре многих психоэмоциональных и неврологических расстройств, таких как маниакально-депрессивный психоз, эпилепсия, шизофрения, токсикозы, заболевания мозга, аутизм. В феноменологии агрессивного поведения человека, его психологических и мотивационных составляющих отмечаются важные особенности, которые обусловлены сущностью природы человека и его социума. Независимо от стимула и мотивов, вызвавших проявление агрессивного поведения, механизмы его реализации в основном одинаковы.

В литературе выделяют влияние социального контекста (провокационная среда, территория, маркированная животным, противник), при котором учитываются социальные и средовые стимулы, влияющие на проявление агрессии, провоцирующие или тормозящие ее проявление.

Социальными факторами, *стимулирующими* агрессию у животных в природе, являются: перенаселенность, недостаток пищи, половой дисбаланс, нестабильность климатических условий, наличие противника и несформированность доминантно-субординантных отношений.

Основным социальным механизмом, *сдерживающим* проявления агрессии в популяции, являются доминантно-субординантные отношения, которые диктуют правила поведения животных в сообществе на основе полученного социального опыта, негативного (социальные поражения) или позитивного (достижение желаемого), а также наблюдения за поведением других сородичей.

Нейробиологические детерминанты агрессии

Этот аспект исследований направлен на изучение физиологических, нейрохимических и генетических особенностей регуляции поведения, эволюционно обусловленных характеристик, которые способствуют реагированию животного по агрессивному типу в определенных ситуациях. При этом особое внимание уделяется вопросу, почему в одном и том же средовом контексте у одной особи агрессия развивается, а у другой нет, и от чего это зависит.

Литературные сведения указывают на множество эндогенных факторов, которые могут влиять на возникновение и характер агрессивного поведения особей, различающихся генетически, а также по психоэмоциональным и физиологическим характеристикам. При исследовании нейрофизиологических систем регуляции используют, как правило, животных одного генотипа. Эксперименты показывают, что повышение активности гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и серотонергической систем различными методами может привести к снижению агрессии, в то время как активация катехоламинергических систем, наоборот, ее стимулирует (Miczek *et al*., 2007). Изменение гормонального фона также может как усилить демонстрацию агрессии, так и снизить ее проявление (Archer *et al.*, 1998).

Таким образом, в рамках социо-биологического подхода главными детерминантами агрессии у животных, влияющими на ее проявления, независимо от видовой принадлежности, являются *социальная* среда, которая, создавая мотивацию, может стимулировать или тормозить проявление агрессии, и *биологическая* составляющая этого поведения, отвечающая за большую или меньшую *генетическую* предрасположенность индивида к агрессивной реакции в провоцирующих условиях.

ГЕНЕТИКА АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ: ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФАКТОРОВ В КОНТРОЛЕ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ У ЖИВОТНЫХ

Высокие показатели наследуемости агрессивности установлены при исследовании разных видов животных, включая обезьян (Fairbanks *et al*., 2004), собак (Saetre *et al*., 2006), мышей (Van Oortmerssen, Bakker, 1981), птиц (Drent *et al*., 2003) и людей (Hudziak *et al.*, 2003), что говорит о том, что значительная доля фенотипической вариации уровня агрессивности в популяциях определяется генетическими факторами. Об этом свидетельствуют межлинейные различия в выраженности агрессивного поведения у лабораторных животных и быстрый эффект, достигаемый при селекции на повышенную и пониженную агрессивность.

Межлинейные различия

Как отмечено выше, о генетически детерминированном характере агрессивного поведения свидетельствует различная выраженность его у линейных животных в одних и тех же условиях. Инбредные линии мышей и крыс отличаются по выраженности агрессии в различных тестах, используемых для оценки агрессивного поведения: после длительной социальной изоляции, после раздражения током, в реакции нападения на пластинку в тесте трубы, а также при демонстрации агрессии в тесте «резидент–интрудер» (Brain, 1979; Куликов, Попова, 1980). Это указывает на влияние генетических факторов, которые участвуют в детерминации разных механизмов, регулирующих агрессивное поведение.

Исследования на мышах и крысах выявили различные варианты взаимосвязи между наследственно обусловленным уровнем тревожности и агрессивностью животного. При исследовании 10 инбредных линий мышей было показано, что самцы тех линий, которые показывали высокий уровень межсамцовой агрессии, имели и больший уровень тревожности, оцениваемый в тесте предпочтения темной или светлой камеры (Guillot, Chapouthier, 1996). В другом исследовании, напротив, линии мышей (Swiss, CD1) с более высоким уровнем атак имели пониженный уровень тревожности, измеряемой в тесте крестообразного приподнятого лабиринта, по сравнению с менее агрессивными линиями DBA/2 и C57BL/6N (Parmigiani *et al*., 1999). В популяционных взаимодействиях высокоагрессивные доминанты проявляли более высокий уровень тревожности по сравнению с субординантными мышами (Ferrari *et al*., 1998). Можно предположить, что тревожность и агрессивность могут быть связаны «ортогональной зависимостью», показанной также и для людей (Barratt, 1972): есть линии животных с высоким уровнем тревожности и агрессивности, с низким уровнем тревожности и высокой агрессивностью, с высоким уровнем тревожности и низкой агрессивностью и низкими уровнями тревожности и агрессивности.

Показано, что различия в характере агрессивного поведения мышей линии CBA/Lac с меньшей выраженностью агрессивного поведения и самцов мышей линии C57BL/6J с большей агрессивностью могут быть обусловлены различиями в эмоциональности, двигательной и исследовательской активности, болевой чувствительности, т. е. находиться под влиянием разных неспецифических составляющих их поведения (Кудрявцева, Ситников, 1987). Большое количество атак, наблюдаемое у особей линии C57BL/6J, может быть результатом более частых столкновений вследствие высокой двигательной и исследовательской активности этих мышей, в то время как у мышей линии CBA/Lac отмечены более низкая двигательная активность и агрессивность в новых условиях. На развитие агрессивного поведения у самцов линии CBA/Lac в большей степени может оказывать влияние выраженная эмоциональность, ингибирующая исследовательскую и двига-

тельную активность (Walsh, Cummins, 1976). Взаимосвязанность проявления многих форм поведения и психоэмоциональных состояний животных, которые могут повлиять на характер агрессивного поведения, обнаружена и при селекции животных на выраженность агрессии.

Селекция по отдельным формам агрессивного поведения

Была проведена успешная селекция мышей на низкую и высокую выраженность агрессивного поведения, причем животные отбирались из генетически однородной популяции для того, чтобы получить различия именно в проявлении агрессии, а не других характеристик, влияющих на нее (Lagerspetz K.M.J., Lagerspetz K.Y.H., 1974). Аналогичные исследования по селекции животных на высокий и низкий уровень агрессивности были проведены и другими авторами (Beilharz R.G., Beilharz V.G., 1975; Van Oortmerssen, Bakker, 1981; Cairns *et al*., 1983; Sandnabba, 1986). Так, дикие домовые (не отличающиеся однородностью генотипа) мыши были селектированы на высокую и низкую агрессию (Benus *et al*., 1991). Агрессивные мыши с коротким латентным временем первой атаки (SAL – short latency attack) демонстрировали активную стратегию поведения, в то время как неагрессивные мыши (LAL – low latency attack) показывали пассивную стратегию поведения. Полагают, что эти различия в стратегии обусловлены разницей в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в условиях стресса (Veenema *et al*., 2005): низкоагрессивные мыши показали более высокое и продолжительное увеличение уровня кортикостерона в плазме, вызванное стрессом, по сравнению с агрессивными мышами.

Межлинейные различия в проявлении агрессивного поведения также достоверно коррелировали с двигательной активностью мышей (Southwick, Clark, 1968), хотя авторы отмечают исключения для некоторых линий. Обычно селекция мышей на выраженность агрессии приводила к повышению двигательной активности (Lagerspetz, 1969). Складывается впечатление, что драки и активность контролируются одними и теми же факторами (Хайнд, 1975). Считается, что двигательная активность отражает степень возбуждения нервной системы (Крушинский, 1960). Это позволило предположить у агрессивных животных большую возбудимость нервных процессов (Goldsmith *et al*., 1978; Вальдман, Пошивалов, 1984). Увеличение интенсивности агрессии связывали как со снижением порога ответа центральной нервной системы на стимуляцию, так и с оптимизацией уровня общей нервной активности, необходимой для осуществления интегрированного поведения. В современных терминах это могло бы называться импульсивностью, которая, по мнению многих исследователей, является необходимой, хотя и далеко не достаточной характеристикой для проявления агрессии.

Эмоциональность, которая чаще всего оценивалась в тесте «открытое поле», понимаемая как поведенческая и физиологическая реакция организма на новизну и сопровождаемая развитием страха, находится в обратной зависимости с проявлениями агрессивности у животных (Brain, Nowell, 1969). Мыши, прошедшие селекцию на более высокий уровень агрессивности, имели меньшие показатели эмоциональности, чем низкоагрессивные самцы (Lagerspetz K.M.J., Lagerspetz K.Y.H., 1974). И, наоборот, селекция крыс на высокую эмоциональную реактивность сопровождалась снижением уровня агрессивности (Annen, Fujita, 1983). Таким образом, можно думать, что эмоциональность влияет на выраженность агрессии у животных, особенно в стрессирующих условиях.

Путем многолетней селекции диких серых крыс (*Rattus norvegicus*), проводимой в Институте цитологии и генетики СО РАН, были получены линии животных, значительно отличающихся по выраженности агрессивного поведения в ответ на приближение человека (тест на перчатку) (Belyaev, Borodin, 1982; Плюснина, Оськина, 2000; Плюснина, Соловьева, 2010). Признак, по которому велась селекция крыс-пасюков, рассматривается как агрессия, вызванная страхом, т. е. как активная защитная реакция (Moyer, 1968). Однако в результате были получены агрессивные крысы, демонстрирующие высокий уровень агрессии не только по отношению к человеку, но и по отношению к партнеру в зоосоциальных взаимодействиях (межсамцовая агрессия, территориальная агрессия и др.) (Плюснина, Соловьева, 2010). Кроме

того, путем селекции были получены «ручные» неагрессивные особи, которые были толерантны или даже «дружелюбны» по отношению к человеку (Belyaev, Borodin, 1982; Плюснина, Оськина, 2000). Показано, что ручные и агрессивные крысы отличаются друг от друга по многим поведенческим и физиологическим характеристикам (Плюснина, Оськина, 2000; Popova *et al.*, 2005; Albert *et al*., 2008; Plyusnina *et al*., 2008). Таким образом, и в этом случае было показано, что генетическая селекция по одному из параметров агрессивного поведения сопровождается изменением многих нейрофизиологических характеристик животных.

Изучение типа наследования при скрещивании контрастных по выраженности агрессивности особей

Ранние попытки определения типа наследования агрессивности животных характеризуются широким разнообразием результатов. При скрещивании линий, контрастных по агрессивности, у потомков первого поколения обнаружены в одних случаях доминирование низкого (Ciaranello *et al*., 1974), в других – высокого (Southwick, 1970; Kessler *et al*., 1977) уровня агрессивности, а также наличие аддитивного характера наследования показателей агрессивности (Куликов, Попова, 1980). Во многих исследованиях обнаружены различия между реципрокными гибридами (Roubertoux, Carlier, 1988). Были получены данные о влиянии Y-хромосомы на проявление межсамцовой агрессии (Stewart *et al*., 1980; Maxson *et al*., 1989).

В исследованиях Ciaranello с соавт. (1974) и Kessler с соавт. (1977) отсутствие реципрокного эффекта на проявление агрессии при скрещивании линий мышей, отличающихся по этому признаку, а также характер расщепления его у потомков второго поколения позволили авторам прийти к выводу о моногенном аутосомном контроле поведения нападения («атака»). Другой генетический подход с анализом реципрокных гибридов и рекомбинантных линий обнаружил, что в контроль агрессивного поведения включаются, по крайней мере, два аутосомных локуса, а также материнский эффект (Eleftheriou *et al*., 1974). При скрещивании двух близкородственных агрессивных и двух близкородственных неагрессивных линий мышей показано, что агрессивность находится под генетическим контролем 4 локусов, два из которых усиливают проявление агрессивности, а два других – подавляют, причем один из локусов, усиливающий агрессивность, находится в Y-хромосоме, остальные – на аутосомах (Selmanoff *et al*., 1976).

По-видимому, разнообразие данных по типам наследования агрессивности обусловлено, в первую очередь, характерным сочетанием родительских линий мышей, взятых для скрещивания и несущих разные генетические пулы, участвующие в определении агрессивности. При диаллельном анализе параметров агрессии, вызванной изоляцией, показано, что латентное время первой атаки, интенсивность и время атак у гибридов первого поколения могут наследоваться как сходно, так и по-разному в зависимости от сочетания родительских линий при скрещивании (Hahn, Haber, 1982), что говорит о множественности генетических факторов, которые их определяют.

В обзорах последнего времени, посвященных анализу данных по генетике агрессивного поведения (Craig, Halton, 2009; Anholt, Mackay, 2012; Pavlov *et al*., 2012), подчеркивается вывод о многолокусной детерминации агрессивного поведения животных и человека. В косвенной детерминации агрессии могут участвовать гены, вовлеченные в регуляцию других видов поведения: полового, исследовательского, тревожности, других эмоциональных состояний и стресс-реактивности.

В настоящее время генетический анализ агрессивности мышей проводится путем поиска локусов количественных признаков (QTL). Так, геномы контрастных по агрессивности линий маркируются множеством полиморфных маркеров, линия агрессивных мышей (например, BALB/cJ) скрещивается с неагрессивной линией (например, A/J) и анализ ассоциаций маркированных локусов с агрессивностью проводится на расщепляющихся гибридных популяциях (Dow *et al*., 2011). Однако этот подход позволяет оперировать лишь с некоторой частью возможной генетической и фенотипической изменчивости, которая ограничена разницей между выбранными родительскими линиями. Бывает трудно установить гены, связанные с агрессивностью и находящиеся в обнаруженном районе хромосомы – локусе количественного

признака (QTL). Протестировать каждый из множества имеющихся в локусе генов часто не представляется возможным. Многообещающим выглядит подход, предусматривающий создание панели рекомбинантных инбредных линий, полученных на основе гибридов от скрещивания нескольких разных линий мышей (Churchill *et al*., 2004), что должно, казалось бы, обеспечить сужение районов поиска генов на хромосомах (Aylor *et al*., 2011). Однако пока не удалось найти гены агрессивности таким способом (Mathes *et al*., 2011).

Нокаутные и трансгенные животные

В дополнение к исследованиям по поиску QTL перспективы изучения роли генов в контроле различных форм поведения вообще и агрессивного, в частности, в последние годы связывались с успехами в области молекулярных технологий, которые позволяют получать ген-модифицированных животных, например, с выключением (нокаутные мыши) или инсерцией (трансгенные мыши) определенных генов, вовлеченных в функционирование нейромедиаторных систем (обзоры: Haller, Kruk, 2006; Miczek *et al*., 2007), регулирующих агрессивное поведение (Nelson, Trainor, 2007).

У мышей обнаружены мутации, с которыми связывают формирование гиперагрессивного поведения. Спонтанно возникающая мутация гена ядерного рецептора NR2E1, получившая название «ярость» (fierce), приводит к гиперагрессивности (Young *et al*., 2002a), которая может быть подавлена замещением мутантного гена нормальным человеческим гомологом (Abrahams *et al*., 2005). Также выключение гена нейрональной NO-синтазы приводит к тому, что мыши начинают нападать даже на партнеров, которые демонстрируют полное подчинение и нежелание продолжать схватку. Эти мыши-агрессоры убивают своих сожителей по клетке (Nelson *et al*., 1995). Интересно, что материнская агрессия по отношению к интрудеру-самцу у таких мышей подавлена (Gammie, Nelson, 1999), в то время как у мышей с повышенной материнской агрессией экспрессия нейрональной NO-синтазы повышена (Gammie *et al*., 2007). Высказано предположение, что изменение агрессивного поведения при нокауте гена нейрональной NO-синтазы связано с нарушениями серотонергической нейротрансмиссии (Chiavegatto *et al*., 2001).

В случаях с мутациями отдельных генов зачастую выясняется, что эффект этих мутаций зависит от генетического фона. Так, эффект нокаута гена нейрональной NO-синтазы, который выражается в гиперагрессивном поведении, ослабляется при переносе данной мутации с генотипа мышей C57BL/6J-129 на генотип мышей C57BL/6J (Le Roy *et al*., 2000). Также действие мутации «ярость» значительно ослабляется при переносе ее с генотипа мышей C57BL/6J на генотип мышей B6129F1 (Young *et al*., 2002a). Эти факты свидетельствуют о наличии генов-модуляторов, которые могут серьезно изменять действие аллелей агрессивности. Манипуляции с отдельными генами подтверждают мнение о том, что агрессивное поведение как фенотипическая характеристика имеет сложную генетическую основу, которая представлена ансамблем взаимодействующих генов.

Проявление агрессивного поведения тесно связано с особенностями функционирования серотониновой (5-НТ) системы мозга и, в частности, с состоянием 5-НТ рецепторов. Исследования мышей с нокаутом по гену рецепторов серотонина 5-HT_{1A} выявили снижение агрессивности у мутантных мышей по сравнению с мышами дикого типа (Bell, Hobson, 1993). Мыши с нокаутом по гену серотонинового рецептора $5HT_{1B}$ отличаются повышенной агрессивностью (Saudou *et al*., 1994). При выключении гена *MAOA*, фермента, разрушающего серотонин, уровень агрессии был повышен на фоне увеличенного уровня серотонина (Cases *et al*., 1995; Scott *et al*., 2008; Popova *et al*., 2001). Нокаутные мыши по гену серотонинового транспортера *Sert*, обеспечивающего обратный нейрональный захват нейромедиатора из синаптической щели, имеют сниженный уровень агрессии и увеличенный синтез серотонина (Holmes *et al*., 2002; Kim *et al*., 2005; Lewejohann *et al*., 2010).

Исследования мышей-нокаутов по генам, ответственным за метаболизм норадреналина**,** не подтверждают и не отрицают возможность специфического участия норадреналина в механизмах агрессивного поведения. У мышей-нокаутов по гену норадреналинового транспортера (*Net*) или по гену *Mao-A*, кодирующему фермент катаболизма катехоламинов,

отмечены повышенный уровень норадреналина и повышение агрессии по сравнению с диким типом (Cases *et al*., 1995; Haller *et al*., 2002). У мышей с выключенным геном дофамин-бета-гидроксилазы, фермента биосинтеза норадреналина, отмечено снижение как уровня норадреналина, так и агрессии (Marino *et al*., 2005). Мыши, нокаутные по гену норадреналинового рецептора альфа-2c, быстрее атаковали интрудера, чем мыши дикого типа, в то время как мыши с повышенной экспрессией этого рецептора имели противоположный поведенческий фенотип (Sallinen *et al*., 1998). У нокаутов по гену дофаминового транспортера (*Dat1*) наблюдали повышенный уровень дофамина и усиление агрессивного поведения (Rodriguiz *et al*., 2004). Нокауты по гену катехол-О-метил трансферазы (*Comt*), фермента катаболизма катехоламинов, демонстрировали повышенную агрессивность (Gogos *et al*., 1998). Имеется много данных о влиянии делеций других генов на агрессивность животных (обзоры: Nelson, Chiavegatto, 2000; Miczek *et al*., 2007). Агрессия, как и все виды поведения, пластична, и ее проявления зависят от внешних условий. Доказано наличие взаимодействия генотипа и среды на проявление агрессии. Так, макаки, которые воспитывались в неблагоприятных социальных условиях, были более агрессивны, особенно если у них был аллель гена *Mao-A*, обусловливающий низкую активность фермента катаболизма катехоламинов – моноаминоксидазы типа А (Karere *et al*., 2009). Внешние факторы могут оказывать влияние на агрессивность также через гормональную систему, включенную в регуляцию стрессорной реакции и репродуктивной функции. Эти внешние стимулы зачастую являются феромонами, действующими на рецепторы вомероназальной системы, которая у животных является рецептивным органом, воспринимающим информацию о родственных связях, сексуальных отношениях, наконец, о близости хищников (Tirindelli *et al*., 2009; Mucignat-Caretta, 2010; Isogai *et al*., 2011).

Не умаляя успехов в выяснении роли отдельных генов в регуляции сложных форм поведения при использовании нокаутных животных, все же хотелось бы отметить искусственность изменений, которые возникают в их организме. Интерпретация различий в поведении, обусловленных искусственными генетическими мутациями, может быть ошибочна, поскольку в процессе индивидуального развития происходит компенсаторное изменение функциональной активности многих нейротрансмиттерных систем, что неизбежно должно повлиять и на характер разных форм индивидуального и социального поведения, в том числе агрессивного. Можно предположить, что использование ген-модифицированных животных для изучения роли отдельных генов и медиаторных систем в естественных механизмах поведения вряд ли станет продуктивным методом, поскольку выключение гена, скорее всего, приводит к развитию «патологического мозга», причем с изменениями, зачастую далекими от тех, которые возникают при различных мультифакториальных патологиях.

Нейрохимическая перестройка мозга в процессе формирования агрессивного типа поведения у самцов мышей: от поведения – к гену

Хорошо известно, что исход межсамцовых агонистических взаимодействий в большой степени определяется предшествующим социальным опытом. Победившее в драке животное более агрессивно в следующем столкновении с незнакомым партнером, а агрессивность мышей, терпящих поражение, наоборот, подавляется (Scott, 1966; Lagerspetz K.M.J., Lagerspetz K.Y.H., 1974; Cairns *et al*., 1983). Постоянный опыт побед использовался в экспериментах для воспитания агрессивных самцов-бойцов (обзор Scott, 1971), при этом агрессивность особей увеличивалась после одержанной победы, и этот феномен проявлялся у мышей как высоко-, так и низкоагрессивной линий (Cairns *et al*., 1983). В свою очередь, побежденные мыши хуже тренируются на повышение агрессивности, и с каждым последующим поражением подчиненное поведение становится все более выраженным и стереотипным, причем оно демонстрируется по отношению не только к агрессивному партнеру, но и к неагрессивным особям (Scott, 1966; Leshner *et al*., 1980; Пошивалов, 1986). Показано, что ингибирующие эффекты однократного поражения сохраняются в течение нескольких дней (Charpentier, 1969), а некоторые

параметры поведения (замирание) проявляются и через десятки дней при столкновении даже с неагрессивным партнером (Scholtens, van de Pool, 1987). Последовательный опыт поражений приводит к формированию субмиссивного поведения, которое существенно меняет состояние особей (Raab *et al*., 1986). Полагают, что именно социальное давление – опыт повторяющихся социальных поражений при столкновении с доминантной особью – является причиной, хотя и не единственной, того, что групповые животные демонстрируют низкую агрессивность по сравнению с изолированными (Cairns *et al*., 1983). Таким образом, существенным является опыт социального обучения, в результате которого у индивида (особи) формируется представление о возможных негативных и позитивных последствиях агонистического взаимодействия и который во многом может предопределить его дальнейшее поведение.

Этот принцип был использован в модели сенсорного контакта (Kudryavtseva, 1991), позволяющей формировать у животных агрессивный тип поведения под влиянием повторного опыта побед в ежедневных конфронтациях. Основным методическим приемом в этой модели было постоянное проживание партнеров в условиях сенсорного контакта. Для этого пары самцов мышей одной и той же линии постоянно содержат в небольшой экспериментальной клетке, разделенной прозрачной перегородкой с отверстиями, позволяющей им видеть, слышать и воспринимать запахи друг друга. Один раз в день перегородка убирается для инициации «социального конфликта». В ежедневных конфронтациях с представителем противоположного социального опыта у половины самцов формируется агрессивный тип поведения, у другой половины – субмиссивный. Подробное описание всех этапов методики приводится в нескольких обзорах (Kudryavtseva, 2011; Кудрявцева, 2012).

Вскоре было замечено, что повторный опыт агрессии, как и повторный опыт социальных поражений, специфически изменяет многие формы социального и индивидуального поведения в различных ситуациях, а также психоэмоциональное состояние самцов мышей. Ценным оказалось пришедшее понимание того, что длительный позитивный и негативный социальный опыт в условиях хронического конфликта может приводить к развитию различных психоэмоциональных и психоневрологических заболеваний. Среди них экспериментально было подтверждено формирование под влиянием хронического опыта социальных неудач депрессивно-подобного состояния, психогенного иммунодефицита, генерализованной тревожности и др. (Devoino *et al*., 1993; Kudryavtseva, Avgustinovich, 1998; Августинович и др., 2004; Тендитник и др., 2004). У самцов с повторным опытом «побед» развивались патологическая неконтролируемая агрессия, злобность, повышенная тревожность, раздражительность, нарушение мотивационного поведения, социального распознавания, а также появление неврологической симптоматики: гиперактивности, дефицита внимания, стереотипий и т. д. (Kudryavtseva, 2006).

В первых исследованиях у агрессивных самцов были найдены изменения медиаторной активности мозга на уровне метаболизма, активности ферментов, рецепции в разных отделах мозга, возникающие под влиянием повторного опыта агрессии, сопровождавшегося победами и формирующие дисбаланс в работе медиаторных систем – активации дофаминергической и ингибиции серотонергической систем головного мозга (Kudryavtseva, 2006). Возникло предположение, что эти изменения в моноаминергической активности мозга должны сопровождаться изменением экспрессии определенных генов в структурах мозга как у самцов с повторным опытом агрессии, так и у особей с повторным опытом социальных поражений, что и было выявлено в последующих экспериментах. Так, у агрессивных самцов на фоне активированных дофаминергических систем было найдено увеличение экспрессии дофаминергических генов (*Th*, *Dat1*, *Snca*) в вентральной тегментальной области, содержащей большие скопления дофаминергических нейронов, причем изменения в экспрессии генов тирозингидроксилазы (*Th*) и транспортера дофамина (*Dat1*) длительно сохранялись (Кудрявцева, Бакштановская, 1991; Bondar *et al*., 2009). Была также продемонстрирована корреляционная связь между выраженностью агрессивного поведения и экспрессией дофаминергических генов у агрессивных самцов мышей. В то же время у этих самцов происходило снижение уровня экспрессии серо-

тонергических генов: транспортера серотонина (*Sert*), триптофан гидроксилазы (*Tph2*), моноаминоксидазы (*Mao-A*) – в ядрах шва среднего мозга, который после периода прекращений конфронтаций возвращался к нормальному состоянию (Smagin *et al*., 2013). Помимо специфических функциональных генов найдено снижение экспрессии нейротрофического фактора мозга (Bdnf) (Boyarskikh *et al*., 2013; Smagin *et al*., 2013). Эти данные свидетельствовали о принципиальной возможности исследовать функциональную или, другими словами, физиологическую регуляцию экспрессии генов у животных с агрессивным или субмиссивным типами поведения, нейрохимическая и гормональная регуляция которых достаточно хорошо изучена. Исследования показали, что существуют динамика и последовательность нейрохимических и молекулярных событий, вовлекающих на определенном этапе конкретные гены в процесс работы медиаторных систем мозга. Создавая экспериментальные условия, при которых меняется тип поведения (инверсия поведения), можно предсказуемо изменять экспрессию определенных генов в структурах мозга. Таким образом, помимо пути от гена к поведению, когда наследственная предрасположенность влияет на характер агонистического поведения, существует и путь от поведения к гену, когда изменение или формирование определенного типа поведения под влиянием средового воздействия приводит к изменению экспрессии определенных генов, в первую очередь, тех, продукты которых вовлечены в регуляцию работы медиаторных систем.

Работа с животными выполнялась в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (№ RFMEFI61914X0005).

Генетика агрессивности человека

В обзоре Анхольт и Макей (2012) приводятся довольно полные сведения о генетической детерминации агрессивности человека. При этом целесообразно отметить, что речь идет о тех же генах: транспортере серотонина и его рецепторах, ферментах биосинтеза и катаболизма катехоламинов и их рецепторах, которые были выявлены в экспериментальных исследованиях на животных.

Уровень наследуемости агрессивности у людей весьма высок. В Голландии при исследовании близнецов в возрасте 3–10 лет коэффициент наследуемости элементов агрессивного поведения составил с высокой степенью достоверности от 0,51 до 0,72 (Hudziak *et al*., 2003), а при исследовании взрослых близнецовых пар – от 0,37 до 0,57 (Yeh *et al*., 2010).

Отметим, что в поле зрения исследований агрессивного поведения человека попадают в основном случаи явно выраженных агрессивных наклонностей и проявлений, относящихся к патологической агрессии, так как она зачастую сочетается с наличием тех или иных нейропсихических нарушений. Те виды агрессии, которые носят характер, скорее, не физических, а психологических воздействий, остаются практически вне сферы генетических исследований. Им трудно найти аналоги у животных. Возможно, та разновидность агрессивного поведения животных, которая обозначается как демонстрации, может служить некоторым подобием «психологической» агрессии человека, хотя авторам обзора не приходилось встречать в литературе исследований такой аналогии.

Итак, патологическая агрессия человека обычно является следствием либо травматического поражения мозга, либо нейропсихических нарушений, алкоголизма, наркомании, или результатом нейродегенеративных процессов. Физическая агрессия и импульсивные реакции наблюдаются у 20–65 % пациентов с болезнью Альцгеймера. Генетические факторы сочетанного проявления агрессии с нейродегенерацией остаются неизвестными. Мы полагаем, что так как при нейродегенеративных процессах страдают, прежде всего, высшие центры регуляции поведения, в результате отменяются «социальные табу», ограничивающие проявления инстинктивных императивов, которые при наличии генетической предрасположенности находят выражение в импульсивном агрессивном поведении. Вследствие этого внимание исследователей сосредоточено на генах, которые, с одной стороны, ассоциированы с агрессивным поведением, с другой – подозреваются в участии в нейродегенеративных явлениях. Так, эпизоды агрессии фиксируются чаще у пациентов с болезнью Альцгеймера, гомозиготных по аллелю e4 гена аполипопротеина Е (исследованы груп-

пы численностью 100–400 пациентов) (Craig *et al*., 2004a; van der Flier *et al.*, 2007). Однако наличие такой ассоциации не подтвердилось при изучении более многочисленной когорты пациентов с болезнью Альцгеймера (1 120 больных) (Hollingworth *et al*., 2006). В ряде исследований изучалось участие в ассоциации агрессии с болезнью Альцгеймера полиморфизмов генов триптофан гидроксилазы (Craig *et al*., 2004b), рецепторов серотонина 5HT-2A и 5HT-2C (Assal *et al*., 2004; Pritchard *et al*., 2008) и транспортера серотонина (Sweet *et al.*, 2001; Assal *et al*., 2004; Pritchard *et al*., 2007). Однако результаты получились противоречивыми.

Ассоциация агрессии с шизофренией в некоторой степени связана с полиморфизмом гена катехол-О-метил трансферазы – Comt Val158Met (Strous *et al.*, 1997; Kotler *et al*., 1999; Tosato *et al*., 2011). У шизофреников и алкоголиков, гомозиготных по аллелю Met, активность этого фермента снижена, у них же повышена агрессивность и отмечается склонность к суициду, который рассматривается как агрессия, направленная на самого себя (Nolan *et al*., 2000; Nedic *et al*., 2011). У людей различия в агрессивном поведении часто связывают с полиморфизмом по гену дофаминового транспортера *Dat1* (Young *et al*., 2002b; Chen *et al*., 2005). Однако эти результаты следует принимать с осторожностью ввиду малых выборок, наличия в проявлении ассоциаций половых различий, а также разницы в историях болезни исследованных пациентов и в связи с различиями их условий жизни и гетерогенностью в манифестации психиатрической симптоматики. Кроме того, интерпретация влияния полиморфизма генов-кандидатов на нейропатологическую агрессию осложняется трудностями установления связей между заболеванием и непосредственными причинами формирования агрессивного фенотипа.

Хорошо известный из литературы случай действительной идентификации генов агрессии человека получен в 1993 г. при изучении большой голландской семьи (Brunner *et al*., 1993). У нескольких мужчин из этой семьи были отмечены задержка умственного развития и склонность к насилию, которая выражалась в импульсивных актах агрессии, поджогах, попытках изнасилования, эксгибиционизме. У этих мужчин была снижена активность моноаминоксидазы А (MAOA), фермента катаболизма биогенных аминов в центральной нервной системе, по причине наличия точковой мутации в восьмом экзоне гена *Mao-A*, которая приводила к образованию кодона терминации. Последующие работы подтвердили наличие ассоциации между полиморфизмом гена *MAOA* и агрессивностью у человека (Manuck *et al*., 2000; Huang *et al*., 2004), что аналогично результатам, полученным в эксперименте на животных (Cases *et al*., 1995; Newman *et al*., 2005).

На людях также показано, что влияние отдельных генов на агрессивное поведение сильно зависит от генетического фона. Так, эффект аллелей генов *Mao-A* и серотонинового транспортера на агрессивное поведение во многом определяется предшествующим опытом, особенно условиями раннего развития и воспитания (Caspi *et al*., 2002, 2003; Huang *et al*., 2004; Kim-Cohen *et al*., 2006; Lazary *et al*., 2008; Kinnally *et al*., 2009; Weder *et al*., 2009; Edwards *et al*., 2010). Причем хорошие условия воспитания, наличие хорошей родительской заботы блокируют проявление генов агрессивности, в то время как плохие условия и отсутствие родительской заботы способствуют проявлениям агрессивности. Эта же закономерность получена при исследовании на животных (крысы, обезьяны) и, по-видимому, является для животных универсальной.

Ассоциация полиморфизма промоторного района гена серотонинового транспортера с агрессивным поведением описана в нескольких работах (May *et al*., 2010; Gonda *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). Однако данные о взаимосвязи этого полиморфизма с суицидальными наклонностями, которые расцениваются как проявление агрессии, направленной на себя, были весьма противоречивыми (Bondy *et al*., 2006; Roy *et al*., 2009, Tsai *et al*., 2011). Была обнаружена ассоциация полиморфизма («короткий аллель–длинный аллель») промоторного района гена серотонинового транспортера (*SLC6A4*) с агрессивным поведением, а также с различными нейропсихическими нарушениями (Murphy *et al*., 2008).

В дополнение к вопросу о роли серотонина анализировалось значение таких нейромедиаторов, как дофамин, норадреналин и ГАМК. В результате обнаружены ассоциации между девиан-

тным поведением подростков и полиморфными аллелями дофаминового рецептора, рецептора ГАМК и серотонинового транспортера (Miczek *et al*., 2002; Marino *et al*., 2005; Hohmann *et al*., 2009). Следует отметить, однако, что описанные ассоциации полиморфных аллелей с агрессивным поведением не всегда воспроизводятся при исследовании разных популяций. Выявление влияния полиморфных аллелей генов *Mao-A* и серотонинового транспортера – это только верхушка айсберга, малая часть той нейрогенетической системы, которая определяет наличие или отсутствие агрессивного поведения или его выраженность.

Хорошо известно, что эндокринная система влияет на проявление и выраженность агрессии. Виновником чаще всего объявляется мужской гормон – тестостерон. Данные правительства США говорят о том, что мужчины совершают убийства в 10 раз и уголовные преступления в 5 раз чаще, чем женщины (http://www.ojp.usdoj.gov/bjs/). Аналогичные результаты дает статистика преступлений в других странах (Moffitt *et al*., 2001). Множество данных свидетельствуют о наличии хотя и небольшой ($r = 0{,}14$), но статистически достоверной корреляции между уровнем тестостерона в плазме крови и агрессивным поведением как у животных (Archer, 1991), так и у человека (Book *et al*., 2001). М. Вильсон и М. Дэлэй (Wilson, Daly, 1985) характеризуют агрессивность молодых людей и подростков как «синдром молодого мужчины» (Young Male Syndrome). Это предполагает наличие связанных с полом генов, влияющих как на синтез тестостерона, так и на уровень агрессивности, однако поиск таких генов на Y-хромосоме с помощью весьма изощренных экспериментов оказался практически безуспешным (Gatewood *et al*., 2006). Возможно, дело в том, что тестостерон создает лишь определенный гормональный фон, на котором лучше могут больше манифестировать другие гипотетические гены агрессивности.

Выявление генетической базы агрессивного поведения человека является сложной задачей в связи с генетической гетерогенностью популяций людей и трудно контролируемыми средовыми влияниями. Для полного представления о нейрогенетической базе такого универсального свойства живых организмов, как агрессия, необходимы широкие сравнительно-генетические исследования и анализ, основанный на использовании эволюционного подхода для объяснения происхождения и биологического смысла различных проявлений агрессивного поведения. Кроме того, исследование генетики агрессивности человека сосредоточено на анализе крайних форм агрессивности, в то время как генетическая основа всего спектра агрессивно-неагрессивного поведения, которое градуально изменяется от нерешительности к уверенности, от подавленного гнева к явному его проявлению, от угрозы насилия к прямому насилию и т. д., часто выпадает из поля зрения. Фенотипическая вариабельность агрессивных проявлений и множественность модифицирующих факторов, а также субъективность оценок поведения сильно усложняют возможность количественной оценки уровня агрессивности при проведении полногеномного анализа ассоциаций. Эти практически неразрешимые вопросы фактически не оставляют другого выбора, как искать ключ к решению проблемы генетики агрессивного поведения в очень узком круге имеющихся возможностей («поиск потерянного ключа под фонарем»), который фактически ограничивается изучением биогенных аминов мозга и нейротрофических факторов. Поэтому прогресс в изучении сложной архитектуры генетической детерминации агрессивного поведения и агрессивности видится в области эксперимента на модельных организмах животных, у которых можно провести аккуратную оценку фенотипических проявлений агрессивности в разных, но контролируемых условиях и на выровненном генетическом фоне. Сравнительно-генетические исследования помогут выявлению генов-ортологов и установлению эволюционно консервативных принципов организации генетической системы детерминации агрессивности.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АГРЕССИВНОГО ПОВЕДЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ СОВРЕМЕННЫХ ПРОТЕОМНО-ТРАНКРИПТОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Метаболомно-протеомные исследования

Исследования, выявившие изменения активности моноаминергических систем мозга

на уровне метаболизма, активности ферментов и рецепции (обзор Kudryavtseva, 2006) как в процессе формирования патологии агрессивного поведения у мышей, так и при селекции на выраженность агрессивного поведения у крыс-пасюков (Popova *et al*., 2005), позволяют надеяться, что их расширение с помощью новых комплексных метаболомно-протеомных методов, использующих совокупность всех метаболитов, являющихся конечными продуктами синтеза в клетке, ткани, органе и организме, а также белков, вовлеченных в обменные процессы, будет продуктивным в плане понимания сложных механизмов регуляции агрессии. Поскольку формирование различных патологий поведения сопровождается перестройкой работы мозга, то исследование устойчивости и динамики таких состояний может раскрыть многие новые механизмы, позволяя изучать, например, развитие болезни от ее начала до глубокой патологии.

Транскриптомный анализ

Бурное развитие молекулярных технологий в последние годы, начиная с момента появления метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Chattopadhyay *et al*., 1993; Wong *et al*., 1994; Auboeuf, Vidal, 1997), открыло перспективы в исследовании вовлеченности генов в механизмы регуляции различных сложных форм поведения. Метод позволил давать количественную оценку содержания мРНК в минимальных объемах ткани. Очевидна ценность применения этих методов для исследования роли отдельных генов в механизмах регуляции нейрохимических процессов в разных структурах мозга, величина которых очень небольшая, а функциональные роли их существенно различаются. Это значит, что имеется возможность исследовать взаимосвязь между определенными формами поведения, нейрохимическая регуляция которых определяется в разных структурах мозга, причем как при функциональных физиологических, так и при генетических изменениях, например, связанных с селекцией.

В настоящее время распространено мнение, что физиологические процессы приводят к индукции целого ряда генов, ответственных за запуск долговременных перестроек фенотипа, метаболизма и связей нервных клеток. Показано, что экспрессия некоторых генов может быстро увеличиваться или снижаться, в то время как экспрессия других генов может изменяться градуально (Nichols *et al*., 2003). Так, были найдены динамические изменения экспрессии гена каппа-опиоидных рецепторов (Spangler *et al*., 1996; Goloshchapov *et al*., 2005), проэнкефалина (Crespo *et al*., 2001), мю-опиоидных рецепторов (Azaryan *et al*., 1998; Nikulina *et al*.,1999) в различных экспериментальных ситуациях.

Нами было продемонстрировано изменение экспрессии, по крайней мере, 12 генов (из 15 исследованных) в структурах мозга самцов мышей под влиянием повторного опыта агонистических взаимодействий (Филипенко и др., 2001; Filipenko *et al*., 2001, 2002a, b; Филипенко и др., 2002; Кудрявцева и др., 2004; Goloshchapov *et al*., 2005; Bondar *et al*., 2009; Kudryavtseva *et al*., 2010; Boyarskikh *et al.*, 2013; Smagin *et al*., 2013). При выборе генов и структур мозга, в которых предполагалось изменение их экспрессии, мы руководствовались, прежде всего, ролью этих структур в механизмах агонистического поведения, которая была подтверждена изменением каких-либо параметров активности медиаторных систем, а также, в первую очередь, анатомическим строением и связями этих структур (Кудрявцева и др., 2004). Это были функциональные гены, которые предположительно должны вовлекаться в процесс работы медиаторных систем в том случае, когда другие возможности регуляции по механизмам обратной связи на уровне метаболизма и рецепции исчерпаны. Как правило, это должно происходить при формировании патологических состояний, основным критерием развития которых является длительность сохранения изменений, возникающих под влиянием психопатогенного воздействия. Таким образом, не всегда, а только при определенных состояниях организма функциональная активность генов может изменяться под влиянием средовых воздействий.

Подход к изучению генетической базы агрессивности и агрессивного поведения, который начал использоваться сравнительно недавно, связан с исследованием полного транскриптома. В 2014 г. появилась статья К. Малки и соавт. (Malki *et al*., 2014), которая, по утверждению авторов, является первой попыткой анализа

транскриптома префронтальной коры у мышей трех линий, селекционированных по агрессивному поведению, по сравнению с тремя контрольными неагрессивными линиями. Экспрессия генов клеток префронтальной коры исследована с помощью микроматриц, позволяющих оценить более 45 тыс. транскриптов генома мыши. В результате выявлены две основные группы генов, ассоциированных с агрессивным поведением мышей, которые включены в две генные сети. Таким образом, было выделено два «генных модуля», статистически достоверно связанных с проявлениями агрессивности, которые детерминировали функцию двух основных метаболических путей. Ключевым центром одного из них является ген *NF-kB* (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – это ген транскрипционного фактора, функция которого имеет особое значение для регуляции работы нейронов, клеток глии и иммунной системы. Ключевыми центрами второго генного пула являются гены *MAPKs* (mitogen-activated protein kinases) – это гены ферментов, которые обеспечивают такие фундаментальные процессы, как пролиферация и дифференцировка клеток, апоптоз, реакция клеток на стресс и другую стимуляцию. Ясно, что функция выявленных генных сетей многообразна, практически универсальна, и нет ничего удивительного, что эти гены и метаболические пути вовлечены в регуляцию агрессивного поведения. В составе выделенных генных сетей авторы идентифицировали 14 генов-кандидатов, которые с большей или меньшей степенью статистической вероятности ассоциированы с агрессивным поведением мышей. Интересно, что среди этих генов нет ни одного из того списка генов, которые были обнаружены ранее в мутантных линиях. Можно предположить, что различия по агрессивному поведению линий мышей, использованных для анализа транскриптома, связаны с генами, каждый из которых оказывает минорное влияние на агрессивность, и их эффект обнаруживается лишь при совокупном их действии. Влияние одиночных генов в случаях мутации или нокаута выявляется в соответствующих моделях, когда эти гены могут оказывать сильное действие на поведение. Но даже в этих случаях, как было показано выше, эффекты так называемых майор-генов могут сильно модифицироваться средой и/или генетическим окружением. Из всего списка генов-кандидатов в качестве «многообещающего» авторы выделяют ген киназы-2 бета-адренорецепторов (*adrbk2* или *Grk3*). Интерес авторов к этому гену связан с тем, что мутацию гена *Grk3* человека находят у 10 % больных биполярным или маниакально-депрессивным психозом (МДП) (Parruti *et al*., 1993). У погибших больных с МДП уровень мРНК гена *Grk3* во фронтальной коре снижен в 2,5 раза (Rao *et al*., 2009).

Перспективы использования транскриптомных исследований

Молекулярные методики полного секвенирования транскриптома – всего набора РНК в клетке с использованием высокопроизводительных инструментальных платформ массового параллельного секвенирования, таких как Illumina и SOLiD, основанные на секвенировании фрагментов кДНК, позволят определить гены, специфично экспрессирующиеся в исследуемой ткани у животных с опытом агрессии. К таким тканям организма относятся, прежде всего, структуры мозга и надпочечников, вырабатывающих гормоны стресса. Повторные эксперименты по сравнению агрессивных и неагрессивных животных, а также животных с различным опытом агрессии позволяют выделить группы дифференциально экспрессирующихся генов.

Полнотранскриптомный анализ позволит также выявлять совокупность всех транскриптов, синтезируемых группой клеток, включая мРНК и некодирующие РНК, и охватывает полный спектр изменений экспрессии генов всего организма. При этом транскриптом может сильно меняться в зависимости от условий окружающей среды, отражая профиль экспрессии генов в данный момент времени.

Транскриптомы, полученные из разных отделов мозга с различной специализацией (вентральная тегментальная область, содержащая скопления дофаминергических и опиоидергических нейронов и ответственная за механизмы положительного подкрепления; ядра шва среднего мозга, содержащие скопления серотонергических нейронов, ответственных за ингибирующий контроль агрессивного поведения; миндалина, участвующая в контроле эмоций; гипоталамус, участвующий в регуляции стресс-реактивности)

у агрессивных животных, могут ответить на вопрос о механизмах избирательного участия этих отделов и оценить характер специфичности их работы в сравнении с неагрессивными животными, независимо от того, получены ли они в результате селекции или под влиянием средовых воздействий. Таким образом, применение метода секвенирования всего транскриптома в отделах мозга позволит определить значение наследственно обусловленных факторов и средовых влияний в детерминации проявления агрессивных реакций и отделить одни изменения от других. Анализ метаболических и транскриптомных карт, построенных на основании полученных результатов, позволит выявить узловые точки и основные молекулярные мишени, воздействуя на которые возможно осуществить коррекцию аномального поведения.

В связи с развитием новых геномных технологий появляется возможность ответить на главные вопросы, которые ставит перед нами генетика агрессивного поведения: какие транскрипционные факторы ответственны за функционирование генов, вовлеченных в регуляцию агрессивности, и как осуществляется взаимосвязь регуляторных процессов на всех уровнях функционирования системы агрессивных реакций? какова молекулярная природа нейрохимической избирательности воздействия на функционирование того или иного гена в разных структурах мозга у животных с контрастными типами социального поведения? какие гены (major genes) играют ключевую роль в формировании разных нейрофизиологических статусов с противоположными поведенческими, нейрохимическими, физиологическими и психоэмоциональными особенностями, наблюдаемыми у животных одного генотипа? На эти вопросы поможет ответить нейроинформатика поведения, которая будет анализировать результаты транскриптомных исследований на основе данных профилирования мРНК, выделения дифференциально экспрессирующихся генов, реконструкции генных сетей по экспрессионным данным.

Нейроинформатика поведения

В сферу нейроинформатики входит сбор результатов, полученных в ходе нейробиологических исследований, перевод этих результатов в формат баз данных для их последующего анализа с помощью вычислительных моделей и специализированных компьютерных аналитических программных инструментов.

В задачи биоинформатики входит изучение особенностей экспрессии генов в структурах мозга, передачи сигнала между органами и между отдельными клетками (работа нейронов, секреция). Отметим, что задачи компьютерной геномики, смежные с анализом экспрессии генов, и описание регуляторных характеристик геномной ДНК, критичных для определения уровня транскрипции, решены лишь частично. Описание механизмов передачи информационных сигналов, связанных с поведением, должно опираться на реконструкцию сетей взаимодействий между структурами мозга и группами клеток. Необходима реконструкция генных сетей – комплексов взаимодействующих макромолекул в клетке, определяющих пути передачи сигналов и взаимодействия между клетками и органами.

В рамках молекулярно-генетических исследований с помощью полногеномного секвенирования (RNA-Seq) могут быть выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены в отделах мозга у агрессивных и неагрессивных животных, полученных путем селекции или в результате развития патологии агрессивного поведения. Оценка уровней экспрессии этих генов, определенная в масштабе генома, должна подтверждаться протеомными данными и ПЦР в реальном времени.

Полногеномный анализ экспрессии генов на уровне транскрипции в исследуемых областях мозга животных поможет найти новые маркеры, связанные с агрессивным поведением, поскольку технологии микрочипов и в последующем более прогрессивные транскриптомные технологии изменили понимание о взаимосвязи фенотипических проявлений с развитием и поведением животных. Сравнение с доступными данными по гомологичным генам у человека, в том числе геном наследственных заболеваний, и выявление сходства между предполагаемой патологией поведения, развивающейся у животных под влиянием повторного опыта агрессии, и определенным психоневрологическим расстройством у людей могут быть приняты за критерий адекватного моделирования заболевания. В резуль-

тате объединения классических и современных методов исследования станет возможным поиск генов-маркеров агрессивности и кандидатов для терапии, выделение белковых продуктов, связанных с агрессивным поведением.

Эпигенетическая регуляция агрессивного поведения

Кратко остановимся на возможности эпигенетической регуляции агрессивного поведения (Archer *et al*., 2012; Provençal *et al*., 2014). Данные об изменении процессов метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, ремоделировании хроматина в клетках мозга появились сравнительно недавно, но их важность трудно переоценить (LaPlant *et al*., 2010).

В опытах на мышах было показано, что снижение материнской заботы о потомстве в период вскармливания приводит к серьезным изменениям поведения взрослых мышей, при этом сильно повышается уровень межсамцовой агрессии (Weaver *et al*., 2004). Напротив, материнская агрессия самок, испытавших дефицит материнской заботы при вскармливании, снижается, но у них же нарушается материнское поведение относительно собственного потомства (Veenema *et al*., 2007). Аналогичное влияние недостаточной родительской заботы на повышение агрессивности у мальчиков отмечено в данном обзоре выше. Влияние материнской заботы на агрессивное поведение взрослых потомков связывают с изменением уровня метилирования гена глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе (McGowan *et al*., 2009). Гиперметилирование промоторного района приводит к снижению экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора, что, в свою очередь, нарушает адекватное функционирование отрицательной обратной связи в системе, регулирующей уровень стрессовых реакций. Повышение стресс–реактивности сопровождается усилением импульсивного, в том числе и агрессивного, поведения. Такого же рода изменения метилирования отмечены для промоторного района гена *MAOA* (Pinsonneault *et al*., 2006), что в случае снижения транскрипционной активности этого гена может приводить, как было отмечено выше, к повышению проявлений агрессивного поведения. Таким образом, обнаружение влияния эпигенетических механизмов на регуляцию агрессивного поведения открывает новое направление исследований, которое должно значительно обогатить наши представления о всех возможных путях и способах изменения проявлений агрессивности, что, несомненно, востребовано нашей жизнью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в обзоре представлены современные данные по изучению генетико-физиологических механизмов агрессивности как общебиологического феномена. Рассмотрены подходы к экспериментальному исследованию механизмов внутривидового агрессивного поведения у лабораторных животных, приведены данные по влиянию генетических факторов на агрессивное поведение человека. На примере исследования механизмов регуляции одной из наиболее сложных и универсальных форм социального поведения – внутривидовой агрессии – рассмотрены различные подходы к ее изучению, использовавшиеся ранее, и перспективы, открывающиеся с появлением новых молекулярных подходов, таких как секвенирование транскриптома. Развитие протеомных и метаболомных технологий позволит исследовать механизмы регуляции сложных форм поведения уже на более высоком уровне организации молекулярно-генетической информации. В целом можно заключить, что основой такого сложного биологического феномена, как агрессивное поведение, является многофакторная система, включающая, с одной стороны, несколько генетических ансамблей, связанных между собой многочисленными регуляторными взаимодействиями, на основе которых выстроена еще более сложная нейроэндокринная физиологическая регуляторная система. С другой стороны, большую роль играет внешний средовой контекст, который включает как физические, так и социально-биологические характеристики среды существования особей и популяций. Причем эндогенные и средовые детерминанты взаимосвязаны и взаимообусловлены. Исследование такого рода систем требует координированных усилий биологов, физиологов, генетиков, специалистов по системному анализу и биоинформатике.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-14-00269.

ЛИТЕРАТУРА

Августинович Д.Ф., Алексеенко О.В., Бакштановская И.В., Корякина Л.А., Липина Т.В., Тендитник М.В., Бондарь Н.П., Коваленко И.Л., Кудрявцева Н.Н. Динамические изменения серотонергической и дофаминергической активности мозга в процессе развития тревожной депрессии: экспериментальное исследование // Усп. физиол. наук. 2004. Т. 35. № 4. С. 19–40.
Avgustinovich D.F., Alekseyenko O.V., Bakshtanovskaya I.V., Koriakina L.A., Lipina T.V., Tenditnik M.V., Bondar N.P., Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N. Dynamic changes of brain serotonergic and dopaminergic activities during development of anxious depression: Experimental Study // Usp. Fiziol. Nauk. 2004. V. 35. No. 4. P. 19–40. (In Russian).

Вальдман А.В., Пошивалов В.П. Фармакологическая регуляция внутривидового поведения. Л.: Медицина, 1984. 208 с.
Valdman A.V., Poshivalov V.P. Pharmacological regulation of intraspecies behavior. Leningrad: Meditsina, 1984. 208 p. (In Russian).

Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М.: МГУ, 1960.
Krushinskiy L.V. Formation of animal behavior in norm and pathology. Moscow: Moscow State Univ., 1960. (Russian).

Кудрявцева Н.Н. Практика исследования агонистического поведения: Методы, методология, интерпретации: Монография. Новосибирск: Изд-во Наука-центр, 2012. С. 1–172. (In Russian).
Kudryavtseva N.N. Practical research of agonistic behavior: Methods, methodology, interpretation. Novosibirsk: Nauka-tsentr Press, 2012. P. 1–172. (In Russian).

Кудрявцева Н.Н., Бакштановская И.В. Нейрохимический контроль агрессии и подчинения // Журн. высш. нервн. деят-сти. 1991. Т. 41. № 5. С. 459–466.
Kudriavtseva N.N. Bakshtanovskaya I.V. The neurochemical control of aggression and submission // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im I.P. Pavlova. 1991. V. 41. No. 5. P. 459–466. (In Russian).

Кудрявцева Н.Н., Ситников А.П. Влияние генотипа на формирование агрессивного и подчиненного поведения у мышей // Журн. высш. нервн. деят-сти. 1987. Т. 37. № 2. С. 287–292.
Kudryavtseva N.N., Sitnikov A.P. Influence of the genotype on the formation of aggressive and submissive behavior in mice // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im I.P. Pavlova. 1987. V. 37. No. 2. P. 287–292. (In Russian).

Кудрявцева Н.Н., Филипенко М.Л., Бакштановская И.В., Августинович Д.Ф., Алексеенко О.В., Бейлина А.Г. Изменение экспрессии моноаминергических генов под влиянием повторного опыта агонистических взаимодействий: от поведения к гену // Генетика. 2004. Т. 40. № 6. С. 732–748.
Kudriavtseva N.N., Filipenko M.L., Bakshtanovskaia I.V., Avgustinovich D.F., Alekseenko O.V., Beĭlina A.G. Changes in the expression of monoaminergic genes under the influence of repeated experience of agonistic interactions: from behavior to gene // Genetika. 2004. V. 40. No. 6. P. 732–748. (In Russian).

Куликов А.В., Попова Н.К. Изучение генетического контроля спонтанной агрессивности у мышей // Генетика. 1980. Т. 15. С. 526–531.
Kulikov A.V., Popova N.K. Study of the genetic control of «spontaneous» aggressiveness in mice // Genetika. 1980. V. 15. P. 526–531. (In Russian).

Лоренц К. Агрессия (так называемое «зло»). Пер. с нем. Г.Ф. Швейника. М.: «Прогресс», «Универс», 1994. С. 257.
Lorenz K. On Aggression. Translation from German by G.F. Shveinik. M.: «Progress», «Univers», 1994. P. 257. (In Russian).

Плюснина И.З., Соловьева М.Ю. Внутривидовая межсамцовая агрессия у ручных и агрессивных серых крыс // Журн. высш. нервн. деят-сти. 2010. Т. 60. № 2. С. 175–183.
Pliusnina I.Z., Solov'eva M.Ju. Intraspecific intermale aggression in tame and aggressive Norway rats // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im I.P. Pavlova. 2010. V. 60. No. 2. P. 175–183. (In Russian).

Плюснина И.З., Оськина И.Н. Онтогенез поведения и отбор на доместикацию диких серых крыс // Современные концепции эволюционной генетики. Новосибирск, 2000. С. 341–350.
Plyusnina I.Z., Oskina I.N. Ontogenesis of behavior and selection for domestication of wild gray rats // Sovremennie Konceptsii Evolutsionnoi Genetiki. 2000. P. 341–350. (In Russian).

Пошивалов В.П. Экспериментальная психофармакология агрессивного поведения. Л.: Наука, 1986. 175 с.
Poshivalov V.P. Experimental psychopharmacology of aggressive behavior. Leningrad: Nauka, 1986. 175 p. (In Russian).

Тендитник М.В., Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В., Кудрявцева Н.Н., Труфакин В.А. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов иммунокомпетентных органов мышей под влиянием хронического социального стресса // Рос. физиол. журн. 2004. Т. 90. № 12. С. 1522–1529.
Tenditnik M.V., Shurlygina A.V., Mel'nikova E.V., Kudriavtseva N.N., Trufakin V.A. Effect of chronic psychoemotional stress on the subpopulation spectrum of T-lymphocytes in immunocompetent organs in male mice // Ross. Fiziol. Zh. im I.M. Sechenova. 2004. V. 90. No. 12. P. 1522–1529. (In Russian).

Филипенко М.Л., Бейлина А.Г., Алексеенко О.В., Долгов В.В., Кудрявцева Н.Н. Увеличение экспрессии генов серотонинового транспортера и моноаминооксидазы А в мозге самцов мышей под влиянием повторного опыта социальных поражений // Биохимия. 2002. Т. 67. № 4. С. 451–455.
Filipenko M.L., Beilina A.G., Alekseyenko O.V., Dolgov V.V., Kudryavtseva N.N. Increase in expression of brain serotonin transporter and monoamine oxidase A genes induced by repeated experience of social

defeats in male mice // Biokhimiya. 2002. V. 67. No. 4. P. 451–455. (In Russian).

Филипенко М.Л., Бейлина А.Г., Алексеенко О.В., Кудрявцева Н.Н. Изменение экспрессии гена катехол-О-метилтрансферазы под влиянием агонистических взаимодействий // Докл. РАН. 2001. Т. 377. С. 411–414.
Filipenko M.L., Beilina A.G., Alekseyenko O.V., Kudryavtseva N.N. Changes in the expression of catechol-O-methyltransferase gene under the influence of agonistic interactions in male mice // Dokl. Akad. Nauk. 2001. V. 377. P. 411–414. (In Russian).

Хайнд Р. Поведение животных. М.: Мир, 1975. 855 с.
Hind R.A. Animal behavior. Moskow: Mir, 1975. 855 p. (In Russian).

Abrahams B.S., Kwok M.C., Trinh E., Budaghzadeh S., Hossain S.M., Simpson E.M. Pathological aggression in «fierce» mice corrected by human nuclear receptor 2E1 // J. Neurosci. 2005. V. 25. P. 6263–6270.

Albert F.W., Shchepina O., Winter C., Römpler H., Teupser D., Palme R., Ceglarek U., Kratzsch J., Sohr R., Trut L.N., Thiery J., Morgenstern R., Plyusnina I.Z., Schöneberg T., Pääbo S. Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans // Horm. Behav. 2008. V. 53. P. 413–421.

Anholt R.R.H., Mackay T.F.C. Genetics of aggression // Annu. Rev. Genet. 2012. V. 46. P. 145–164.

Annen Y., Fujita O. Intermale aggression in rats selected for emotional reactivity and their reciprocal F1 and F2 hybrids // Aggressive. Behav. 1983. V. 10. P. 11–19.

Archer J. The influence of testosterone on human aggression // Br. J. Psychol. 1991. V. 82. Pt 1. P. 1–28.

Archer J., Birring S.S., Wu F.C.W. The association between testosterone and aggression among young men: Empirical findings and a meta-analysis // Aggressive Behav. 1998. V. 24. P. 411–420.

Archer T., Oscar-Berman M., Blum K., Gold M. Neurogenetics and epigenetics in impulsive behaviour: impact on reward circuitry // J. Genet. Syndr. Gene Ther. 2012. V. 3. No. 3. P. 1000115.

Assal F., Alarcon M., Solomon E.C., Masterman D., Geschwind D.H., Cummings J.L. Association of the serotonin transporter and receptor gene polymorphisms in neuropsychiatric symptoms in Alzheimer disease // Arch. Neurol. 2004. V. 61. P. 1249–1253.

Auboeuf D., Vidal H. The use of the reverse transcription-competitive polymerase chain reaction to investigate the *in vivo* regulation of gene expression in small tissue samples // Analyt. Biochem. 1997. V. 245. V. 2. P. 141–148.

Aylor D.L., Valdar W., Foulds-Mathes W., Buus R.J., Verdugo R.A. *et al*. Genetic analysis of complex traits in the emerging Collaborative Cross // Genome Res. 2011. V. 21. P. 1213–1222.

Azaryan A.V., Clock B.J., Rosenberger J.G., Cox B.M. Transient upregulation of mu opioid receptor mRNA levels in nucleus accumbens during chronic cocaine administration // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1998. V. 76. P. 278–283.

Baron R.A., Richardson D.R., Human Aggression. Plenum Press, N.Y., London, 1994.

Barratt E.B. Anxiety and impulsiveness: toward a neuropsychological model // Current Trends in Theory and Research / Ed. C.D. Spielberger. N.Y.: Acad. Press, 1972. P. 195–222.

Beilharz R.G., Beilharz V.C. Observations on fighting behaviour of male mice (*Mus misculus* L.) // Z. Tierpsych. 1975. V. 339. P. 126–140.

Belyaev D.K., Borodin P.M. The influence of stress on variation and its role in evolution // Biol. Zentbl. 1982. V. 100. P. 705.

Bell R., Hobson H. Effects of (−)-pindolol and SDZ 216-525 on social and agonistic behavior in mice // Pharmacol. Biochem. Behav. 1993. V. 46. P. 873–880.

Benus R.F., Bohus B., Koolhaas J.M., van Oortmerssen G.A. Behavioural differences between artificially selected aggressive and non-aggressive mice: response to apomorphine // Behav. Brain Res. 1991. V. 43. No. 2. P. 203–208.

Blanchard D.C., Blanchard R.J. What can animal aggression research tell us about human aggression? // Hormones Behav. 2003. V. 44. No. 3. P. 171–177.

Bondar N.P., Boyarskikh U.A., Kovalenko I.L., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Molecular implications of repeated aggression: Th, Dat1, Snca and Bdnf gene expression in the VTA of victorious male mice // PLoS One. 2009. V. 4. No. 1. P. e4190.

Bondy B., Buettner A., Zill P. Genetics of suicide // Mol. Psychiatry. 2006. V. 11. P. 336–351.

Book A.S., Starzyk K.B., Quinsey V.L. The relationship between testosterone and aggression: a meta-analysis // Aggressive Violent Behav. 2001. V. 6. P. 579–599.

Boyarskikh U.A., Bondar N.P., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Downregulation of serotonergic genes expression in the raphe nuclei of midbrain under chronic social defeat stress in male mice // Mol. Neurobiology. 2013. V. 48. No. 1. P. 13–21.

Brain P.F. The adaptiveness of house mouse aggression // House Mouse Aggression. A Model for Understanding the Evolution of Social Behavior / Eds P.F. Brain, D. Mainardi, S. Parmigiani. Harwood Acad. Publ., 1979. P. 1–21.

Brain P.F., Nowell N.W. Some behavioral and endocrine relationships in adult male laboratory mice subjected to open and aggression tests // Physiol. Behav. 1969. V. 4. P. 945–947.

Brunner H.G., Nelen M., Breakefield X.O., Ropers H.H., van Oost B.A. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A // Science. 1993. V. 262. P. 578–580.

Cairns R.B., McCombie D.J., Hood K.E. A developmental-genetic analysis of aggressive behavior in mice: Behavioral outcomes // J. Comp. Psychol. 1983. V. 97. P. 69–89.

Cases O., Seif I., Grimsby J., Gaspar P., Chen K. *et al*. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA // Science 1995. V. 268. P. 1763–1766.

Caspi A., McClay J., Moffitt T.E., Mill J., Martin J. *et al*. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children // Science. 2002. V. 297. P. 851–854.

Caspi A., Sugden K., Moffitt T.E., Taylor A., Craig I.W. *et al*. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene // Science. 2003. V. 301. P. 386–389.

Charpentier J. Analysis and measurement of aggressive behav-

iour in mice // Aggress. Behav. / Eds S. Garattini, E.B. Sigg. Amsterdam: Excepta Medica, 1969. P. 86–100.

Chattopadhyay N., Kher R., Godbole M. Inexpensive SDS/phenol method for RNA extraction from tissues // Biotechniques. 1993. V. 15. P. 24–26.

Chen T.J.H., Blum K., Mathews D., Fisher L., Schnautz N., Braverman E.R., Schoolfield J., Downs B.W., Comings D.E. Are dopaminergic genes involved in a predisposition to pathological aggression? Hypothesizing the importance of «super normal controls» in psychiatric genetic research of complex behavioral disorders // Med. Hypoth. 2005. V. 65. P. 703–707.

Chiavegatto S., Dawson V.L., Mamounas L.A., Koliatsos V.E., Dawson T.M., Nelson R.J. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 1277–1281.

Churchill G.A., Airey D.C., Allayee H., Angel J.M., Attie A.D. *et al*. The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits // Nature. 2004. V. 36. P. 1133–1137.

Ciaranello R.D., Lipsky A., Axelrod J. Association between fighting behavior and catecholamine biosynthetic enzyme activity in two inbred mouse sublines // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 3006–3008.

Craig D., Hart D.J., Carson R., McIlroy S.P., Passmore A.P. Allelic variation at the A218C tryptophan hydroxylase polymorphism influences agitation and aggression in Alzheimer's disease // Neurosci. Lett. 2004b. V. 363. P. 199–202.

Craig D., Hart D.J., McCool K., McIlroy S.P., Passmore A.P. Apolipoprotein E e4 allele influences aggressive behaviour in Alzheimer's disease // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2004a. V. 75. P. 1327–1330.

Craig I.W., Halton K.E. Genetics of human aggressive behavior // Hum. Genet. 2009. V. 126. P. 101–113.

Crespo J.A., Manzanares J., Oliva J.M., Corchero J., Palomo T. *et al*. Extinction of cocaine self-administration produces a differential time-related regulation of proenkephalin gene expression in rat brain // Neuropsychopharmacology. 2001. V. 25. P. 185–194.

Devoino L.V., Alperina E.L., Kudryavtseva N.N., Popova N.K. Immune responses in male mice with aggressive and submissive behavior patterns: strain differences // Brain. Behav. Immun. 1993. V. 7. P. 91–96.

Dow H.C., Kreibich A.S., Kaercher K.A., Sankoorikal G.M., Pauley E.D. *et al*. Genetic dissection of intermale aggressive behavior in BALB/cJ and A/J mice // Genes Brain Behav. 2011. V. 10. P. 57–68.

Drent P.J., van Oers K., van Noordwijk A.J. Realized heritability of personalities in the great tit (*Parus major*) // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. P. 45–51.

Edwards A.C., Dodge K.A., Latendresse S.J., Lansford J.E., Bates J.E. *et al*. MAOA-uVNTR and early physical discipline interact to influence delinquent behavior // J. Child Psychol. Psychiatry. 2010. V. 51. P. 679–687.

Eldakar O.T., Gallup A.C. The group-level consequences of sexual conflict in multigroup populations // PLoS One. 2011. V. 6. P. e26451.

Eleftheriou B.E., Bailey D.W., Denenberg V.H. Genetic analysis of fighting behavior in mice // Physiol. Behav. 1974. V. 13. No. 6. P. 773–777.

Fairbanks L.A., Newman T.K., Bailey J.N., Jorgensen M.J., Breidenthal S.E. *et al*. Genetic contributions to social impulsivity and aggressiveness in vervet monkeys // Biol. Psychiatry. 2004. V. 55. P. 642–647.

Ferrari P.F., Palanza P., Parmigiani S., Rodgers R.J. Interindividual variability in Swiss male mice: relationship between social factors, aggression and anxiety // Physiol. Behav. 1998. V. 63. No. 5. P. 821–827.

Filipenko M.L., Alekseyenko O.V., Beilina A.G., Kamynina T.P., Kudryavtseva N.N. Increase of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter mRNA levels in ventral tegmental area of male mice under influence of repeated aggression experience // Mol. Brain Res. 2001. V. 96. No. 1/2. P. 77–81.

Filipenko M.L., Beilina A.G., Alekseyenko O.V., Dolgov V.V., Kudryavtseva N.N. Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice // Neurosci. Lett. 2002a. V. 321. No. 1/2. P. 25–28.

Filipenko M.L., Beylina A.G., Alekseyenko O.V., Timofeeva O.A., Avgustinovich D.F., Kudryavtseva N.N. Association between the brain COMT gene expression and aggressive experience in daily agonistic confrontations in male mice // Stress: Neural, Endocrine and Molecular Studies / Eds R. McCarty, G. Aguelera, E. Sabban, R. Kvetnansky. Taylor & Francis, London; N.Y., 2002b. P. 157–161.

Gammie S.C., Auger A.P., Jessen H.M., Vanzo R.J., Awad T.A., Stevenson S.A. Altered gene expression in mice selected for high maternal aggression // Genes Brain Behav. 2007. V. 6. P. 432–443.

Gammie S.C., Nelson R.J. Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice // J. Neurosci. 1999. V. 19. P. 8027–8035.

Gatewood J.D., Wills A., Shetty S., Xu J., Arnold A.P., Burgoyne P.S., Rissman E.F. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice // J. Neurosci. 2006. V. 26. P. 2335–2342.

Gogos J.A., Morgan M., Luine V., Santha M., Ogawa S., Pfaff D., Karayiorgou M. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 9991–9996.

Goldsmith J.F., Brain P.F., Benton D. Effects of the duration of individual or group housing on behavioural and adrenocortical reactivity in male mice // Physiol. Behav. 1978. V. 21. No. 5. P. 757–760.

Goloshchapov A.V., Filipenko M.L., Bondar N.P., Kudryavtseva N.N., Van Ree J.M. Decrease of κ-opioid receptor mRNA level in ventral tegmental area of male mice after repeated experience of aggression // Mol. Brain Res. 2005. V. 135. P. 290–292.

Gonda X., Fountoulakis K.N., Csukly G., Bagdy G., Pap D. *et al.* Interaction of 5-HTTLPR genotype and unipolar major depression in the emergence of aggressive/hostile traits // J. Affect. Disord. 2011. V. 132. P. 432–437.

Guillot P.V., Chapouthier G. Intermale aggression and dark/light preference in ten inbred mouse strains // Behav. Brain Sci. 1996. V. 77. P. 211–213.

Hahn M.E., Haber S.B. The inheritance of agonistic behavior in male mice: A diallel analysis // Aggressive Behav. 1982.

V. 8. No. 1. P. 19–38.

Haller J., Bakos N., Rodriguiz R.M., Caron M.G., Wetsel W.C. *et al*. Behavioral responses to social stress in noradrenaline transporter knockout mice: effects on social behavior and depression // Brain Res. Bull. 2002. V. 58. P. 279–284.

Haller J., Kruk M.R. Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models // Neurosci. Biobehav. Rev. 2006. V. 30. No. 3. P. 292–303.

Hohmann S., Becker K., Fellinger J., Banaschewski T., Schmidt M.H. *et al*. Evidence for epistasis between the 5-HTTLPR and the dopamine D4 receptor polymorphisms in externalizing behavior among 15-year-olds // J. Neural Transm. 2009. V. 16. P. 1621–1629.

Hollingworth P., Hamshere M.L., Moskvina V., Dowzell K., Moore P.J. *et al*. Four components describe behavioral symptoms in 1,120 individuals with late-onset Alzheimer's disease // J. Am. Geriatr. Soc. 2006. V. 54. P. 1348–1354.

Holmes A., Murphy D.L., Crawley J.N. Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter // Psychopharmacology. 2002. V. 161. P. 160–167.

Huang Y.Y., Cate S.P., Battistuzzi C., Oquendo M.A., Brent D., Mann J.J. An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences // Neuropsychopharmacology. 2004. V. 29. P. 1498–1505.

Hudziak J.J., van Beijsterveldt C.E., Bartels M., Rietveld M.J., Rettew D.C. *et al*. Individual differences in aggression: genetic analyses by age, gender, and informant in 3-, 7-, and 10-year-old Dutch twins // Behav. Genet. 2003. V. 33. P. 575–589.

Isogai Y., Si S., Pont-Lezica L., Tan T., Kapoor V. *et al.* Molecular organization of vomeronasal chemoreception // Nature. 2011. V. 478. P. 241–245.

Karere G.M., Kinnally E.L., Sanchez J.N., Famula T.R., Lyons L.A., Capitanio J.P. What is an «adverse» environment? Interactions of rearing experiences and MAOA genotype in rhesus monkeys // Biol. Psychiatry. 2009. V. 65. P. 770–777.

Kessler S., Elliott G.R., Orenberg E.K., Barchas J.D. A genetic analysis of aggressive behavior in two strains of mice // Behav. Gen. 1977. V. 7. No. 4. P. 313–321.

Kim D.K., Tolliver T.J., Huang S.J., Martin B.J., Andrews A.M. *et al*. Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter // Neuropharmacology. 2005. V. 49. P. 798–810.

Kim-Cohen J., Caspi A., Taylor A., Williams B., Newcombe R. *et al*. MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis // Mol. Psychiatry. 2006. V. 11. P. 903–913.

Kinnally E.L., Huang Y.Y., Haverly R., Burke A.K., Galfalvy H. *et al*. Parental care moderates the influence of MAOA-uVNTR genotype and childhood stressors on trait impulsivity and aggression in adult women // Psychiatr. Genet. 2009. V. 19. P. 126–133.

Kotler M., Barak P., Cohen H., Averbuch I.E., Grinshpoon A. *et al.* Homicidal behavior in schizophrenia associated with a genetic polymorphism determining low catechol-O-methyltransferase (COMT) activity // Am. J. Med. Genet. 1999. V. 88. P. 628–633.

Kudryavtseva N.N. The sensory contact model for the study of aggressive and submissive behaviors in male mice // Aggressive Behav. 1991. V. 17. No. 5. P. 285–291.

Kudryavtseva N.N. The psychopathology of repeated aggression: a neurobiological aspect // Perspectives on the Psychology of Aggression / Ed. J.P. Morgan. N.Y.: Nova Science Publ., Inc. 2006. Chapter 2. P. 35–64.

Kudryavtseva N.N. Sensory Contact Model: Protocol, Control, Applications, Horizons in Neuroscience Research / Eds A. Costa, E. Villalba. NOVA Sci. Publ. Inc., N.Y., 2011. V. 3. Chapter 4. P. 81–100.

Kudryavtseva N.N., Avgustinovich D.F. Behavioral and physiological markers of experimental depression induced by social conflicts (DISC) // Aggressive Behav. 1998. V. 24. P. 271–286.

Kudryavtseva N.N., Bondar N.P., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. *Snca* and *Bdnf* gene expression in the VTA and raphe nuclei of midbrain in chronically victorious and defeated male mice // PLoS One. 2010. V. 5. No. 11. P. e14089.

Lagerspetz K.M.J. Aggression and aggressiveness in laboratory mice // Aggressive Behaviour / Eds S. Garattini, E.B. Sigg. Amsterdam: Escerpta Medica, 1969. P. 77–85.

Lagerspetz K.M.J., Lagerspetz K.Y.H. Genetic determination of aggressive behavior // The Genetics of Behavior / Ed. van J.H.F. Abeelen. 1974. P. 321–346.

LaPlant Q., Vialou V., Covington H.E. 3rd, Dumitriu D., Feng J., Warren B.L., Maze I., Dietz D.M., Watts E.L., Iñiguez S.D., Koo J.W., Mouzon E., Renthal W., Hollis F., Wang H., Noonan M.A., Ren Y., Eisch A.J., Bolaños C.A., Kabbaj M., Xiao G., Neve R.L., Hurd Y.L., Oosting R.S., Fan G., Morrison J.H., Nestler E.J. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens // Nat. Neurosci. 2010. V. 13. No. 9. P. 1137–1143.

Lazary J., Lazary A., Gonda X., Benko A., Molnar E. *et al*. New evidence for the association of the serotonin transporter gene (SLC6A4) haplotypes, threatening life events, and depressive phenotype // Biol. Psychiatry. 2008. V. 64. P. 498–504.

Le Roy I., Pothion S., Mortaud S., Chabert C., Nicolas L. *et al*. Loss of aggression, after transfer onto a C57BL/6J background, in mice carrying a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene // Behav. Genet. 2000. V. 30. P. 367–373.

Leshner A.T., Korn S.J., Mixon J.F., Rosenthal C., Besser A.K. Effect of corticosterone on submissiveness in mice: some temporal and theoretical considerations // Physiol. Behav. 1980. V. 24. No. 2. P. 283–288.

Lewejohann L., Kloke V., Heiming R.S., Jansen F., Kaiser S. *et al*. Social status and day-to-day behaviour of male serotonin transporter knockout mice // Behav. Brain Res. 2010. V. 211. P. 220–228.

Lindenfors P., Tullberg B.S. Evolutionary aspects of aggression: the importance of sexual selection // Adv. Genet. 2011. V. 75. P. 7–22.

Malki K., Pain O., Du Rietz E. *et al*. Genes and gene networks implicated in aggression related behaviour // Neurogenetics. 2014. V. 15. No. 4. P. 255–266.

Manuck S.B., Flory J.D., Ferrell R.E., Mann J.J., Muldoon M.F. A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity // Psychiatry Res. 2000. V. 95. P. 9–23.

Marino M.D., Bourdélat-Parks B.N., Cameron Liles L., Weinshenker D. Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice // Behav. Brain Res. 2005. V. 161. No. 2. P. 197–203.

Mathes W.F., Aylor D.L., Miller D.R., Churchill G.A., Chesler E.J. *et al*. Architecture of energy balance traits in emerging lines of the Collaborative Cross // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2011. V. 300. P. E1124–1134.

Maxson S.C., Didier-Erickson A., Ogawa S. The Y chromosome, social signals, and offense in mice // Behav. Neural. Biol. 1989. V. 52. P. 251–259.

May M.E., Lightfoot D.A., Srour A., Kowalchuk R.K., Kennedy C.H. Association between serotonin transporter polymorphisms and problem behavior in adult males with intellectual disabilities // Brain Res. 2010. V. 1357. P. 97–103.

McGowan P.O., Sasaki A., D'Alessio A.C. *et al*. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse // Nat. Neurosci. 2009. V. 12. P. 342–348.

Miczek K.A., de Almeida R.M., Kravitz E.A., Rissman E.F., de Boer S.F., Raine A. Neurobiology of escalated aggression and violence // J. Neurosci. 2007. V. 27. No. 44. P. 11803–11806.

Miczek K.A., Fish E.W., De Bold J.F., De Almeida R.M. Social and neural determinants of aggressive behavior: pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ-aminobutyric acid systems // Psychopharmacology. 2002. V. 163. P. 434–458.

Moffitt T.E., Caspi A., Rutter M., Silva P.A. Sex Differences in Antisocial Behaviour: Conduct Disorder, Delinquency and Violence in the Dunedin Longitudinal Study. Cambridge: Univ. Press, Cambridge, 2001.

Moyer K.E. Kinds of aggression and their physiological basis // Commun. Behav. Biol. 1968. V. 2. P. 65–87.

Mucignat-Caretta C. The rodent accessory olfactory system // J. Comp. Physiol. A. 2010. V. 196. P. 767–777.

Murphy D.L., Fox M.A., Timpano K.R., Moya P., Ren-Patterson R. *et al*. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems // Neuropharmacology. 2008. V. 55. P. 932–960.

Nedic G., Nikolac M., Sviglin K.N., Muck-Seler D., Borovecki F., Pivac N. Association study of a functional catechol-O-methyltransferase (COMT) Val108/158Met polymorphism and suicide attempts in patients with alcohol dependence // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2011. V. 14. P. 377–388.

Nelson R.J., Chiavegatto S. Aggression in knockout mice // ILAR J. 2000. V. 41. No. 3. P. 153–162.

Nelson R.J., Demas G.E., Huang P.L., Fishman M.C., Dawson V.L. *et al*. Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase // Nature. 1995. V. 378. P. 383–386.

Nelson R.J., Trainor B.C. Neural mechanisms of aggression // Nat. Rev. Neurosci. 2007. V. 8. P. 536–546.

Newman T.K., Syagailo Y.V., Barr C.S., Wendland J.R., Champoux M. *et al*. Monoamine oxidase A gene promoter variation and rearing experience influences aggressive behavior in rhesus monkeys // Biol. Psychiatry. 2005. V. 57. P. 167–172.

Nichols C.D., Garcia E.E., Sanders-Bush E. Dynamic changes in prefrontal cortex gene expression following lysergic acid diethylamide administration // Mol. Brain Res. 2003. V. 111. P. 182–188.

Nikulina E.M., Hammer R.P. Jr, Miczek K.A., Kream R.M. Social defeat stress increases expression of mu-opioid receptor mRNA in rat ventral tegmental area // Neuroreport. 1999. V. 10. No. 14. P. 3015–3019.

Nolan K.A., Volavka J., Czobor P., Cseh A., Lachman H., *et al*. Suicidal behavior in patients with schizophrenia is related to COMT polymorphism // Psychiatr. Genet. 2000. V. 10. P. 117–124.

Packer C., Collins D.A., Sindimwo A., Goodall J. Reproductive constraints on aggressive competition in female baboons // Nature. 1995. V. 373. P. 60–63.

Parmigiani S., Palanza P., Rodgers J., Ferrari P.F. Selection, evolution of behavior and animal models of behavioral neuroscience // Neurosci. Biobehav. Rev. 1999. V. 23. No. 7. P. 957–970.

Parruti G., Ambrosini G., Sallese M., De Blasi A. Molecular cloning, functional expression and mRNA analysis of human beta-adrenergic receptor kinase 2 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 190. No. 2. P. 475–481.

Pavlov K.A., Chistiakov D.A., Chekhonin V.P. Genetic determinants of aggression and impulsivity in humans // J. Appl. Genetics. 2012. V. 53. P. 61–82.

Plyusnina I.Z., Oskina I.N., Tibeikina M.A., Popova N.K. Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human // Behav. Genet. 2008. V. 39. No. 2. P. 202–212.

Pinsonneault J.K., Papp A.C., Sadée W. Allelic mRNA expression of X-linked monoamine oxidase a (MAOA) in human brain: dissection of epigenetic and genetic factors // Hum. Mol. Genet. 2006. V. 15. P. 2636–2649.

Popova N.K., Naumenko V.S., Plyusnina I.Z., Kulikov A.V. Reduction in 5-HT1A receptor density, 5-HT1A mRNA expression, and functional correlates for 5-HT1A receptors in genetically defined aggressive rats // J. Neurosci. Res. 2005. V. 80. No. 2. P. 286–292.

Popova N.K., Skrinskaya Y.A., Amstislavskaya T.G., Vishnivetskaya G.B., Seif I., de Meier E. Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A // Neurosci. Behav. Physiol. 2001. V. 31. P. 597–602.

Pritchard A.L., Harris J., Pritchard C.W., Coates J., Haque S. *et al*. Role of 5HT2A and 5HT2C polymorphisms in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2008. V. 29. P. 341–347.

Pritchard A.L., Pritchard C.W., Bentham P., Lendon C.L. Role of serotonin transporter polymorphisms in the behavioural and psychological symptoms in probable Alzheimer disease patients // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2007. V. 24. P. 201–206.

Provençal N., Suderman M.J., Guillemin C., Vitaro F., Côté S.M., Hallett M., Tremblay R.E., Szyf M. Association of childhood chronic physical aggression with a DNA methylation signature in adult human T cells // PLoS One. 2014. V. 9. No. 4. P. e89839.

Raab A., Danzer R., Michaud B., Mormede P., Tagzouti K., Simon H., Le Moal M. Behavioral, physiological and

immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident – intruder dyads of male rats // Physiol. Behav. 1986. V. 36. No. 2. P. 226–228.

Rao J.S., Rapoport S.I., Kim H.W. Decreased GRK3 but not GRK2 expression in frontal cortex from bipolar disorder patients // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2009. V. 12. No. 6. P. 851–860.

Rodriguiz R.M., Chu R., Caron M.G., Wetsel W.C. Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice // Behav. Brain Res. 2004. V. 148. P. 185–198.

Roubertoux P.L., Carlier M. Differences between CBA/H and NZB mice on intermale aggression. II Maternal effects // Behav. Genet. 1988. V. 18. No. 2. P. 175–184.

Roy A., Sarchiopone M., Carli V. Gene-environment interaction and suicidal behavior // J. Psychiatr. Pract. 2009. V. 15. P. 282–288.

Saetre P., Strandberg E., Sundgren P.E., Pettersson U., Jazin E., Bergstrom T.F. The genetic contribution to canine personality // Genes Brain Behav. 2006. V. 5. P. 240–248.

Sallinen J., Haapalinna A., Viitamaa T., Kobilka B.K., Scheinin M. Adrenergic alpha2c receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice // J. Neurosci. 1998. V. 18. P. 3035–3042.

Sandnabba N.K. Effects of selective breeding for high and low aggressiveness and of fighting experience on odor discrimination in mice // Aggressive Behav. 1986. V. 12. No. 5. P. 359–366.

Saudou F., Amara D.A., Dierich A., LeMeur M., Ramboz S. *et al*. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor // Science. 1994. V. 265. P. 1875–1878.

Scholtens J., van de Poll N.E. Behavioral consequences of agonistic experiences in the male S3 (Tryon Maze Dull) rat // Aggressive Behav. 1987. V. 13. P. 213–222.

Scott J.P. Agonistic behavior of mice and rats: a review // Am. Zool. 1966. V. 6. No. 4. P. 683–701.

Scott A.L., Bortolato M., Chen K., Shih J.C. Novel monoamine oxidase A knockout mice with human-like spontaneous mutation // Neuroreport. 2008. V. 19. P. 739–743.

Scott J.P. Theoretical issues concerning the origin and causes of fighting // The Physiology of Aggression and Defeat / Eds B.E. Eleftheriou, J.P. Scott. Plenum N.Y., 1971. P. 11–42.

Selmanoff M.K., Maxson S.C., Ginsburg B.E. Chromosomal determinants of intermale aggressive behavior in inbred mice // Behav. Genet. 1976. V. 6. P. 53–69.

Smagin D.A., Boyarskikh U.A., Bondar N.P., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Reduction of serotonergic gene expression in the midbrain raphe nuclei under positive fighting experience // Adv. Biosci. Biotechnol.: Special Issue on Gene Expression. 2013. V. 4. 10B. P. 36–44.

Southwick C.H. Genetic and environmental variables influencing animal aggression // Animal Aggression: Selected Readings / Ed. C.H. Southwick. N.Y., Van Nastrand Reinhold., 1970. P. 213–229.

Southwick C.H., Clark L.H. Interstrains differences in aggressive behavior and exploratory activity of inbred mice // Commun. Behav. Biol. 1968. V. 1. P. 49–59.

Spangler R., Ho A., Zhou Y., Maggos C.E., Yuferov V., Kreek M.J. Regulation of kappa opioid receptor mRNA in the rat brain by «binge» pattern cocaine administration and correlation with preprodynorphin mRNA // Brain Res. Mol. Brain Res. 1996. V. 38. P. 71–76.

Stewart A.D., Manning A., Batty J. Effects of Y-chromosome variants on male behaviour of the mouse Mus musculus // Genet. Res. Cambridge, 1980. V. 35. P. 261–268.

Strous R.D., Bark N., Parsia S.S., Volavka J., Lachman H.M. Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior // Psychiatry Res. 1997. V. 69. P. 71–77.

Sweet R.A., Pollock B.G., Sukonick D.L., Mulsant B.H., Rosen J., Klunk W.E., Kastango K.B., DeKosky S.T., Ferrell R.E. The 5-HTTPR polymorphism confers liability to a combined phenotype of psychotic and aggressive behavior in Alzheimer disease // Int. Psychogeriatr. 2001. V. 13. P. 401–409.

Takahashi A., Quadros I.M., de Almeida R.M., Miczek K.A. Brain serotonin receptors and transporters: initiation versus termination of escalated aggression // Psychopharmacology. 2011. V. 213. P. 183–212.

Tirindelli R., Dibattista M., Pifferi S., Menini A. From pheromones to behavior // Physiol. Rev. 2009. V. 89. P. 921–956.

Tosato S., Bonetto C., Di Forti M., Collier D., Cristofalo D. *et al*. Effect of COMT genotype on aggressive behaviour in a community cohort of schizophrenic patients // Neurosci. Lett. 2011. V. 495. P. 17–21.

Tsai S.J., Hong C.J., Liou Y.J. Recent molecular genetic studies and methodological issues in suicide research // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2011. V. 35. P. 809–817.

van der Flier W.M., Staekenborg S., Pijnenburg Y.A., Gillissen F., Romkes R. *et al*. Apolipoprotein E genotype influences presence and severity of delusions and aggressive behavior in Alzheimer disease // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2007. V. 23. P. 42–46.

Van Oortmerssen G.A., Bakker T.C. Artificial selection for short and long attack latencies in wild Mus musculus domesticus // Behav. Genet. 1981. V. 11. No. 2. P. 115–126.

Veenema A.H., Bredewold R., Neumann I.D. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: Link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity // Psychoneuroendocrinology. 2007. V. 32. P. 437–450.

Veenema A.H., Sijtsma B., Koolhaas J.M., de Kloet E.R. The stress response to sensory contact in mice: genotype effect of the stimulus animal // Psychoneuroendocrinology. 2005. V. 30. No. 6. P. 550–557.

Walsh R.N., Cummins R.A. The open-field test: a critical review // Physiol. Bull. 1976. V. 83. No. 3. P. 482–504.

Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A. *et al*. Epigenetic programming by maternal behavior // Nat. Neurosci. 2004. V. 7. P. 847–854.

Weder N., Yang B.Z., Douglas-Palumberi H., Massey J., Krystal J.H. *et al*. MAOA genotype, maltreatment, and aggressive behavior: the changing impact of genotype at varying levels of trauma // Biol. Psychiatry. 2009. V. 65. P. 417–424.

Wilson M., Daly M. Competitiveness, risk-taking, and violence – the Young Male Syndrome // Ethol Sociobiol. 1985. V. 6. P. 59–73.

Wong H., Anderson W.D., Cheng T., Riabowol K.T. Monitoring mRNA expression by Polymerase Chain Reaction:

the «primer-dropping» method // Anal. Biochem. 1994. V. 223. P. 251–258.

Yeh M.T., Coccaro E.F., Jacobson K.C. Multivariate behavior genetic analyses of aggressive behavior subtypes // Behav. Genet. 2010. V. 40. P. 603–617.

Young K.A., Berry M.L., Mahaffey C.L., Saionz J.R., Hawes N.L. *et al*. Fierce: a new mouse deletion of Nr2e1; violent behaviour and ocular abnormalities are background-dependent // Behav. Brain Res. 2002a. V. 132. P. 145–158.

Young S.E., Smolen A., Corley R.P., Krauter K.S., DeFries J.C. *et al*. Dopamine transporter polymorphism associated with externalizing behavior problems in children // Am. J. Med. Genet. 2002b. V. 114. P. 144–149.

AGGRESSIVE BEHAVIOR: GENETIC AND PHYSIOLOGICAL MECHANISMS

N.N. Kudryavtseva[1], A.L. Markel[1, 2], Yu.L. Orlov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: orlov@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The paper presents a review of modern literature on the genetic determination of intraspecific aggressive behavior, one of the most complex and universal forms of social behavior in animals on different rungs of the evolutionary ladder. We consider the existing experimental approaches and new opportunities based on new molecular technologies. The comprehensive approach allows investigation of evolutionary, genetic, and biological roots of aggression and its manifestations under different environmental and social factors, as well as genetic predispositions. The high social importance of the problem is underlined. The review considers the phenomenology of aggression, and mechanisms stimulating and preventing it. It is supposed that the main social mechanism deterring aggression in a population is the dominant–subordinate relationships. Neurobiological determinants of aggression and the role of hereditary factors in the control of aggressive behavior in animals and humans are considered. By the example of neurochemical brain changes in male mice exposed to repeated aggression in daily agonistic interactions, we present the research model "from behavior to the gene". It is noted in the discussion, that the same genes that influence aggressiveness in human were revealed in experimental studies in animals of different strains as well as in knock-out and transgenic animals. They include genes for receptors and enzymes of biosynthesis and catabolism of serotonin and catecholamine. In conclusion, we consider the potential of transcriptome studies and problems of the epigenetic regulation of aggressive behavior.

Key words: genetics, behavior, aggression, laboratory animals, gene expression.

УДК 57.02

РАЗРАБОТКА ИСКУССТВЕННЫХ КОГНИТИВНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МОДЕЛЕЙ МОЗГА ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

© 2014 г. **Н.И. Путинцев[1], О.В. Вишневский[1, 2], Е.Е. Витяев[1, 3]**

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия, e-mail: putintsevnikita@gmail.com;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт математики им. С.Л. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 30 сентября 2014 г. Принята к публикации 5 ноября 2014 г.

Несмотря на непрерывный рост наших знаний о функционировании нервной системы, тонких особенностях нейроанатомии и нейрофизиологии различных видов животных, до сих пор до конца не ясны базовые механизмы, обеспечивающие такие их когнитивные свойства, как способность обучаться, использовать память, распознавать образы и познавать окружающий мир. В статье рассмотрены методы создания устройств, моделирующих работу мозга и решающих когнитивные навигационные задачи, такие как распознавание образов, формирование маршрута, нахождение целевого места. Описываются как гибридные системы (гиброты), в которых маневрирующим устройством управляют сети живых нейронов, так и системы, в которых таким устройством управляют компьютерные программы, основанные на различных моделях мозга или его отделов (аниматы). Рассмотрены два основных вида гибридных систем: те, в которых робот подключается к мозгу живого организма, например крысы, и те, в которых информация снимается с выделенных из организма нейронов или нейронов, культивируемых на электродной матрице, регистрирующей их электрические потенциалы. Среди компьютерных подходов, моделирующих функционирование нервной системы живых организмов, уделено внимание, в первую очередь, семейству устройств «Darwin», основанных на теории отбора нейрональных групп (theory of neuronal group selection, TNGS). Кроме того, рассмотрены работы, в которых аниматы решают навигационные задачи под управлением различных моделей гиппокампа крысы, основанных на методах «когнитивного графа», «клеток обзора», «клеток места» и «клеток опыта». Эти подходы дают исследователям новые инструменты для анализа основных принципов взаимодействия нейронов между собой и окружающим миром, обеспечивающих высшие функции мозга.

Ключевые слова: гиброты, аниматы, нейронные сети, когнитивные функции.

ВВЕДЕНИЕ

Хотя отдельный нейрон изучен довольно глубоко, все еще неизвестно, каким образом многочисленные нейроны, объединяясь в сети и взаимодействуя между собой, дают живым организмам способность обучаться, использовать память, распознавать образы и познавать окружающий мир. Для исследования основных принципов взаимодействия нейронов между собой и окружающим миром, а также того, как это взаимодействие обеспечивает высшие функции мозга, необходимы такие методы, которые позволяют регистрировать и управлять этими взаимодействиями в условиях, приближенных к условиям реального живого организма в ес-

тественной среде. В данной статье приводится обзор таких методов, а также результатов их применения.

Одним из перспективных подходов в данном направлении является создание гибридных систем (DeMarse *et al*., 2001) или гибротов (hybrots). В таких системах живые нейроны взаимодействуют с некоторой электромеханической машиной через специальный интерфейс. В общем случае гибридные системы устроены следующим образом. К живым нейронам присоединяется некоторое устройство, снимающее с них сигналы (чаще всего электрические). Эти сигналы кодируются и передаются в качестве управляющих на реальное электромеханическое устройство либо на виртуальную симуляцию. Данное устройство обладает сенсорами, которые отражают состояние как окружающей среды, так и самого устройства. Сигналы с сенсоров декодируются и передаются в качестве обратной связи на нейроны. Также в некоторых системах может присутствовать стимулирующий сигнал, использующийся в качестве подкрепления или наказания в том случае, если перед системой в рамках эксперимента поставлена некоторая цель. Существует два основных вида гибридных систем: те, в которых робот подключается к мозгу живого организма, например крысы (Song, Giszter, 2011), и те, в которых информация снимается с выделенных из организма нейронов или нейронов, культивируемых на электродной матрице, регистрирующей их электрические потенциалы (Potter, DeMarse, 2001). Первый тип систем обеспечивает нейронам более естественное окружение, что положительно сказывается на их работоспособности. Второй тип систем позволяет более детально отслеживать взаимодействия внутри нейронной сети.

Другим важным подходом является создание компьютерных аниматов (Edelman, 2007; Milford, Wyeth, 2010), основанных на моделях мозга или его отдельных районов. В этом случае создается некоторое электромеханическое или виртуальное устройство, управляемое компьютерной моделью нервной системы живого организма. Модель обычно основана на некоторых биологических теориях и результатах исследования реальных организмов. Полученное устройство помещается в некоторую физическую или виртуальную среду и выполняет в рамках эксперимента определенные задания, например преследование объекта, распознавание образов, нахождение целевого места. Основным преимуществом такого подхода являются возможность контроля и наблюдения за работой исследуемой системы на всех уровнях, а также отсутствие необходимости работы с живыми тканями. Основной недостаток – это сложность моделирования нервной системы и неполнота знаний о механизмах ее функционирования.

ГИБРОТЫ (Hybrots)

Гиброты – это системы, в которых происходит взаимодействие между живыми нейронами и машиной, играющей роль искусственного тела. Использование таких систем позволяет полностью контролировать обмен информацией между телом и мозгом, а также ограничивать сложность этого обмена. Гиброты создаются с целью изучения принципов работы нейронных сетей, их адаптационных свойств и межнейронного взаимодействия.

Примером гибридной системы первого типа может служить работа Song и Giszter (2011), в которой описана система, состоящая из живой крысы и робота (рис. 1). Для эксперимента использовались крысы, отобранные по специальным критериям (хорошая нервная активность, устойчивое мотивированное движение). В двигательную кору мозга выбранным животным были вживлены тетроды из нихромовых про-

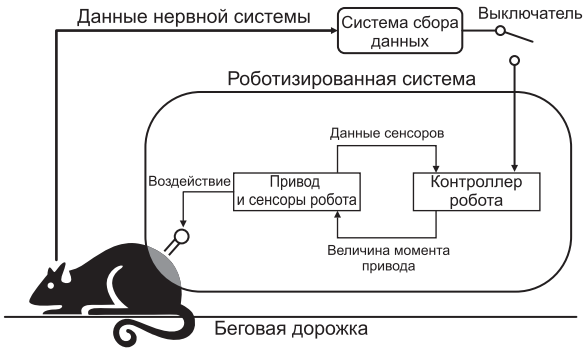


Рис. 1. Общая схема гибридной системы на базе живой крысы.

Fig. 1. Schematic view of the hybrid system based on a living rat.

водов, а в область таза вживлялись имплантаты для закрепления робота. С тетродов снимался сигнал в интервале частот от 300 Гц до 7,5 кГц. В процессе эксперимента детектировались всплески активности нейронов – спайки (spikes). В качестве управляющего сигнала для робота использовалось суммарное число спайков на заданном интервале времени (100 мс).

Эксперимент проводился в три стадии. Во время первой стадии крыса ходила по беговой дорожке с отключенным роботом, во время второй робот давил на таз крысы, затрудняя ее движение. Выбиралась точка, находящаяся ниже нормального положения спины крысы. Сила давления робота регулировалась в зависимости от степени отклонения реального положения спины крысы от этой точки. На третьей стадии эксперимента включался мозго-машинный интерфейс и на контроллер робота подавался управляющий сигнал с мозга крысы. Контроллер использовал его для вычисления значения некоторой виртуальной силы, стремящейся вернуть таз крысы в нормальное положение. Далее эта сила складывалась с виртуальной силой робота, стремящейся переместить таз крысы в неудобное положение. Результирующая сила физически прилагалась к тазу крысы. Обратная связь осуществлялась через ощущения крысы.

В ходе эксперимента было показано, что крыса смогла научиться использовать мозго-машинный интерфейс для компенсации воздействия робота и поддержания положения таза ближе к естественному. Адаптация происходила в среднем за 100–200 шагов крысы. При этом нервная активность увеличивалась при включенном роботе. А при включении мозг-машинного интерфейса увеличивалась положительная корреляция между сигналами от мозга крысы и силой давления робота.

В то же время была отмечена крайняя нестабильность эксперимента, когда смещение электрода на несколько микрон могло приводить как к забыванию крысой навыков управления роботом, так и к потере крысой способности обучаться такому управлению. Авторы связывают это наблюдение с существованием особых участков в исследуемом районе коры мозга крысы, попадание в которые и обеспечивает ее способность к управлению роботом. Выход за границы такого участка приводит к потере крысой такой способности.

Одними из первых работ, в которых нейроны культивируются на электродной матрице и подключаются к роботу, являются работы Поттера, Вагенара и ДеМарсе. В работе DeMarse с соавт. (2001) была разработана структура гибридной системы и поставлены первые эксперименты.

Система состояла из живых нейронов на электродной матрице, стимулирующей системы, и анимата (компьютерной симуляции животного в некоторой среде). Нейроны, полученные из коры головного мозга эмбрионов крысы, культивировались на электродной матрице с 60 электродами (Potter, DeMarse, 2001). Через некоторое время эти нейроны начинали производить спонтанные всплески активности.

Для получения управляющих команд регистрировались последовательности пиков активности нейронной сети – спайков на интервале в 200 мс. С помощью процедуры кластеризации среди полученных последовательностей спайков в течение 8 мин выделялись наиболее характерные паттерны, которые привязывались к определенным командам управления аниматом. Движения анимата с помощью обратной связи сопровождались стимуляцией нейронной сети по одному из пяти каналов: один отвечал за столкновение с препятствиями, остальные четыре – за направление движения анимата. Стимуляция проводилась импульсами с амплитудой 400 мВ и длиной в 200 мс. Целью эксперимента являлась демонстрация возможности создания гибридной системы управления аниматом с помощью живой сети нейронов в реальном времени. Было показано существование устойчивых характерных паттернов активности сети. При этом включение обратной связи приводило к появлению новых типов паттернов активности.

В своей следующей работе, эта группа исследователей предложила модель гиброта, обладающего целенаправленным поведением (Shkolnik, 2003). Целью гиброта было достижение целевого объекта и занятие оптимальной дистанции до него. Информация о расстоянии до цели и ее расположении определялась на основании данных с 14 дальномеров, установленных на его теле. Разница напряжений на его левом и правом двигателях устанавливалась в зависимости от

того, с какой стороны гиброта находилась цель. Скорость движения гиброта определялась общей усредненной активностью сети на интервале в 100 мс. Информация о расстоянии от гиброта до цели подавалась на нейронную сеть с помощью двух электродов спаренными импульсами. При этом межимпульсный интервал (МИ) пары сигналов, подаваемых на электроды, линейно зависел от расстояния до цели, а очередность подачи сигнала на первый и второй электроды зависела от того, с какой стороны от гиброта располагалась цель. Для управления гибротом авторы использовали интересную особенность нейронной сети (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что в том случае, когда МИ минимален, т. е. импульсы на оба электрода приходят одновременно, это вызывает максимальное возбуждение нейронной сети. Если разница между импульсами составляла от 50 до 300 мс, то наблюдалась пониженная активность сети, которая может быть объяснена, например, попаданием импульсов на рефрактерные фазы нейронов сети. Минимум активности сети попадал на МИ в 150 мс. С увеличением МИ активность сети выходила на постоянный средний уровень. Таким образом, максимальная скорость движения гиброта вперед устанавливалась при активности нейронной сети, соответствующей МИ от 300 до 1000 мс (большое расстояние до целевого объекта). Уменьшение скорости происходило при приближении к цели, уменьшении МИ и снижении активности сети. Минимальная активность сети (МИ = 150 мс), соответствующая оптимальному расстоянию до цели, полностью выключала двигатели гиброта, что соответствовало состоянию достижения цели. В случае проскакивания гиброта мимо цели значение МИ устанавливалось в интервале от 0 до 150 мс, и гиброт начинал двигаться к мишени задним ходом, достигая оптимального расстояния. Если мишень меняла свое расположение, то гиброт снова достигал оптимального расстояния до нее, согласно описанному нами алгоритму.

Затем модель гиброта была усложнена. Ему была поставлена задача: управляя манипулятором, закрасить квадрат размером 12 × 12 см в центре 30 × 30 см рабочего пространства (Bakkum *et al*., 2004, 2007). Эксперимент про-

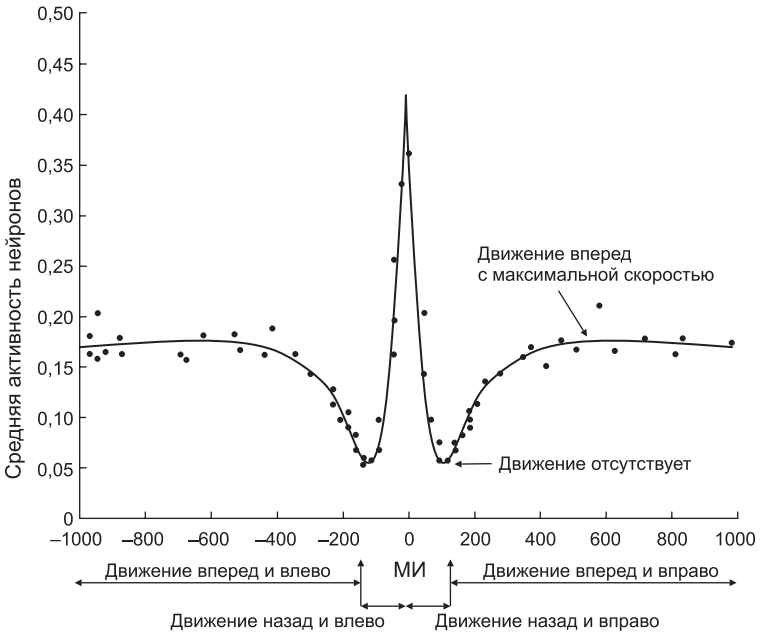


Рис. 2. Использование межимпульсного интервала для управления гибротом.

Если цель находилась справа от гиброта, сигнал подавался сначала на первый, а потом на второй электроды (величина МИ была положительной). Если слева – наоборот (величина МИ была отрицательной).

Fig. 2. Robot control with inter-stimulus intervals.

When the target was located to the right of the animat, the signal was delivered from the first electrode and then from the second (positive ISI), and vice versa: when the target was to the left of the animat, the ISI was negative.

водился следующим образом. Электродная матрица (8 × 8) проецировалась на рабочее пространство с требуемым квадратом в центре и формировала пространство координат. Затем для текущего состояния всей нейронной сети на интервале 4 с рассчитывался «центр масс» нейрональной активности (популяционный вектор). Полученный «центр масс» проецировался на рисунок в рабочей области. Именно к этой точке двигалась рука манипулятора с ручкой, проводя линию. Обратная связь осуществлялась следующим образом. С помощью камеры, закрепленной над рабочим пространством, система получала информацию об освещенности (закрашенности) рисунка с разрешением 8 × 8 пикселей. Затем эта информация сравнивалась с эталонным рисунком, содержащим искомый черный квадрат, и рассчитывалась матрица ошибки, т. е. степень отклонения от эталона в отдельных пикселях. После чего матрица ошибки использовалась для стимуляции нейронной сети. Чем выше была величина локального отклонения от эталона, тем с большей интенсивностью проводилась стимуляция соответствующего участка матрицы. В качестве стимуляции использовались бифазные импульсы длиной 400 мкс и напряжением 500 мВ (Wagenaar *et al*., 2004). Было показано, что гиброт уверенно решал поставленную задачу и закрашивал рабочую область рисунка, практически не выходя за его границы.

В работах Kudoh с соавт. (2006, 2011), Hayashi с соавт. (2010, 2011) предложен несколько другой подход к построению гибридной системы. Вместо того чтобы обучать управлению гибротом саму нейронную сеть, модифицируя связи между нейронами, авторы применили гибкую самоподстраивающуюся компьютерную систему, основанную на методе нечеткой логики (fuzzy logic), для выделения характерных пространственно-временных паттернов возбуждения сети, возникающих в ответ на специфические сенсорные воздействия. При этом сеть как бы «вспоминает» состояния своей активности, уже сформированные ранее в течение ее «жизненного опыта».

Гиброт состоял из 64-электродной матрицы MED64 (Alpha MED Science), на которой культивировались гиппокампальные нейроны крысы, и механической тележки с двумя двигателями и 6 датчиками расстояния. Связь тележки с нейронной сетью осуществлялась с помощью компьютерного интерфейса на базе модуля нечеткой логики (МНЛ). Задачей гиброта было пройти по прямому коридору, избегая столкновения с его стенками.

Обучение системы проводилось следующим образом (рис. 3). На первом этапе авторы разделили поверхность нейронной сети на 8 равных участков по 8 электродов в каждом. С этих участков считывалась усредненная нейронная активность на интервалах по 50 мс. Затем, в зависимости от максимального и минимального значений активности, для каждого участка нейронной сети были определены состояния высокой (High, 3/4 от максимального значения) и низкой (Low, 1/4 от максимального значения) активностей. После чего вектор из 8 значений активностей участков сети подавался на вход модуля нечеткой логики. Этот модуль содержал в себе набор из 256 правил, условия выполнения которых формулировались в терминах состояний high/low. Причем на первом этапе каждому правилу приписывалось предопределенное значение его вклада в скорость левого и правого двигателей. Для каждого из правил оценивалась степень его соответствия полученному вектору значений активностей нейронной сети. Скорости соответствующих двигателей

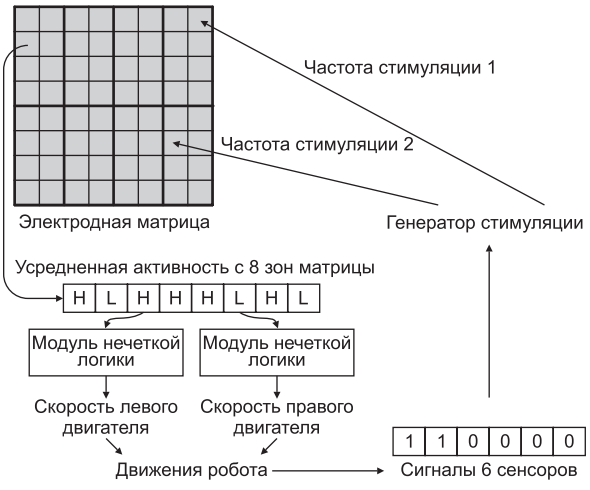


Рис. 3. Архитектура гибридной системы на базе сети нейронов и модуля нечеткой логики.

Fig. 3. Architecture of a hybrid system based on neural networks and fuzzy logic.

определялись как средневзвешенные значения вкладов каждого правила со степенями соответствия в качестве весов. В качестве входа нейронной сети выступали 2 электрода, на которые через модуль нечеткой логики подавался сигнал от датчиков расстояния. Сила сигнала зависела от того, с какой стороны от тележки располагалось препятствие (стенка коридора). На этапе обучения, в течение 150 итераций, вклады правил МНЛ в скорость двигателей подгонялись под обучающий сигнал, в качестве которого выступала желаемая скорость двигателей в зависимости от расположения препятствия. После этого гиброт считался обученным, запускался в коридор, и проводилась оценка его работы. Авторы показали, что предложенный ими подход в 16 из 20 попыток позволял гиброту достигать конца коридора, избежав столкновений со стенками.

В одной из недавних работ (Tessadori *et al*., 2012) для «наказания» нейронной сети и соответствующего подкрепления сенсорных сигналов авторы подавали на нейронную сеть особый вид стимуляции (tetanic stimulation), ускоряющий формирование нейронных связей (Jimbo *et al*., 1999; Chiappalone *et al*., 2008). Кроме того, они разделили живую нейронную сеть на модули, симулируя тем самым модульную структуру реального мозга (Pan *et al*., 2010; Boucsein *et al*., 2011). В работе Tessadori с соавт. (2012) в качестве управляемого устройства авторы использовали как механическую тележку с двумя двигателями и 6 датчиками расстояния, так и компьютерный автомат, перемещающийся в виртуальной среде по сходной модели. Нейронная сеть выращивалась на подложке, имеющей два больших отделения, соединенных несколькими узкими связями. Таким образом, вся сеть делилась на две зоны ответственности, соответствующие правой и левой сторонам робота. Задачей гиброта было избегание столкновений с препятствиями при перемещении по круглой арене.

Гиброт функционировал следующим образом. На первом этапе в каждом из отделений сети выбиралось по несколько электродов, обладающих наибольшей спонтанной нейрональной активностью, не синхронизированной с активностями других электродов. Эти электроды в дальнейшем рассматривались в качестве входных (сенсорных). Именно на них подавался линейно преобразованный усредненный сигнал с датчиков расстояния с соответствующей стороны робота. Затем в каждом отделении отбирались электроды, наилучшим образом отвечающие на возбуждение сенсорных электродов своего отделения и не реагирующие на стимуляцию сенсорных электродов другого отделения. Эти электроды в дальнейшем рассматривались как выходные (моторные). Спайковая активность моторных электродов с каждой стороны усреднялась и линейно преобразовывалась в скорость вращения соответствующего двигателя. В случае столкновения с препятствием на сенсорные электроды соответствующей стороны подавался особый вид тетанической стимуляции (tetanic stimulation, 2с импульсы 20 Гц частоты), ускоряющий формирование нейронных связей (рис. 4).

Авторы показали, что построенный ими гиброт способен в определенной степени выполнять поставленную задачу перемещения по арене, не сталкиваясь с препятствиями как в реальной, так и в виртуальной среде. Причем использование в качестве подкрепления тетанической стимуляции значительно снижало количество столкновений с препятствиями. В ходе аналогичного эксперимента, в котором нейронная сеть выращивалась без разделения на два отделения, было показано, что такое разделение действительно необходимо для лучшего решения задачи. В то же время авторы отмечают, что количество столкновений с препятствием было достаточно большим. Можно предположить, что возбуждение моторных нейронов было обусловлено в большей степени внутренней спонтанной активностью сети, а не информационными сигналами, приходящими от сенсорных нейронов.

Как видно, архитектура гибридных систем постоянно улучшается и совершенствуется. Разрабатываются новые методы культивирования нейронов, стимуляции, кодирования и декодирования сигналов. Однако все еще не удалось поставить эксперимент, в котором нейроны, выращенные на электродной матрице, действительно эффективно справлялись бы с поставленной перед ними в рамках эксперимента задачей, взаимодействовали с окружающим миром и обучались.

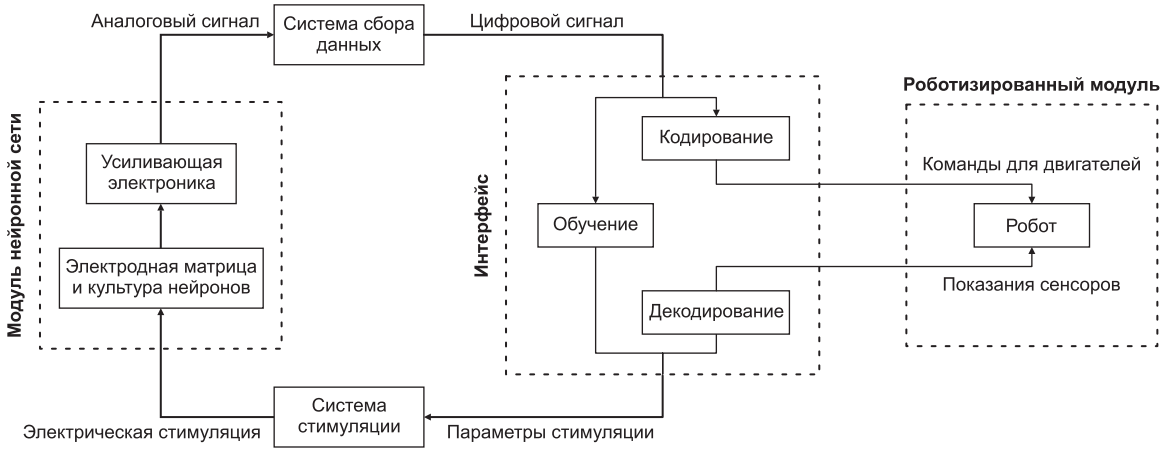


Рис. 4. Архитектура гибридной системы с использованием системы стимуляции.

Fig. 4. Architecture of a hybrid system with a stimulation subsystem.

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ПОДХОДЫ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ КОГНИТИВНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

От рассмотрения когнитивных систем, использующих сети живых нейронов, перейдем к описанию компьютерных подходов, моделирующих функционирование нервной системы живых организмов (как правило, млекопитающих) или ее отдельных структур. Одним из наиболее ярких представителей этого направления является семейство устройств «Darwin», основанных на теории отбора нейрональных групп (theory of neuronal group selection, TNGS), предложенной Г.М. Эделманом (Edelman, 1978, 1987, 1989, 1992). В основе этой теории лежит предположение о том, что сформированные в мозгу нейрональные контуры, обладающие некоторыми функциональными свойствами, ценность которых априори не известна, конкурируют друг с другом за участие в определении поведения системы путем усиления связей с другими контурами в мозгу и внутри себя. Базовыми единицами выбора в TNGS являются нейронные группы, наборы из десятков или сотен нейронов, которые тесно связаны между собой при помощи синапсов (щелевых контактов или любого другого способа межклеточного взаимодействия), формируя кооперативные функциональные единицы. Согласно этой теории, нейрональные группы получают сенсорные сигналы от окружающей среды и соревнуются путем формирования и разрыва связей с другими нейронами, с тем чтобы стабилизировать свою структуру и усилить свое влияние прямо или косвенно на выход моторных путей, чтобы в конечном счете определять поведение организма.

Теория постулирует, что первоначальные нейрональные группы формируются на ранних этапах развития организма, а их структура в значительной степени генетически детерминирована. В результате чего молодой организм получает определенный набор встроенных реакций (безусловных рефлексов) и соответствующую структуру его нервной системы, при помощи которых он должен быть способен начать исследование своего окружения. В ходе такой исследовательской деятельности спонтанная и вызванная сенсорами активность нейрональных групп приводит к формированию различных моделей поведения. Некоторые из этих моделей представляют для организма ценность, приводя к удовлетворению основных потребностей (таких как потребность в питье и пище), другие являются нейтральными, третьи приводят к болевым ощущениям. Именно эти последствия конкретных моделей поведения в ходе получения дальнейшего опыта приводят к конкурентному отбору соответствующих нейрональных групп и формированию вторичного репертуара нейрональных структур, более точно и быстро генерирующего различные виды поведенческих реакций, эффективность которых была неоднократно доказана в типичных ситуациях.

Такой отбор обеспечивается комбинацией локальных и глобальных механизмов. Локально сила синаптических связей между нейронами постоянно меняется под воздействием таких процессов, как долгосрочная потенциация и подавление, вызванных скоординированной активностью пресинаптических и постсинаптических нейронов. Эти процессы влияют на количество высвобожденного трансмиттера, силу его влияния на постсинаптические рецепторы и другие аспекты синаптической передачи. В то же время эти процессы чувствительны только к локальной нейронной активности и не могут сами по себе чувствовать направление, в котором необходимо произвести изменение для обеспечения достоверного восприятия и эффективного поведения, полезного для организма в целом. Согласно TNGS, эта глобальная функция обеспечивается врожденными механизмами, называемыми системами ценностей, которые позволяют нервной системе предсказывать последствия определенной модели поведения на организм. Системы ценностей производят неспецифичные, модулирующие воздействия (живым аналогом такой системы может служить, например, дофаминовая система) на остальной мозг, смещая результат локальных изменений синаптических перестроек в направлении, требуемом для удовлетворения целевых потребностей.

При этом поведение, вызывающее позитивную реакцию у системы ценностей, перестраивает синаптические связи таким образом, чтобы вероятность такого поведения увеличивалась в сходной обстановке (и, соответственно, при сходных значениях синаптических входов). Поведение, вызывающее негативную оценку, перестраивает синаптические передачи в противоположную сторону. Существование простых врожденных систем ценностей, основанных на базовых потребностях, позволяет мозгу развиваться на основе собственного опыта, совершенствуя в том числе и свою систему ценностей.

Кроме обучения на основе системы ценностей и отбора на уровне индивидуальных нейронов и нейрональных групп, TNGS предполагает еще один механизм для координации текущих реакций и синаптических изменений как между колонками внутри одного отдела, так и между разными отделами мозга, обеспечивающими различные модальности восприятия (зрительный, слуховой, осязательный и т. д). Эта система обратных связей и рекурсий, названная авторами повторным входом (reentry), обеспечивает генерацию отображений (mapping), при помощи которых реакции нейронных групп согласуются друг с другом и взаимосвязями между объектами и событиями внешнего мира. Таким образом, если группам, соединенным при помощи повторного входа, случается реагировать нескоординированным образом на определенную ситуацию, механизм обучения на основе ценностей будет действовать не только в сторону ослабления связей между этими группами, но также и в сторону ослабления их вклада в моторный сигнал. По мнению авторов, система обучения на основе ценностей, работающая на большом количестве связей повторного входа, может обеспечить достаточно точную категоризацию стимулов в соответствии с их естественной иерархией и взаимозависимостями.

Важной особенностью когнитивных систем, согласно TNGS, является вырожденность (degeneracy) нейронных групп и связей между ними, когда одному входному сигналу (или группе сигналов) соответствует несколько нейронных групп, с разной силой отвечающих как на сам сигнал, так и на его подобия. Именно это свойство в значительной степени обеспечивает мозгу гибкость восприятия внешних сигналов и ответа на них.

Системы, построенные на базе TNGS, как правило, включают в себя десятки и сотни тысяч нейронов, соединенных с помощью миллионов связей и моделируют реальную нейрональную активность на интервалах до 100 мс.

Семейство роботов Darwin, разрабатываемое в The Neurosciences Institute in La Jolla, California с 1981 г. по 2007 г., включает в себя 11 поколений. Первые три из них (1981–1990 гг.) были компьютерными симуляциями (Reeke *et al*., 1990b). Именно на них исследователи отработали основные принципы применения TNGS для обеспечения взаимодействия анимата с окружающей средой. Darwin III (Reeke *et al*., 1990a, b) обладал «нервной системой», состоящей из 50 взаимосвязанных сетей из 50 000 нейронов, соединенных через 620 000 синаптических связей. Анимат включал в себя

две сенсорные системы – зрительную и тактильную, а также две моторные системы – для достижения рукой объекта и его «ощупывания». С помощью зрительной системы он мог исследовать виртуальный мир, а с помощью виртуальной руки он мог дотрагиваться до объектов в виртуальной среде и перемещать их. Виртуальный мир представлял собой поле размером 32 × 32 клетки. В поле находился движущийся случайным образом объект произвольной формы и текстуры размером примерно 10 × 12 клеток. Глаз анимата обладал полем зрения размером 16 × 16 клеток. Зрительный отдел анимата был оснащен системой ценностей, которая давала положительное подкрепление в том случае, если глаз получал больше света в ходе случайного блуждания взгляда анимата по виртуальному миру. Таким образом, глаз анимата приобретал склонность к выделению светового центра масс зрительного объекта и перемещению взгляда в его направлении. После проведения нескольких сотен попыток анализа зрительного поля и перемещения взгляда глаз анимата мог уверенно отслеживать перемещение объекта в зрительном поле виртуального мира. Кроме того, зрительная система анимата содержала нейроны, избирательно реагирующие на вертикальные, горизонтальные и наклонные полосы, что позволяло ему оценивать форму и внутренний рисунок анализируемого объекта.

Виртуальная рука позволяла Darwin III «ощупывать» объекты виртуального мира, оценивая их форму и степень «шероховатости». Анимат обладал системой ценностей, дававшей положительное подкрепление при любом касании объекта рукой. Он мог видеть свою руку и целевой визуальный объект. При этом изначально анимат не умел целенаправленно его достигать, а обладал набором нейрональных групп, функционирование которых приводило к перемещению руки в ту или иную область виртуального мира. Таким образом, на первых этапах тренировки рука анимата перемещалась совершенно случайно, в зависимости от спонтанной активности нейрональных групп. В том случае, когда это приводило к касанию объекта, система подкрепления усиливала связи между нейронами и группами нейронов, обеспечивающими такую активность. После чего запускался процесс «ощупывания» и анимат получал информацию о степени «шероховатости» анализируемого объекта. Таким образом, в ходе серии попыток (~ 300) анимат обучался достигать визуального объекта по наиболее оптимальному маршруту.

В ходе исследования виртуального мира, на основе системы повторных входов (reentry), анимат самостоятельно формировал систему классификации находящихся в нем объектов, выявляя взаимозависимости между их визуальными и тактильными особенностями.

Для того чтобы использовать предложенную модель в дальнейших роботах семейства Darwin, функционирующих уже не в виртуальной, а в реальной среде, авторы заложили в Darwin III аналог безусловного рефлекса на заданный раздражитель. В частности, если анимат наблюдал «шероховатый» и «полосатый» объект, то он автоматически выталкивал его за границы области виртуального мира.

Их следующая разработка – Darwin IV (Edelman *et al*., 1992) – функционировал уже в реальном мире – комнате с черными стенами. Авторы использовали модель синтетической нервной системы, сходную с той, которая была применена ими в Darwin III. Анимат представлял собой тележку, оснащенную двумя двигателями, подвижной видеокамерой, магнитным захватом и датчиком электропроводности. На первом этапе его задачей было научиться находить и следовать за световым пятном, перемещающимся по полу. На втором этапе, после того как анимат научился уверенно отслеживать зрительные объекты, на полу были размещены кубики красного и синего цвета. Причем синие блоки имели высокую электропроводность, а красные – низкую. Кубики с высокой электропроводностью рассматривались как «невкусные». На этом этапе задачей анимата было захватить «вкусные» кубики, обладающие низкой электропроводностью, и доставить их к базе – месту, обозначенному зеленым квадратом. Причем степень электропроводности анимат мог определить, только достигнув базы. В том случае, если кубик оказывался «вкусным», анимат получал положительное подкрепление от системы ценностей, если «невкусным» – отрицательное. Поскольку изначально анимат не знал, что «вкусными» являются только красные кубики, на первом этапе он приносил к базе кубики обоих цветов. Но после серии попыток,

вознаграждений и наказаний он начинал уверенно ассоциировать красный цвет с «вкусными», а синий с «невкусными» кубиками. Теперь он полностью игнорировал синие кубики, а к базе приносил только красные.

Задачей Darwin V (Almassy *et al*., 1998) было научиться распознавать «вкусные» и «невкусные» кубики, отмеченные не цветом, а рисунком (полоски и кружки соответственно). При этом «вкус» кубика (его электропроводность) анимат мог определять сразу после его захвата. В случае захвата «вкусного» кубика анимат получал положительное подкрепление от системы ценностей, поворачивался на 90 º, отпускал кубик, поворачивался обратно и продолжал движение. В случае захвата «невкусного» кубика анимат получал отрицательное подкрепление, отпускал кубик и поворачивался на 90 º от него. После серии попыток, вознаграждений и наказаний он начинал уверенно подбирать полосатые кубики, полностью игнорируя кубики с кружками. Важно отметить, что в ходе перемещения анимат видел кубики и рисунок на них под разными углами зрения, что не помешало ему уверенно решать поставленную задачу.

В модели Darwin VI (Krichmar *et al*., 2000) была показана важность последовательности предъявления анимату распознаваемых паттернов сигналов и частоты их появления в процессе его обучения. Авторы на ранней стадии функционирования анимата демонстрировали ему в основном кубики с рисунком одного типа (рис. 5). В результате анимат потерял способность учиться распознавать кубики с другим типом рисунка. Авторы объясняют это тем, что все нейронные группы и все связи внутри и между ними у такого «переобученного» анимата уже задействованы для распознавания рисунка первого типа и не могут быть освобождены и использованы затем для распознавания рисунков второго типа.

В Darwin VII (Krichmar, Edelman, 2002) авторы показали возможность мультимодального обучения анимата. В этом эксперименте кубики не только были помечены двумя типами рисунка, но и издавали звуки высокой и низкой частот. При этом полосатые кубики с повышенной частотой звука обладали низкой электропроводностью и воспринимались аниматом как «вкусные», а кубики с кружками и издающие низкочастотный звук – как «невкусные». После серии экспериментов анимат научился поднимать только «вкусные» кубики, игнорируя «невкусные». Авторами был продемонстрирован ряд интересных особенностей связей между зрительным и слуховым отделами синтетического мозга, возникших в ходе обучения.

В Darwin VIII (Seth *et al*., 2004c) анимат оперировал в комнате, на стенах которой были размещены рисунки в форме ромбов и квадратов красного или зеленого цветов (рис. 6). Причем, в отличие от предыдущей работы, признаки формы и цвета были независимы. В том случае, когда анимат приближался к одному из рисунков на близкое заданное расстояние, звучал сигнал одной из двух частот («позитивная» и «негативная»). Когда анимат слышал звук «позитивной» частоты, его система ценностей производила

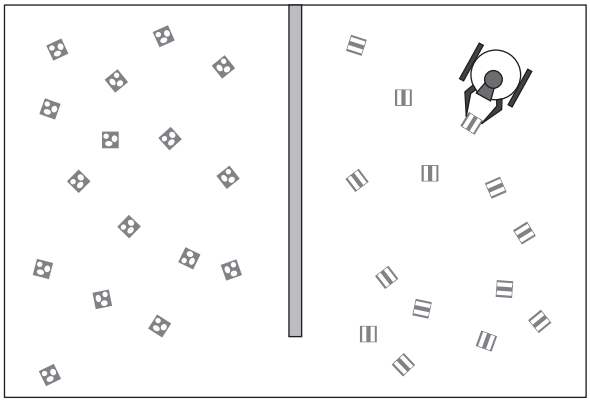


Рис. 5. Darwin VI в процессе обучения.

Fig. 5. Darwin VI is learning.

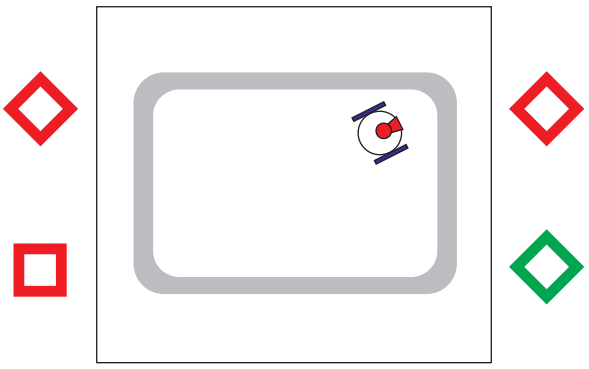


Рис. 6. Darwin VIII – классификация стимулов.

Fig. 6. Darwin VIII – stimulus classification.

положительное подкрепление ассоциативных межнейронных связей. Если звучал «негативный» сигнал, анимат получал отрицательное подкрепление. В ходе серии экспериментов «позитивный» звуковой сигнал случайным образом привязывался к одному из четырех типов рисунка (например красный ромб), а три остальных типа (зеленый ромб, красный и зеленый квадраты) – к «негативному» звуковому сигналу. Было показано, что после 10–15 мин изучения рисунков и маневрирования анимат обучался уверенно находить «позитивный» рисунок из любого места комнаты и двигаться к нему, избегая приближения к рисункам других типов. Авторы продемонстрировали, что главную роль в этом играет процесс повторного вхождения (reentry) – скоординированного возбуждения нейрональных групп, входящих в функционально различные зоны «мозга» анимата.

В Darwin IX (Seth *et al*., 2004a, b) анимат был оснащен механическими «вибриссами» – чувствительными усами, реагирующими на прикосновение и подающими сигнал в специализированную зону «мозга» анимата, которая, по мнению авторов, должна была моделировать соматосенсорную кору крысы. Для этой цели авторы использовали модели нейронов с отложенным ответом. Эксперимент делился на две стадии. На первой анимат должен был двигаться вдоль стены комнаты, на которой располагались два типа текстур из колышков, прикрепленных к стене. При приближении к одному из типов текстур анимат получал «неприятный» стимул («foot shock»), что вызывало включение системы ценностей, производящей отрицательное подкрепление (рис. 7).

После получения сигнала «foot shock» анимат должен был рефлекторно отворачивать от данной стены и двигаться к противоположной. На второй стадии эксперимента авторы отключали «foot shock» и анимат мог двигаться вдоль стены, не получая «неприятной» стимуляции. Тем не менее, было показано, что за время фазы обучения в «мозгу» анимата образовались устойчивые межнейрональные и межзоновые связи, приводящие к уверенному срабатыванию рефлекса удаления от стены без «неприятной» стимуляции, а только при касании к соответствующему паттерну на стене. Авторы также продемонстрировали, что ключевую роль в этой реакции играет процесс повторного вхождения (reentry).

Для того чтобы еще более приблизить модель мозга анимата к работе мозга живого организма, в своей следующей модели Darwin X (Krichmar *et al*., 2005a, b) исследователи применили модель гиппокампа, включающую в себя так называемые «клетки места» и развитую систему связей между различными группами нейронов, отражающую известную нейроанатомию гиппокампа и энторинальной коры грызунов (рис. 8). Авторы проводили сухой эксперимент, аналогичный классическому водному тесту Морриса. В тесте Морриса подопытная крыса помещалась в бассейн с мутной водой, окруженный стенками

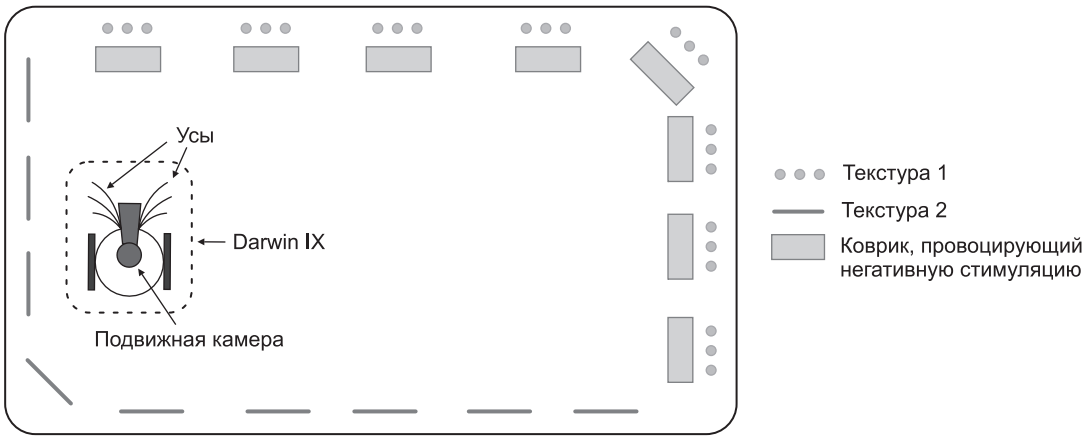


Рис. 7. Схема эксперимента с Darwin IX.

Fig. 7. Design of the experiment with Darwin IX.

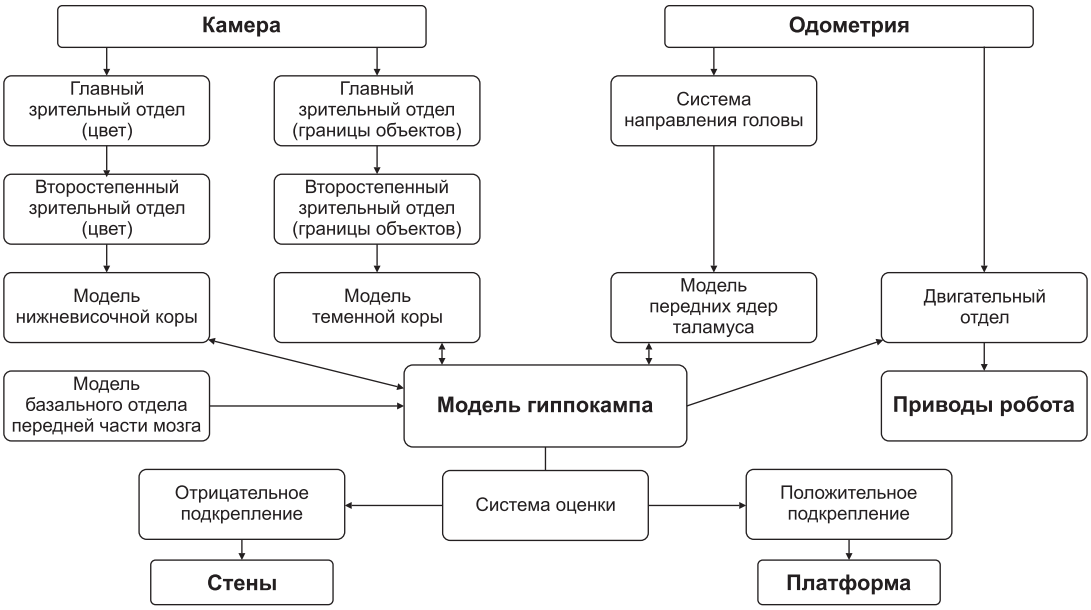


Рис. 8. Архитектура синтетической нервной системы Darwin X.

Fig. 8. Architecture of the Darwin X synthetic neural system.

с нарисованными символами. В произвольном месте бассейна располагалась притопленная площадка, на которой крыса могла отдохнуть. Найти эту площадку крыса могла только в ходе случайного плавания. Однако однажды побывав на ней, крыса запоминала ее местонахождение по расположенным рядом знакам на стенке бассейна и сразу же плыла к площадке, в каком месте бассейна ни поместили бы крысу повторно. В случае Darwin X аналог теста Морриса заключался в следующем: анимат, оснащенный видеокамерой и системой определения направления робота (на базе его одометрии), помещался в комнату с различными рисунками на стенах и произвольной площадкой на полу, которую он не мог видеть, но при достижении которой в ходе его случайного блуждания его система ценностей производила положительное подкрепление связей между возбужденными на данный момент группами нейронов в «гиппокампе» и прилегающими к нему областями мозга анимата. В результате этого анимат запоминал как взаиморасположение ближайших графических сигналов, так и короткий маршрут, предшествующий достижению им целевой площадки. Теперь в случае его повторного помещения в комнату в произвольном месте анимат мог находить площадку в два раза быстрее, чем до обучения. Авторы отмечают, что они не формировали «клетки места» специально, а только организовали систему взаимных связей между различными группами нейронов, аналогичную известной нейроанатомии гиппокампа, и систему ценностей (систему подкрепления), аналогичную дофаминовой системе в мозге грызунов. Функциональные аналоги таких зависимых от места и предшествующего пути групп нейронов спонтанно формировались в ходе исследовательской активности анимата. В то же время авторы отмечают, что анимат для достижения целевой площадки, как правило, каждый раз использовал новый маршрут. То есть на открытом пространстве без препятствий им не удавалось продемонстрировать необходимость использования «клетками места» анимата ранее полученной им информации о пути достижения целевой площадки.

Поэтому в своей последней модели Darwin XI (Fleischer, Krichmar, 2007; Edelman, 2007) авторы поместили анимата в такую же комнату (4 × 5 м) с установленным в ней невысоким крестообразным лабиринтом, выступающим в роли системы препятствий. Кроме системы видеонаблюдения и системы определения направления (на основе компаса), Darwin XI снабжен механическими усами для движения вдоль стенок лабиринта и отслеживания поворотов

лабиринта. Авторы показали, что после ~ 40 испытаний анимат в 80 % случаев обучался двигаться к цели по кратчайшему пути независимо от места его размещения. Предложенная модель позволила авторам по паттерну текущей активности нейронных групп предсказывать с высокой точностью откуда движется анимат (83 %), куда повернет (94 %) и в каком месте лабиринта он располагается (с точностью до 40 см). Авторы отмечают, что использование как зрительной, так и осязательной систем при обучении существенно увеличивает эффективность работы анимата. При этом отключение после обучения любой из модальностей не приводило к полной потере способности аниматом находить цель. В этом случае анимат находил целевую площадку не менее чем в 50 % случаев.

В целом серия аниматов Darwin является наиболее последовательной и развитой системой для моделирования мозга живых организмов, решающих когнитивные задачи обучения и навигации в окружающем пространстве.

Примером другого подхода в разработке аниматов, основанного на моделях отделов мозга, является работа Trullier и Meyer (2000). Анимат в этой работе основан на вычислительной модели гиппокампа крысы, которая позволяет ему ориентироваться в среде с препятствиями и добираться до целевых локаций. Для моделирования гиппокампа используется «когнитивный граф» – гетероассоциативная сеть, запоминающая временные последовательности посещенных мест и хранящая топологическое представление окружения (рис. 9).

В рамках модели предполагается, что энторинальная кора (entorhinal cortex) посылает информацию о пространственном расположении ориентиров зубчатой извилине (dentate gyrus) и области гиппокампа CA3 через проводящие пути (perforant path). Клетки зубчатой извилины хранят эту информацию в кратковременной памяти в правильном временном порядке, соответствующем порядку посещения мест. Эта информация поступает в пирамидальные клетки CA3 (большие треугольники на рис. 9). Когда крыса перемещается из места А в место В в направлении севера, возбуждаются клетки места А и В в соответствующем порядке. В то же время подкрепляется связь, образованная через канал, соответствующий направлению движения на север (маленький закрашенный треугольник), между клетками А и В. Таким образом, в ходе первоначального случайного блуждания происходит процесс «латентного обучения», в ходе которого и формируется «когнитивный граф».

Когда крыса, уже изучившая топологию окружения, обнаруживает место, содержащее вознаграждение, то для каждой «клетки места» путем обратного распространения возбуждения по графу формируются «клетки направления к цели». Теперь, пожелав вернуться в целевую

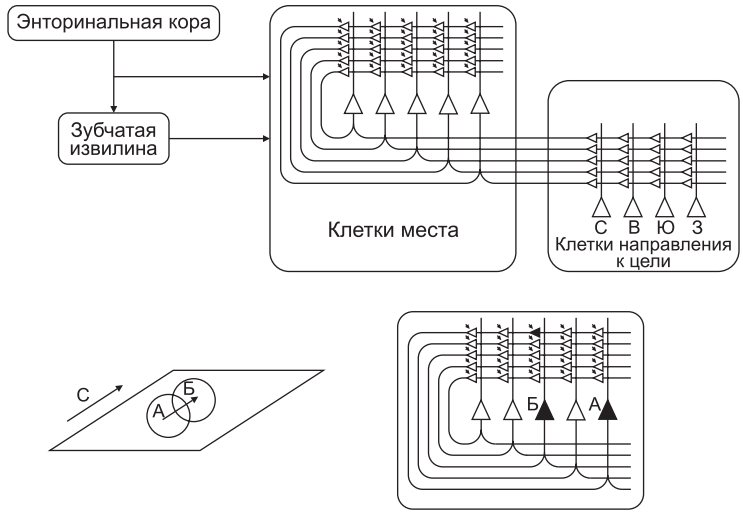


Рис. 9. Архитектура модели гиппокампа, основанная на «когнитивном графе».

Fig. 9. Architecture of the hippocampus model based on the «cognitive graph».

локацию из произвольного места, она запрашивает у когнитивного графа направление движения, хранящееся в соответствующей «клетке направления к цели».

При помощи «клеток места», «клеток направления» и «клеток направления к цели» такая модель позволяет избежать использования сложных алгоритмов поиска по графу. В ходе работы были изучены два способа работы с «клетками места». Первый способ предполагал, что «клетки места» ассоциируются с заранее заданными локациями, которые равномерно распределены в пространстве. Во втором способе клетки места создались динамически во время исследования окружающей среды и увеличения плотности расположения таких клеток с увеличением сложности окружения. Оба способа привели к одинаковым результатам. Несмотря на то что анимат мог уверенно возвращаться к целевой локации, авторы отмечают его слабую способность к изменению обратного пути к цели и нахождению оптимального маршрута.

Более эффективная модель анимата, использующая виртуальную модель гиппокампа, была предложена в работах Milford (2008) и Milford, Wyeth (2010). Система RatSlam перемещается в реальном здании и принимает на вход как визуальные данные с видеокамеры, так и одометрические данные о собственном движении и направлении. На первом этапе анимат случайно блуждает по зданию. При этом для каждой новой локации (удаленной от предыдущей на значимую величину), определенной согласно данным одометрии, формируется новая «клетка места». Кроме того, робот непрерывно проводит визуальную оценку своего окружения и формирует «клетки обзора». Снимки с круговой видеокамеры нормализуются и сравниваются с уже имеющимися снимками (если они на данный момент существуют). Для оценки сходства рисунков рассчитывается взаимная корреляционная функция. В случае если в памяти не находится похожих снимков, формируется новая «клетка обзора», в которую и записывается новый снимок. Затем на основе «клеток места» и соответствующих им «клеток обзора» формируются «клетки опыта», в которых также запоминается информация о том, из какой локации (от какой предыдущей клетки опыта), за какое время анимат попал в локацию, соответствующую данной «клетке опыта», и в какую локацию после этого переместился. Таким образом, на основе «клеток опыта» формируется полуметрическая «карта опыта», содержащая граф связности различных локаций здания с учетом всех встреченных препятствий.

На втором этапе эксперимента исследователи ставили анимату задачу доставки полезного груза в произвольное место внутри здания. Анимат, используя стандартные алгоритмы нахождения оптимального пути по графу, определял кратчайший маршрут до цели и в подавляющем большинстве случаев успешно решал поставленную задачу. При этом обстановка в здании могла меняться, по нему ходили люди, открывались и закрывались двери, перемещалась мебель. В том случае, если анимат обнаруживал изменение локального окружения или новое препятствие, мешающее прохождению по выбранному маршруту, происходило формирование новой «клетки опыта» и соответствующая корректировка «карты опыта». Кроме того, для обновления «карты опыта» анимат с некоторой вероятностью переходил в режим случайного блуждания.

Можно отметить, что, несмотря на высокую эффективность решения задачи, как и в предыдущей работе, анимат в ходе нахождения оптимального маршрута предпочитал пользоваться только путями, находящимися в его «карте опыта», избегая поиска новых, более коротких маршрутов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные нами подходы демонстрируют, что на данный момент существует достаточно широкий спектр устройств и методов, моделирующих когнитивное поведение живых существ, решающих в реальном времени навигационные задачи. Изучение динамики поведения и внутренней организации таких синтетических систем дает исследователям новую информацию о возможных механизмах функционирования мозга реальных организмов, позволяет на практике проверять некоторые биологические гипотезы (например, гипотезу о принципах работы гиппокампа), а также улучшать существующие алгоритмы машинного обучения и создавать новые.

В то же время можно отметить, что хотя виртуальные аниматы относительно эффективно

решают поставленные навигационные задачи ориентации в пространстве и нахождения оптимального пути, их внутреннее устройство и функционирование имеют достаточно слабое сходство с динамикой работы реального мозга. А гиброты, хотя и позволяют анализировать поведение сети реальных нейронов, обладают слишком непредсказуемым поведением и все еще не могут эффективно решать поставленные навигационные задачи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана Интеграционным проектом СО РАН № 136, а также грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

ЛИТЕРАТУРА

Almassy N., Edelman G.M., Sporns O. Behavioral constraints in the development of neuronal properties: a cortical model embedded in a real world device // Cereb. Cortex. 1998. V. 8. P. 346–361.

Bakkum D.J., Gamblen P.M., Ben-Ary B., Chao Z.C., Potter S.M. MEART: The semi-living artist // Frontiers in Neurorobotics. 2007. V. 5. P. 1–10.

Bakkum D.J., Shkolnik A.C., Ben-Ary G., Gamblen P., DeMarse T.B., Potter S.M. Removing some 'A' from AI: Embodied Cultured Networks, Embodied Artificial Intelligence, Lecture Notes in Computer Sci. 2004. V. 3139. P. 130–145.

Boucsein C., Nawrot M.P., Schnepel P., Aertsen A. Beyond the cortical column: abundance and physiology of horizontal connections imply a strong role for inputs from the surround // Front. Neurosci. 2011. 5:32.10.3389/fnins.2011.00032

Chiappalone M., Massobrio P., Martinoia S. Network plasticity in cortical assemblies // Eur. J. Neurosci. 2008. 28/221–23710.1111/j.1460-9568.2008.06259.x

Demarse T.B., Wagenaar D., Blau A.W., Potter S.M. The neurally controlled animat: biological brains acting with simulated bodies // Auton Robots. 2001. V. 11. No. 3. P. 305–310.

Edelman G.M. Group selection and phasic reentrant signaling: A theory of higher brain function // The Mindful Brain: Cortical Organization and the Group-Selective Theory of Higher Brain Function / Eds G.M. Edelman, V.B. Mountcastle. Cambridge, MA: MIT Press, 1978. P. 51–100.

Edelman G.M. Neural Darwinism: The Theory of Neuronal Group Selection. N.Y.: Basic Books, 1987.

Edelman G.M. The Remembered Present: A Biological Theory of Consciousness. N.Y.: Basic Books, 1989.

Edelman G.M. Bright Air, Brilliant Fire. On the Matter of the Mind. N.Y.: Basic Books, 1992.

Edelman G.M. Learning in and from brain-based devices // Science. 2007. V. 318. No. 5853. P. 1103–1105.

Fleischer J.G., Krichmar J.L. Sensory integration and remapping in a medial temporal lobe model during maze navigation by a brain-based device // J. Integr. Neurosci. 2007. V. 6. No. 3. P. 403–431.

Hayashi I., Kiyotoki M., Kiyohara Ai, Tokuda M., Kudoh S.N. Acquisition of logicality in living neuronal networks and its operation to fuzzy bio-robot system // Fuzz-Ieee. 2010. P. 1–7.

Hayashi I., Kiyotoki M., Kiyohara Ai, Tokuda M., Kudoh S.N. Fuzzy bio-interface: Indicating logicality from living neuronal network and learning control of bio-robot // Ijcnn. 2011. P. 2417–2423.

Jimbo Y., Tateno Y., Robinson H.P.C. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons // Biophys. J. 1999. V. 76. 670–67810.1016/S0006-3495(99)77234-6.

Krichmar J.L., Edelman G.M. Machine psychology: Autonomous behavior, perceptual categorization, and conditioning in a brain-based device // Cereb. Cortex. 2002. V. 12. P. 818–830.

Krichmar J.L., Nitz D.A., Gally J.A., Edelman G.M. Characterizing functional hippocampal pathways in a brain-based device as it solves a spatial memory task // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005a. V. 102. P. 2111–2116.

Krichmar J.L., Seth A.K., Nitz D.A., Fleischer J.G., Edelman G.M. Spatial navigation and causal analysis in a brain-based device modeling cortical-hippocampal interactions // Neuroinformatics. 2005b. V. 3. No. 3. P. 197–222.

Krichmar J.L., Snook J.A., Edelman G.M., Sporns O. Experience-dependent perceptual categorization in a behaving real-world device // Animals to Animats 6. Cambridge: MIT Press, 2000. P. 41–50.

Kudoh S.N., Taguchi T., Hayashi I. Interaction and intelligence in living neuronal networks connected to moving robot // Fuzz-Ieee. 2006. P. 1162–1166.

Kudoh S.N., Tokuda M., Kiyohara A., Hosokawa C., Taguchi T., Hayashi I. Vitroid – the robot system with an interface between a living neuronal network and outer world // Int. J. Mechatronics Manufacturing Systems. 2011. V. 4. No. 2. P. 135–149.

Milford M.J. Robot navigation from nature: Simultaneous localisation, mapping, and path planning based on hippocampal models (V. 41). Berlin: Springer, 2008.

Milford M., Wyeth G. Persistent navigation and mapping using a biologically inspired SLAM system // Intern. J. Robotics Res. 2010. V. 29. P. 1131–1153.

Pan R.K., Chatterjee N., Sinha S. Mesoscopic organization reveals the constraints governing Caenorhabditis elegans nervous system // PLoS ONE. 2010. 5:e9240.10.1371/journal.pone.0009240

Potter S.M., DeMarse T.B. A new approach to neural cell culture for long-term studies // J. Neurosci. Meth. 2001. V. 110. 17–2.

Reeke G.N. Jr., Finkel L.H., Sporns O., Edelman G.M. Synthetic neural modeling: a multilevel approach to the analysis of brain complexity // Signal and Sense: Local and Global Order in Perceptual Maps / Eds G.M. Edelman, W.E. Gall, W.M. Cowan. N.Y.: Wiley, 1990a. P. 607–706.

Reeke G.N. Jr., Sporns O., Edelman G.M. Synthetic neural modeling: the 'Darwin' series of automata // P. IEEE.

1990b. V. 78. P. 1498–1530.
Seth A.K., McKinstry J.L., Edelman G.M., Krichmar J.L. Spatiotemporal processing of whisker input supports texture discrimination by a brain-based device // Animals to Animats / Eds S. Schaal, A. Ijspeert, A. Billard, S. Vijayakumar, J. Hallam, J.A. Meyer. Cambridge, MA: MIT Press, 2004a. V. 8. P. 130–139.
Seth A.K., McKinstry J.L., Edelman G.M., Krichmar J.L. Texture discrimination by an autonomous mobile brain-based device with whiskers // IEEE Conf. on Robotics andAutomation. New Orleans, LA, 2004b. P. 4925–4930.
Seth A.K., McKinstry J.L., Edelman G.M., Krichmar J.L. Visual binding through reentrant connectivity and dynamic synchronization in a brain-based device // Cereb. Cortex. 2004c. V. 14. P. 1185–1199.
Shkolnik A.C. Neurally Controlled Simulated Robot: Applying Cultured Neurons to Handle and Approach/Avoidance Task in Real Time, and a Framework for Studying Learning *in vitro* // S.M. Potter, J. Lu. Dept. of Mathematics and Computer Science. Emory Univ., Atlanta, 2003.
Song W., Giszter S.F. Adaptation to a cortex-controlled robot attached at the pelvis and engaged during locomotion in rats // J. Neuroscience. 2011. V. 31. No. 8. P. 3110–3128; doi: 10.1523/JNEUROSCI.2335-10.2011
Tessadori J., Bisio M., Martinoia S., Chiappalone M. Modular neuronal assemblies embodied in a closed-loop environment: toward future integration of brains and machines // Front Neural Circuits. 2012. 6:99. doi: 10.3389/fncir.2012.00099. Epub 2012 Dec 12.
Trullier O., Meyer J.-A. Animat navigation using a cognitive graph // Biol. Cybernet. 2000. V. 83. No. 3. P. 271–285.
Wagenaar D.A., Pine J., Potter S.M. Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays // J. Neurosci. Meth. 2004. V. 138. 27–3.

DEVELOPMENT OF ARTIFICIAL COGNITIVE SYSTEMS BASED ON MODELS OF THE BRAIN OF LIVING ORGANISMS

N.I. Putincev[1], O.V. Vishnevsky[1, 2], E.E. Vityaev[1, 3]

[1] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
e-mail: putintsevnikita@gmail.com;
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
[3] Sobolev Institute of Mathematics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Despite the continuous growth of our knowledge about the nervous system, deep features of the neuroanatomy and neurophysiology of different animal species, the basic mechanisms that provide such properties as the ability to learn, use memory to recognize patterns, and learn about the world are poorly understood. In this paper, we present an overview of artificial devices that model the brain and solve such cognitive tasks as navigation, pattern recognition, and path finding. We discuss both hybrid systems (hybrots) in which living neural networks control an artificial body and systems in which an artificial body is controlled by a computer program based on different models of brain and its regions (animats). Two types of hybrid systems are considered: those in which the robot is connected to the brain of a living body, such as a rat, and those in which information is taken from neurons taken from a body or neurons cultured on a microelectrode array, which detects their electrical potentials. Among the computational approaches of simulating the nervous systems of living organisms, we can mark out the «Darwin» family of devices based on the theory of neuronal group selection (TNGS). In addition, we consider papers where animats solve navigation tasks using different models of the rat hippocampus, based on such modelling methods as cognitive graph, view cells, place cells, and experience cells. The approaches under consideration provide researchers with new tools for the analysis of basic principles of neuron interaction between each other and with the outside world that provide higher brain functions.

Key words: hybrot, animat, neural network, cognitive function.

УДК 004.81

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОСТЬ КАК ПРИНЦИП РАБОТЫ МОЗГА

© 2014 г. **Е.Е. Витяев**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт математики им. С.Л. Соболева
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск, Россия,
e-mail: vityaev@math.nsc.ru

Поступила в редакцию 26 мая 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

В работе рассматриваются два взаимосвязанных понятия: «цель» и «задача». К.Ф. Самохвалов и Ю.Л. Ершов в монографии «Современная философия математики» показывают, что существующие проблемы в основаниях математики связаны с недостаточной точностью определения понятия *задача*. Мы имеем постановку задачи тогда и только тогда, когда мы имеем критерий проверки доказательства задачи. В их работе было доказано, что только в «слабых» формальных системах, где не проходит теорема Геделя о неполноте, можно средствами самой системы определить, является ли предъявленное решение задачи действительно ее решением или нет. Этот результат позволяет предложить новый подход к программе Гильберта обоснования математики. Аналогичные рассмотрения мы проводим относительно понятия цели в когнитивных и физиологических науках. Нельзя достичь цели без критерия ее достижения, иначе можно считать, что цель уже достигнута. Определение цели дает возможность определить понятие результата достижения цели – это то, что мы получим, когда цель будет достигнута и критерий достижения цели сработает. Теория функциональных систем (ТФС), разработанная П.К. Анохиным и многими другими знаменитыми учеными его школы, является единственной известной теорией, в которой понятия цели, результата и целенаправленной деятельности – центральные понятия теории и где физиологические механизмы их реализации тщательно исследованы. Следовательно, ТФС – физиологическая теория работы мозга, в которой целеполагание является принципом работы мозга. Мы приводим описание ТФС как теории целенаправленной деятельности.

Ключевые слова: целеполагание, мозг, когнитивные модели, теория функциональных систем, поведение.

ВВЕДЕНИЕ

Следуя Е.Е. Витяеву (Vityaev, 1997, 2008), устанавливается взаимосвязь двух понятий: задача и цель. В разделе «Понятия задачи и основания математики» понятие «задача» анализируется с точки зрения оснований математики и показывается, что существующие проблемы в основаниях математики связаны с недостаточно четкой формулировкой понятия «задача». Мы имеем математическую задачу только тогда, когда у нас есть критерий проверки того, что предъявленное доказательство решения задачи действительно является решением задачи. К. Самохваловым и Ю. Ершовым в монографии по основаниям математики (Ершов, Самохвалов, 2007) было доказано, что только в «слабых» формальных системах, в которых не проходит теорема Геделя о неполноте, мы всегда в состоянии средствами самой формальной системы определить, является ли некоторый текст доказательством решения задачи или нет. Это позволяет сформулировать новый подход к основаниям математики и программе Гильберта обоснования математики: «математические теории могут рассматриваться только как резервуар

для слабых формальных систем, которые извлекаются из всей теории для решения конкретных задач» (Ершов, Самохвалов, 1984).

В разделе «Цель и целенаправленная деятельность» показывается, что аналогичная ситуация возникает с понятием цели в когнитивных науках и физиологии. Цель нельзя достичь, не имея критерия ее достижения, иначе всегда можно считать, что цель уже достигнута. Определение цели парадоксально, так как оно принципиально не предполагает знание о том, как, чем и когда можно достичь цели. Действие всегда целенаправленно. Если нет цели действия, то непонятно, когда и чем его надо завершить. Цель действия – изменить текущее состояние и/или внешние воздействия. Целенаправленная деятельность состоит в организации такой деятельности, которая может удовлетворить некоторую потребность организма. Определение цели позволяет дать определение результата достижения цели как то, что мы получим при достижении цели и удовлетворении критерия. Мы пьем воду, утоляя жажду, едим пищу, утоляя голод и т. д.

Теория функциональных систем (ТФС), разработанная П.К. Анохиным и многими другими выдающимися учеными его школы, – единственная на данный момент теория, в которой понятия цели, результата и целенаправленной деятельности являются центральными и в которой выявляются физиологические механизмы реализации этих понятий. В ТФС подробно исследовано, как мозг в процессе целенаправленной деятельности постоянно разрешает парадокс цели, определяя, чем, как и когда можно достичь цели. Поэтому ТФС – физиологическая теория работы мозга, в которой целенаправленность является принципом его работы. В последующих разделах с этой точки зрения дается изложение ТФС.

ПОНЯТИЯ «ЗАДАЧИ» И «ОСНОВАНИЯ МАТЕМАТИКИ»

Рассмотрим анализ понятия «желания», приведенный в тексте Ершова и Самохвалова (1984). Несмотря на общность приводимых ниже рассуждений, математический результат и пересмотр оснований математики, полученный этими авторами, являются непосредственной и точной их формализацией.

«Я хочу пить» – что это значит? Нет, конечно, никакой ошибки полагать, что слова «я хочу пить» означают просто вот это, где это – определенное состояние сознания, которое я переживаю сейчас и которое я именую жаждой. Но тогда возникает новый вопрос: как ощущение жажды (хотения) связано с фактическим питьем (удовлетворением хотения)? Откуда я знаю, что удовлетворить жажду можно питьем? Содержится ли в самом переживании жажды сознание того, чем эту жажду можно удовлетворить? … Знать желание не означает знать желаемое, а означает знать способность узнать желаемое, как только этому представится случай. Иными словами, вы понимаете какое-либо свое желание … только тогда, когда этому желанию вы сопоставили чувство уверенности в том, что любое будущее состояние сознания вы сумеете убедительным и безошибочным образом распознать как состояние удовлетворения желания или состояние неудовлетворения... Хотя … при этом я не обязательно знаю, чем это утоление будет достигнуто. По прошлому опыту ожидаю, что водой, но, быть может, какая-нибудь таблетка тоже утолит мою жажду ...» (цит. по: Ершов, Самохвалов, 1984. С. 142, 143).

Данное рассуждение позволяет уточнить понятие задачи. Мы понимаем *задачу* только тогда, когда ей сопоставили обоснованное чувство уверенности в том, что всякое состояние нашего сознания мы сумеем убедительным и безошибочным образом распознать как такое, когда решение найдено, или как такое, когда решение не найдено» (цит. по: Ершов, Самохвалов, 1984. С. 143). Заметим, что если последнее условие не выполнено, то задача не требует решения, так как тогда любое состояние сознания можно считать решением.

Предположим, что у нас есть некоторый текст. Представляет ли он собой «убедительное и безошибочное» изложение решения задачи? В математических теориях принято считать, что «обоснованное чувство уверенности» в том, что изложение решения задачи действительно является ее решением, возникает, когда это изложение является доказательством решения задачи. Доказательство дает формальный критерий наличия решения задачи для «распознавания, когда решение найдено или не найдено». Поэтому мы имеем математическую задачу только

тогда, когда у нас есть обоснованное чувство уверенности в том, что всякое состояние нашего сознания мы сумеем убедительным и безошибочным образом распознать как такое, когда мы имеем доказательство решения задачи или у нас отсутствует доказательство решения задачи. Предположим, что наши состояния сознания вместе с доказательствами можно формализовать в рамках некоторой формальной системы S. Зададимся вопросом: позволяет ли эта формальная система для любого текста средствами самой формальной системы S определить, является ли он доказательством решения задачи или нет? Если такая формальная система существует, то это означает, что она может служить формальной моделью для постановок и решения математических задач. Этот вопрос был проанализирован в статье Ершова, Самохвалова (1984) и было доказано, что только в «слабых» формальных системах, в которых не проходит теорема Геделя о неполноте, мы в состоянии средствами самой формальной системы всегда определить, является ли некоторый текст доказательством решения некоторой задачи или нет.

Этот результат позволил ее авторам сформулировать новый подход к основаниям математики, состоящий в радикальном изменении программы Гильберта обоснования математики. «Как известно, Гильберт считал, что, вообще говоря, не все высказывания какой-либо математической теории имеют смысл. При этом неявно он предполагал, что разбиение множества всех высказываний рассматриваемой теории на осмысленные (“реальные”) и бессмысленные (“идеальные”) вполне определяется видом самих высказываний и, следовательно, является фиксированным для всех теорий с одним и тем же синтаксисом и сигнатурой. Согласно новой парадигме, это разбиение на осмысленные и бессмысленные высказывания зависит не только от синтаксиса и сигнатуры рассматриваемой теории, но и от класса задач, с которым предназначается иметь дело этой теории. С этой точки зрения, одна и та же теория как математическое исчисление содержательно будет иметь разные множества осмысленных высказываний, если она предназначена для обработки разных классов задач. Иными словами, математическая теория рассматривается просто как “резервуар” для более “бедных” формальных систем, по отдельности “извлекаемых” из всей теории в зависимости от той или иной имеющейся задачи. Сама по себе, безотносительно к возможным задачам, … теория не имеет практического значения, и поэтому не представляет самостоятельного интереса вопрос, противоречива она в целом или нет» (цит. по: Ершов, Самохвалов, 1984. С. 141).

Но нас интересуют не только математические задачи. Рассмотрим еще раз формулировку понятия задачи: «мы понимаем задачу только тогда, когда ей сопоставили обоснованное чувство уверенности в том, что всякое состояние нашего сознания мы сумеем убедительным и безошибочным образом распознать как такое, когда решение найдено, или как такое, когда решение не найдено» (цит. по: Ершов, Самохвалов, 1984. С. 143). Переформулируем понятие задачи так, чтобы не апеллировать к состояниям сознания. Будем говорить, что задача осмысленна тогда и только тогда, когда мы имеем критерий решенности задачи в том смысле, что для каждого предполагаемого решения мы в состоянии всегда определить, является ли оно решением или нет. Задачи в этом смысле возникают не только в математике, но и во многих других областях, и поэтому во всех этих случаях следует иметь в виду, что всегда необходим критерий решения задачи. Оказывается, что с понятием «задача» в этом смысле связана и целенаправленная деятельность.

ЦЕЛЬ И ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

Желание не пассивно. Нет смысла желать что-то, если нет никакой возможности своей активностью или действиями приблизиться к удовлетворению желания. Есть организмы: кораллы, растения, которые не имеют возможности проявить свою активность и тем самым как-то приблизить момент удовлетворения желания. Есть ли у них осознание желания или какой либо потребности, или они просто заняты переработкой того, что к ним поступает само собой?

Желание активно – оно заставляет организм проявить свою активность в деятельности с целью удовлетворения своего желания. Тогда возникает понятие цели. Цель нельзя достичь, не имея критерия ее достижения, иначе всегда

можно считать, что цель уже достигнута. Критерием достижения цели является удовлетворение желания. Понятие цели является более общим, чем понятие задачи. Целью задачи является ее решение, и критерием достижения этой цели является критерий решенности задачи.

Определим *цель* как активность/деятельность, направленную на удовлетворение некоторого критерия. Определение цели не имеет смысла без критерия ее достижения, так как мы должны убедиться, что критерий не удовлетворен уже сейчас и значит, цель как то, чего нет сейчас и чего мы хотим достичь, имеет смысл ставить. Такое определение цели позволяет определить *результат* достижения ее как все то, что мы получаем при удовлетворении критерия и достижении цели (удовлетворения желания). Мы пьем воду, когда удовлетворяем жажду, едим пищу, удовлетворяя голод, дышим, когда не хватает воздуха и т. д. Между понятиями цели и результата имеется следующая связь: результат получен, когда цель достигнута и «срабатывает» критерий наличия. Но когда цель ставится, мы имеем цель, но не имеем результата.

Определение цели парадоксально, так как активность/деятельность по удовлетворению некоторого критерия принципиально не предполагает знание о том, как достичь цели, можно задать цель, не определяя ни как ее достичь, ни чем, ни когда. Эту парадоксальность понятия цели назовем *парадоксом цели*. Как мы увидим из теории функциональных систем, деятельность мозга в целенаправленном поведении постоянно направлена на разрешение парадокса цели и определения, чем, как и когда можно достичь цели.

Действие всегда целенаправленно. Если нет цели действия, то непонятно, когда (и чем) оно должно завершиться. Смысл активности и деятельности – изменить текущее состояние и/или внешние воздействия с целью достижения чего-то. Целенаправленная деятельность имеет целью удовлетворение некоторой потребности (желания) организма. Перейдем к изложению теории функциональных систем, в которой понятия цели, результата и целенаправленной деятельности являются центральными и где анализируются физиологические механизмы цели, результата и целенаправленной деятельности.

ТЕОРИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ РАБОТЫ МОЗГА

Теория функциональных систем (ТФС) – есть теория работы мозга как системы для достижения целей и разрешения парадокса цели. Поэтому изложим теорию функциональных систем как теорию разрешения мозгом парадокса цели, которая описывает, как мозг определяет: чем, как и когда можно достичь цели.

П.К. Анохин говорит о понятии задача: «Когда человек решил задачу, на каком основании он убежден, что решение правильно? Параметры правильности решения должны быть определены заранее, ведь неудачи коллег дали ему опыт “нерешенности” и позволили определить, что именно он будет считать решением. Следовательно, он не предвидел результата, но он предвидел, каким условиям должно удовлетворять решение» (Anokhin, 1973; Анохин, 1976. С. 13). Это определение схоже с формулировкой понятия задачи, приведенной в статье Ершова, Самохвалова (1984). Такое понимание задачи и результата является принципиальным достижением ТФС и выделяет ее среди остальных известных теорий. «Пожалуй, одним из самых драматических моментов в истории изучения мозга как интегративного образования является фиксация внимания на самом действии, а не на его результатах ... мы можем считать, что результатом “хватательного рефлекса” будет не само хватание как действие, а та совокупность афферентных раздражений, которая соответствует признакам “схваченного” предмета (результат действия)» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 27).

«Наиболее значительным, по нашему мнению, моментом (в истории развития понятия функциональной системы. – Е.В.) является формирование понятия “результат действия” (в 1966 г.). П.К. Анохин теперь уже пишет о результатах действия как о самостоятельной физиологической категории» (Там же. С. 27).

Заметим, что именно так понимаемый результат действия является признаком достижения цели – схватить предмет, а критерием достижения цели является «совокупность афферентных раздражений, соответствующая признакам схваченного предмета» (Там же. С. 28). Понятие результата действия физиологически фиксирует критерий достижения цели. Драматическая

ситуация в изучении мозга, о которой пишет П.К. Анохин, продолжается до сих пор, так как никакая другая теория не исследует механизмы достижения результата в этом смысле.

Кратко изложим теорию функциональных систем по монографии К.В. Судакова (1984) – одного из ведущих учеников П.К. Анохина. В этой работе подводится итог не только работ самого П.К. Анохина, но и всей его школы. Прежде всего, рассмотрим, каковы физиологические механизмы постановок целей организмом. Здесь наблюдается любопытная аналогия между физиологическими механизмами и математическим результатом, полученным Ершовым и Самохваловым (1984). Как отмечено в этой статье, «для решения любой осмысленной задачи мы не имеем права выделить из какой-нибудь теории столь большой фрагмент, чтобы он не был слабой системой». В теории функциональных систем такими "фрагментами" являются функциональные системы организма, формирующиеся для решения стоящей перед организмом задачи.

Функциональной системой мы называем комплекс нервных образований с соответствующими им периферическими рабочими органами, объединенный на основе выполнения какой-либо вполне очерченной и специфической функции организма. К таким очерченным функциям можно отнести, например, локомоцию, дыхание, глотание, плавание и т. д.» ... «Состав функциональной системы не может быть определен каким-либо анатомическим принципом. Наоборот, самые разнообразные "анатомические системы" могут принимать участие и объединяться на базе одновременного возбуждения при выполнении той или иной функции организма» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 19).

Таким образом, единицами деятельности организма являются не отдельные органы, а функции организма. Выполнение какой-либо функции организма – это и есть задача деятельности организма.

Как мы знаем, цель (задача) осмысленна, если есть критерий достижения цели. Функции организма также должны приводить к достижению некоторых целей, которые фиксируются как некоторый результат. «Основным постулатом теории функциональных систем является положение о том, что ведущим системообразующим фактором, организующим функциональную систему любого уровня организма, служит полезный для организма и системы в целом приспособительный *результат*. Именно результат благодаря постоянной обратной афферентации о его состоянии производит своеобразную "мобилизацию" центральных и исполнительных образований в функциональную систему» (Там же. С. 34, 35).

Таким образом, единицы деятельности организма – функциональные системы – являются объединениями различных органов с целью достижения некоторых полезных для организма результатов и тем самым определяются этими результатами.

Достижение результата должно некоторым образом фиксироваться, так как результат есть срабатывание некоторого критерия. Чем физиологически является критерий, фиксирующий достижение результата? Физиологически он реализуется «специальным рецепторным аппаратом».

«Каждая *потребность*, даже при незначительном отклонении жизненно важной функции от оптимального для метаболизма уровня, немедленно воспринимается специальными *рецепторными аппаратами*» (Там же. С. 43). «Наличие рецепторов в каждой функциональной системе, "стоящих на страже" конечного приспособительного результата, является исходным пунктом в механизмах саморегуляции. Меньшее отклонение результата от оптимального для метаболизма уровня вызывает меньшее возбуждение рецепторов и, соответственно, меньшую сигнализацию в нервную систему» (Там же. С. 44).

Таким образом, результатом является достижение оптимального уровня некоторой физиологической константы, который фиксируется специальным рецепторным аппаратом. Сигнализация этого рецепторного аппарата о получении результата (отсутствия отклонения от оптимального для метаболизма уровня) и достижении цели названа в ТФС обратной афферентацией.

«...Сигнализация о потребности несет двоякую функцию. С одной стороны, она играет пусковую роль, возбуждая специальные аппараты саморегуляции, а с другой – постоянно информирует эти же центры о результатах действий, совершенных функциональной сис-

темой. Поскольку эта сигнализация заключает в себе информацию о конечном результате, о его отклонениях от оптимального для метаболизма уровня или восстановлении ... она была названа *обратной афферентацией*» (Там же. С. 45).

Теперь мы можем объяснить в рамках ТФС, как физиологически осуществляется постановка задач и целей организмом. Целью в ТФС является потребность организма. «Двоякая функция потребности» означает, что перед организмом ставится цель, во-первых, по восстановлению нарушенного метаболизма и, во-вторых, по энергетическому обеспечению достижения цели. Критерием достижения цели является получение обратной афферентации о восстановлении нормального уровня некоторого физиологически важного показателя. Если же нормальный уровень нарушен и обратная афферентация свидетельствует о неудовлетворении критерия в данный момент, то возникает потребность, которая ставит перед организмом цель: удовлетворить соответствующую потребность. В этом случае цель и критерий ее достижения, во-первых, сигнализируют посредством обратной афферентации об отсутствии этого наличия в данный момент (об отсутствии нормального уровня некоторого показателя), что, собственно, и означает наличие потребности; во-вторых, ставят цель как ожидание получения сигнализации о восстановлении нормального уровня некоторого показателя и достижения результата, и, в-третьих, энергетически обеспечивает и фактически вынуждает организм достичь цели. Таким образом, физиологическим механизмом целеполагания и является возникновение потребности. Таким образом, потребность и есть цель, ставящаяся перед организмом. В ТФС понятия потребности и результата являются связанными. В нашем определении понятия потребности и результата объединяются понятием цели и результат есть лишь фиксация достижения цели и удовлетворения потребности.

Взаимодействие различных результатов и целей в ТФС осуществляется несколькими способами: по «принципу доминанты», «иерархией результатов» и «моделями результатов».

Рассмотрим «принцип доминанты». Этот принцип говорит о том, что две цели одновременно достигаться не могут. «Поскольку метаболизм организма всегда многосторонен, общая метаболическая потребность организма часто многопараметрична, отражая тем самым различные стороны процесса обмена веществ... Однако всегда имеется ведущий параметр общей метаболической потребности – доминирующая потребность, наиболее важная для выживания особи, ее рода или вида. Она возбуждает доминирующую функциональную систему и строит поведенческий акт, направленный на ее удовлетворение. Удовлетворение ведущей потребности приводит к тому, что начинает доминировать другая важная для сохранения вида или рода потребность» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 40).

Тем самым наиболее важные для организма цели – доминирующие потребности всегда линейно упорядочены во времени. Рассмотрим теперь, как функциональные системы взаимодействуют в некоторый момент времени. По отношению к доминирующей функциональной системе остальные функциональные системы выстраиваются в иерархию по принципу «*иерархии результатов*». «По отношению к каждой доминирующей функциональной системе все другие функциональные системы выстраиваются в определенном иерархическом порядке, начиная от молекулярного, вплоть до организменного и социально-общественного уровня. Иерархия функциональных систем ..., прежде всего, включает иерархическое взаимодействие результатов их действий, когда результат деятельности одной функциональной системы входит в качестве компонента в результат деятельности другой» (Там же. С. 54). «Так, у голодного кролика доминирует функциональная система, деятельность которой направлена на поиск пищи. В это время другие функциональные системы, определяющие, например, кровяное давление, дыхание, выделение, направлены на лучшее обеспечение доминирующей пищедобывательной функциональной системы» (Там же. С. 54).

Рассмотрим подробнее, как формируется иерархия результатов. Если у кролика доминирует функциональная система добывания пищи, то в процессе деятельности этой функциональной системы усиленно расходуется кислород, уменьшается содержание питательных веществ в крови, увеличивается количество вредных веществ, получающихся в процессе обмена и требующих вывода из организма и т. д. Все

это приводит к сдвигу от нормального уровня целого ряда физиологических констант организма, что фиксируется рецепторами целого ряда других функциональных систем. Это автоматически «включает» эти функциональные системы, целью которых является обеспечение нормального уровня этих физиологических констант и результатами которых является достижение соответствующего нормального уровня. Так доминирующая потребность активирует функциональные системы, целью которых является обеспечение нормального уровня физиологических показателей, участвующих в достижении доминирующей потребности.

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ В ТФС И ПАРАДОКС ЦЕЛИ

Функциональные системы можно условно разбить на две группы: требующие обращения к внешней среде для достижения результата и не требующие такого обращения. К первым относятся пищедобывательная функциональная система, активируемая голодом, функциональная система жажды, половая и т. д., ко вторым относятся функциональные системы пищеварения, выделения, кровяного давления и т. д. Понятно, что «результаты поведенческой деятельности, направленные на удовлетворение внутренних потребностей организма, могут рассматриваться как “подрезультаты” функциональных систем, обеспечивающих основные жизненно важные внутренние метаболические показатели» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 53). Тем самым целенаправленная деятельность может рассматриваться как составная часть функциональных систем второго типа. Принципиальная разница между двумя типами функциональных систем с точки зрения цели состоит в том, что для функциональных систем второго типа (дыхания, давления, выделения) мы можем предполагать существование генетических механизмов достижения цели и результата, а для систем первого типа мы этого предполагать не можем. Разрешение парадокса цели и определение, чем, как и когда достичь цели для функциональных систем второго типа определяется генетически, и к объяснению работы таких функциональных систем нечего добавить кроме того, что было сказано в предыдущем разделе «Теория функциональных систем работы мозга». А для функциональных систем первого типа, имеющих дело со сложной внешней средой, требующей обучения, необходимо еще ответить на главный вопрос: как мозг разрешает парадокс цели и определяет, чем, как и когда можно достичь цели. Для этого в ТФС вводится целая серия новых понятий для описания целенаправленного поведения.

Различие между функциональными системами первого и второго типа хорошо иллюстрируется следующим примером: «Возникшее на основе той или иной биологической потребности поведение новорожденного животного строится в полном смысле слова методом “проб и ошибок” ... Поражает направленный поиск новорожденным специальных раздражителей внешней среды, с которыми он никогда не встречался. Следовательно, они должны иметь врожденные модели, в которых запрограммированы свойства удовлетворяющих эти потребности раздражителей, с которыми осуществляется постоянное сравнение достигнутых результатов» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 74). «... непосредственно после рождения первой целенаправленной деятельностью лосенка является освоение вертикальной позы, затем движение в сторону матери, поиск соска, сосание и, наконец, реакция следования» (Там же). Поэтому сразу после рождения целенаправленное поведение также строится с использованием генетически заложенных форм поведения по «поиску специальных раздражителей внешней среды». Но генетически определяются только требуемая последовательность результатов и некоторый максимально общий способ поведения типа «метода проб и ошибок». Совершенствование и развитие деятельности уже происходит в процессе обучения. «Однако по мере неоднократного удовлетворения животным однотипной потребности механизмы генетической памяти все в большей степени начинают обогащаться индивидуальным опытом данного животного» (Там же. С. 74). «Согласно П.К. Анохину, центральные механизмы функциональных систем, обеспечивающих целенаправленные поведенческие акты, имеют однотипную архитектуру» (Там же). Рассмотрим подробно архитектуру целенаправленной деятельности

и физиологические механизмы разрешения парадокса цели.

Афферентный синтез. Начальную стадию поведенческого акта любой степени сложности составляет афферентный синтез, включающий в себя синтез мотивационного возбуждения, памяти, обстановочной и пусковой афферентации.

Мотивационное возбуждение. Как мы знаем, постановка цели осуществляется возникшей потребностью. Но в случае целенаправленного поведения она трансформируется в *мотивационное возбуждение*. «Ведущим возбуждением, ..., определяющим целенаправленную деятельность даже животных, является мотивационное возбуждение, формирующееся на основе ведущей внутренней потребности» (Там же. С. 73). «Доминирующая потребность всегда воспринимается комплексом специфических рецепторов, расположенных как на периферии, так и непосредственно в центральной нервной системе. С их участием появляется ответственный момент формирования целенаправленного поведения – процесс трансформации внутренней потребности в соответствующее возбуждение мозга. Так возникает доминирующая мотивация. Последняя всегда сопровождается специфическим эмоциональным ощущением. Иными словами, в процессе формирования мотивационного возбуждения материальная метаболическая потребность трансформируется в процесс возбуждения мозговых структур» (Там же. С. 113). Но мотивационное возбуждение не есть возбуждение рецепторов, стоящих «на страже» некоторой физиологической константы – это возбуждение «центральных мозговых структур», инициируемое возникшей потребностью. Мотивационное возбуждение и есть цель, ставящаяся перед организмом в случае целенаправленного поведения. Как и для потребностей, мотивационное возбуждение не только ставит цель, но энергетически обеспечивает достижение цели. «Отрицательная эмоция, сопровождающая мотивацию, имеет важное биологическое значение. Она мобилизует усилия животного на удовлетворение возникшей потребности. Сопровождающие мотивационное возбуждение отрицательные эмоциональные ощущения способствуют более быстрому нахождению животным подкрепляющего агента» (Там же. С. 91).

При целенаправленной деятельности достижение результата и действие подкрепляющего стимула субъективно ощущаются появлением положительной эмоции (ликвидацией отрицательной). Целенаправленному поведению надо обучаться, поэтому надо запоминать ту последовательность возбуждений, которая привела к достижению результата. Положительные эмоции (ликвидация отрицательных) имеют, поэтому, еще и подкрепляющую (санкционирующую) роль, которая фиксирует в памяти всю последовательность действий, приведших к достижению цели.

Память. Память – второй компонент афферентного синтеза. Как уже отмечалось, при действии подкрепляющего раздражителя, означающего факт достижения результата, закрепляется вся последовательность возбуждений, которая привела к достижению цели. «... Извлечение прошлого опыта из памяти происходит по той же нейрохимической трассе, по которой он был зафиксирован в момент приобретения опыта» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 91).

При подкреплении фиксируется вся последовательность возбуждений, которая привела к достижению цели, начиная с мотивационного возбуждения. Поэтому возникновения мотивационного возбуждения достаточно для «извлечения из памяти» всех предыдущих последовательностей действий, приведших к достижению результата и подкреплению. Мотивационное возбуждение обладает, кроме того, химической специфичностью, позволяющей «извлекать из памяти» все пути достижения именно этой цели, которая ставится данным мотивационным возбуждением. «Каждая мотивация строится специфическими по своему химическому метаболизму восходящими активирующими влияниями соответствующих подкорковых центров на кору головного мозга. А это в свою очередь приводит к тому, что с помощью мотивационных влияний животные производят активный отбор только специальных раздражителей внешнего мира для удовлетворения своих доминирующих потребностей» (Там же. С. 79, 80).

Обстановочная афферентация. При фиксации следа в памяти фиксируется и та обстановка, в которой удалось получить результат. Эта обстановка фиксируется как необходимые условия, наряду с мотивацией, требуемые для

достижения результата. Поэтому мотивационное возбуждение в данной обстановке «извлекает из памяти» только те способы достижения цели, которые возможны в данной обстановке. Таким образом, обстановочная афферентация при взаимодействии с извлеченным из памяти опытом определяет, что и как можно делать в данной обстановке для достижения цели.

Пусковая афферентация. Четвертым компонентом афферентного синтеза является пусковая афферентация. По смыслу она так же является обстановочной афферентацией, только связанной не со стимулами обстановки, а со временем и местом достижения результата. «... специальные раздражители вскрывают сформированную на основе взаимодействия мотивационного, обстановочного возбуждения и механизмов памяти так называемую предпусковую интеграцию. Эти пусковые раздражители приурочивают, таким образом, целенаправленную деятельность к определенному месту и времени» (Там же. С. 75). Поэтому пусковая афферентация отвечает на вопрос: когда и где можно достичь результата.

Таким образом, на стадии афферентного синтеза в значительной степени разрешается парадокс цели и определяется, что, как, где и когда можно делать для достижения цели. «Итак, на стадии афферентного синтеза решается несколько вопросов: что делать (на основе сопоставления внешних и внутренних раздражителей), как делать (на основе памяти) и когда делать (на основе действия пусковых раздражителей)» (Там же. С. 80).

Таким образом, мотивационное возбуждение как цель, с учетом имеющегося опыта и обстановки, автоматически разрешает парадокс цели и определяет, чем, как и когда ее можно достичь. «Вытягивая» из памяти весь накопленный опыт, мотивационное возбуждение как цель преобразуется в *конкретную цель*, определяющую способ своего достижения. Конкретная цель называется в ТФС «*высшей мотивацией*».

ПРИНЯТИЕ РЕШЕНИЙ

На стадии афферентного синтеза мотивационным возбуждением из памяти может быть извлечено несколько способов достижения цели. На стадии принятия решения выбирается только один способ – конкретный *план действий*. «В соответствии с исходной потребностью на стадии принятия решения избирается только одна конкретная линия поведения» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 80).

Принятие решений – очень тонкий процесс и должен учитывать:

– вероятность достижения цели в данной ситуации (Симонов, 1981, 1985);

– суммарные энергетические затраты того или иного способа достижения цели с учетом информационной определенности возможности достижения цели (переключающая функция эмоций) (Там же);

– объем извлеченного из памяти опыта, включая доминантные (генетически определенные) формы поведения в случае, когда имеющегося опыта недостаточно для принятия решения (компенсаторная функция эмоций) (Там же).

АКЦЕПТОР РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕЙСТВИЯ

Пусть выбран некоторый план действий. Он еще не гарантирует нам, что конечный результат обязательно будет достигнут. И даже не гарантирует, что любой промежуточный результат также будет достигнут. Цель может быть достигнута, только если каждый из промежуточных результатов плана действий будет достигнут. Мотивационное возбуждение «извлекает из памяти» также всю последовательность и иерархию результатов, которые должны быть получены при выполнении плана действий. Эта последовательность и иерархия результатов определяются в ТФС как *акцептор результатов действия*. «Именно доминирующая мотивация “вытягивает” в аппарате акцептора результатов действия весь накопленный опыт до конечного, удовлетворяющего лежащую в ее основе потребность результата, создавая определенную *модель* или программу поведения. С этих позиций модель акцептора результатов действия представляет собой доминирующую потребность организма, трансформированную в форме опережающего возбуждения мозга, как бы в своеобразный *комплексный “рецептор”* соответствующего подкрепления» (Anokhin, 1974; Судаков, 1984). «... следует отметить, что в акцепторе результатов действия программируется не только континуум результатов поведения, но и вся мозаика

действий, направленная на достижение каждого результата» (Там же. С. 84).

Таким образом, мотивационное возбуждение, преобразуясь в конкретную цель, извлекает из памяти также и *конкретный результат* этой конкретной цели, которым являются вся последовательность и иерархия результатов, которые должны быть получены в процессе достижения конкретной цели и выполнения плана действий, т. е. акцептор результатов действия. Поэтому акцептор результатов действия есть конкретный результат достижения конкретной цели. «Формирование "цели" в центральной архитектуре поведенческого акта связано с построением следующей стадии системной организации поведенческого акта аппарата предвидения будущего результата (всей последовательности и иерархии результатов), удовлетворяющего доминирующую потребность, – аппарата акцептора результатов действия» (Там же). «Итак, формирование предвидения будущего результата в функциональных системах – акцептора результатов действия – представляет собой физиологический аппарат формирования цели» (Там же).

Определение цели П.К. Анохиным и наше определение конкретной цели различаются: во-первых, мотивационное возбуждение у П.К. Анохина не участвует в определении цели, во-вторых, под целью П.К. Анохин понимает не только сам результат и «всю мозаику действий», но и его предвидение. Предвидение здесь понимается в двух смыслах: во-первых, как ожидание достижения результата (соответствующей обратной афферентации) и, во-вторых, как предсказание получения конечного результата, основанного на «принципе опережающего отражения действительности» (Анохин, 1978). Фактически оба смысла объединяются в понятии предвидения – это и ожидание результата, и его предвидение. В нашем определении акцептора результатов действия как конкретной цели понятие предвидения не обязательно.

Преобразование мотивационного возбуждения как цели в конкретную цель, а плана действий – в конкретный результат (акцептор результатов действия), преобразует первоначальную парадоксальную цель, для которой не определено, чем, как и когда достигать цель, в непарадоксальную конкретную цель, в которой конечная цель (и результат) разбиты на подцели (и подрезультаты) так, что для каждой подцели уже известно, чем, как и когда ее можно достичь. Но парадоксальность определения цели этим полностью не снимается, так как даже если мы знаем по прошлому опыту, что цель (результат) достигается таким-то действием, то у нас нет, и в принципе не может быть никакой гарантии, что и в этот раз данное действие приведет к этому же результату. Приведет ли некоторая последовательность действий к результату или не приведет, все равно должно быть проверено некоторым критерием, который в данном случае является акцептором результатов действия.

ЭФФЕКТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Как выполняется план действий? «Стадия формирования акцептора результатов действия динамически последовательно сменяется формированием самого целенаправленного действия. Однако ему предшествует стадия, когда действие уже сформировано как центральный процесс, но внешне еще не реализуется... По-видимому, наиболее удачно отражает семантический смысл этой стадии название "стадия эфферентного синтеза". На этой стадии за счет центральных возбуждений осуществляется динамическое объединение соматических и вегетативных функций в целостный поведенческий акт» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 88).

Так как реальная ситуация всегда чем-то отличается от тех ситуаций, которые были извлечены из памяти и учтены в процессе принятия решений, то неизбежно могут возникать «рассогласования» между ожидаемыми результатами и реально поступающей обратной афферентацией о результатах совершенных действий. «Оценка результата действия происходит с помощью активной *ориентировочно-исследовательской деятельности* (Анохин, 1979) и эмоциональных ощущений. Ориентировочно-исследовательская реакция возникает и усиливается во всех случаях, когда результат совершенного действия неожиданно не соответствует свойствам сформированного на основе афферентного синтеза акцептора результатов действия, т. е. при возникновении "рассогласования" в поведенческой деятельности. Благодаря включению такой реакции немедленно перестраивается афферентный

синтез, принимается новое решение, строится новая программа действия» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 90, 91).

Заметим, что при рассогласовании поступающей «обратной афферентации» с ожидаемой акцептором результатов действия афферентацией происходит перестройка афферентного синтеза и принимается новое решение, что означает формирование новой конкретной цели, хотя мотивационное возбуждение и соответствующая конечная цель остаются без изменений.

«Целенаправленный поведенческий акт, таким образом, заканчивается последней санкционирующей стадией. На этой стадии при действии раздражителя, удовлетворяющего ведущую потребность, – подкрепления в общепринятом смысле – параметры достигнутого результата через раздражения соответствующих рецепторов ... вызывают потоки обратной афферентации, которая по всем своим свойствам соответствует ранее запрограммированным свойствам подкрепляющего раздражителя в акцепторе результатов действия. При этом удовлетворяется ведущая потребность и поведенческий акт заканчивается» (Anokhin, 1974; цит. по: Судаков, 1984. С. 89, 90).

При подкреплении каждый раз фиксируется «след» всех возбуждений, приведших к достижению результата, и тем самым реализованный план действий «заносится» в память.

Таким образом, в работе проведена параллель между понятием *задача* в основаниях математики и понятием *цель* и целенаправленного поведения в теории функциональных систем. Эта параллель позволяет рассматривать теорию функциональных систем как теорию решения мозгом задач по удовлетворению потребностей во внешнем мире.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционных проектов СО РАН № 136, 86 и Совета по грантам Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ (проект НШ-860.2014.1).

ЛИТЕРАТУРА

Анохин П.К. Проблема принятия решения в психологии и физиологии // Проблемы принятия решения. М.: Наука, 1976. С. 7–16.

Anokhin P.K. The decision problem in psychology and physiology // Problems of decision. Moscow: Nauka, 1976. P. 7–16. (In Russian).

Анохин П.К. Опережающее отражение действительности // Избр. тр. Философские аспекты теории функциональной системы. М.: Наука, 1978. С. 7–26.

Anokhin P.K. Anticipatory reflection of reality // Selected works. Philosophical aspects of the functional system theory. Moscow: Nauka, 1978. P. 7–26. (In Russian).

Анохин П.К. Роль ориентировочно-исследовательской реакции в образовании условного рефлекса // Анохин П.К. Системные механизмы высшей нервной деятельности: Избр. тр. М.: Наука, 1979. С. 338–352.

Anokhin P.K. The role of the exploratory-orienting reaction in conditional reflex formation // Anokhin P.K. Systemic mechanisms of the higher nervous activity: Selected works. Moscow: Nauka, 1979. P. 338–352. (In Russian).

Ершов Ю.Л., Самохвалов К.Ф. О новом подходе к философии математики // Структурный анализ символьных последовательностей. Новосибирск, 1984. Вып. 101. Вычислительные системы. С. 141–148.

Ershov Y.L., Samokhvalov K.F. A new approach to the philosophy of mathematics // Structural analysis of symbolic sequences, (Computer systems: issue 101). Novosibirsk, 1984. P. 141–148. (In Russian).

Ершов Ю.Л., Самохвалов К.Ф. Современная философия математики: недомогания и лечение. Институт математики СО РАН. Новосибирск: «Параллель», 2007. 142 с.

Ershov Y.L., Samokhvalov K.F. Contemporary philosophy of mathematics: uneasiness and treatment. Novosibirsk: Sobolev Institute of Mathematics SB RAS. Novosibirsk: «Parallel», 2007. 142 p. (In Russian).

Симонов П.В. Высшая нервная деятельность человека (мотивационно-эмоциональные аспекты). М.: Наука, 1975. 173 с.

Simonov P.V. Higher nervous activity of humans (motivation-emotional facets). Moscow: Nauka, 1975. P. 173. (In Russian).

Симонов П.В. Эмоциональный мозг. М.: Наука, 1981. 140 с.

Simonov P.V. Emotional brain. Moscow: Nauka, 1981. P. 140. (In Russian).

Судаков К.В. Общая теория функциональных систем М.: Медицина, 1984. С. 222.

Sudakov K.V. General theory of functional systems. Moscow: Medicine, 1984. P. 222. (In Russian).

Anokhin P.K., Functional system // Dictionary of Behavioral Science. N.Y.: a.o. 1973. 153 p.

Anokhin P.K. Biology and neurophysiology of the conditioned reflex and its role in adaptive behavior. Oxford a.o.: Pergamon press, 1974. 574 p.

Vityaev E.E. Purposefulness as the principle of brain activity // Models of cognitive processes. (Computational Systems, V. 158) // Proc. of the Sobolev Institute of Mathematics. Novosibirsk, 1997. P. 9–52. (in Russ.).

Vityaev E.E. Principles of brain activity, contained in the functional systems theory P.K. Anokhina and emotional theory of P.V. Simonov // Neouroinformatics. 2008. V. 3. No. 1. P. 25–78 (in Russian). http://www.niisi.ru/iont/ni/Journal/V3/N1/Vityaev.pdf

PURPOSEFULNESS AS THE PRINCIPLE OF BRAIN ACTIVITY AND FUNCTIONAL SYSTEMS THEORY

E.E. Vityaev

Sobolev Institute of Mathematics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
e-mail: vityaev@math.nsc.ru

Summary

Two cognate notions are considered: *task* and *purpose*. It was argued by K. Samokhvalov and Y. Ershov in their «Contemporary philosophy of mathematics» that current problems in the foundations of mathematics are a consequence of the insufficient precision of the task notion. We set a mathematical task if we have criteria of verification of the task proof. It was proven that only in «weak» formal systems, where Gödel's incompleteness theorem cannot be applied, we can check whether a presented text is a proof of that task or not, using only capabilities of the system itself. This result produces a new approach to D. Hilbert's program of mathematics justification. We present similar considerations about the notion of purpose (goal), but only in cognitive and physiological sciences. We cannot achieve a goal without criteria of its achievement; otherwise, we can assume that the goal has already been achieved. The purpose definition implies the definition of the result of the purpose achievement: it is what we will get when the purpose is achieved and the criteria of achievement are satisfied. The functional systems theory (FST), developed by P.K. Anokhin and many other famous scientists of his school, is the only known theory, where notions of *purpose*, *result* and *purposeful activity* are the central notions and where the physiological mechanisms of their realizations are carefully investigated. Hence, FST is a physiological theory of brain activity, where purposefulness is the principle of its activity. We describe FST as the theory of purposeful activity.

Key words: purposefulness, brain, cognitive model, functional systems theory, behavior.

УДК 004.896:007.52

АДАПТИВНАЯ СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ МОБИЛЬНЫМ АГЕНТОМ В ФИЗИЧЕСКОЙ СРЕДЕ, ОСНОВАННАЯ НА ТЕОРИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

© 2014 г. **Н.И. Путинцев[1], О.В. Исупов[2], Е.Е. Витяев[1, 2]**

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия,
e-mail: putintsevnikita@gmail.com, cypt@hotmail.com;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт математики им. С.Л. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: vityaev@math.nsc.ru

Поступила в редакцию 26 мая 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Нами ранее была разработана система управления мобильным агентом, основанная на теории функциональных систем и семантическом вероятностном выводе (Витяев, 2008; Демин, Витяев, 2008). В данной работе была проведена ее адаптация к управлению роботом в физической среде. Такая адаптация, с одной стороны, демонстрирует способность системы работать в среде, приближенной к той, в которой функционируют животные, с другой, позволяет испытать разработанный алгоритм на реальных задачах. В ходе работы было выделено две задачи. Во-первых, необходимо было расширить возможности системы для эффективной работы в физической среде, в частности добавить поддержку непрерывных сенсоров, и поставить компьютерный эксперимент. Во-вторых, необходимо было распространить семантический вероятностный вывод на случай непрерывных сенсоров. Система была дополнена возможностью использовать датчики с непрерывным вещественным сигналом, а также варьировать продолжительность своих действий при выборе способа достижения цели. При этом возможность использования семантического вероятностного вывода сохранилась. Для проведения экспериментов в физической среде была сконструирована роботизированная платформа. Платформа может нести на себе несколько видов датчиков и передвигаться по командам, получаемым по беспроводной связи. Для демонстрации работоспособности в физической среде система управления робота должна была обучиться находить разбросанные в помещении блоки. Разработанный нами алгоритм позволил решить эту задачу и выработать набор правил для эффективного поиска блоков.

Ключевые слова: адаптивная система управления, мобильный агент, машинное обучение, теория функциональных систем.

ВВЕДЕНИЕ

Существует широкий круг работ, в которых исследуются адаптивные системы управления. Наиболее важными из них являются те, которые основаны на известных физиологических теориях. Одной из наиболее разработанных физиологических теорий является теория функциональных систем П.К. Анохина.

В настоящее время существует несколько адаптивных систем управления, разработанных на основе теории функциональных систем. Наиболее близкими к данной работе являются работы К.В. Анохина с соавт. (2002), В.Г. Редько с соавт. (Red'ko *et al.*, 2007) и А.А. Жданова (1999).

В работах А.А. Жданова была разработана система управления, основанная на предложенной им вероятностной модели нейрона (Жданов, 1999), которая близка по смыслу к разрабатываемому нами вероятностному семантическому выводу. На основе системы управления было

разработано несколько контроллеров различного назначения (Жданов, 1999) и проведена серия успешных экспериментов на роботах (например, Сыцко, 2005). В системе управления, разработанной Ждановым (1999), необходимо задавать структуру системы управления заранее, что ухудшает ее адаптивные свойства. Эта проблема частично решается применением эволюционных алгоритмов (Земских, 2004).

Система управления, разработанная К.В. Анохиным с соавт. (2002) и В.Г. Редько с соавт. (Red'ko *et al*., 2007) для формирования действий и прогнозирования результата использует нейронные сети. Настройка параметров нейронных сетей происходит при помощи обучения с подкреплением и эволюционного алгоритма. Основным отличием нашей работы является использование метода семантического вероятностного вывода вместо нейронных сетей. Потенциальные преимущества этого метода были описаны в работе Е.В. Михиенко (2003).

Исследование различных адаптивных систем, основанных на биологических теориях, с помощью роботов, функционирующих в физической среде, является распространенной практикой. Ярким примером могут служить «устройства на основе мозга» (brain-based devices), исследованные в работах J. Krichmar и G. Edelman (2005), Krichmar с соавт. (2005), J. Fleischer и J. Krichmar (2007). Наиболее известным семейством устройств на основе мозга является семейство роботов Darwin, разрабатываемое в The Neurosciences Institute in La Jolla, California с 1981 г. по 2007 г. в рамках проекта Nomad (Krichmar *et al*., 2005; Fleischer, Krichmar, 2007), с использованием опыта которого была построена экспериментальная часть нашей работы. В проекте Nomad также использовались роботизированные платформы с датчиками, перед системой управления ставились задачи, в которых она должна была проявлять адаптивное поведение. Основным отличием проекта Nomad от нашей работы является то, что их системы управления симулируют частные аспекты адаптивного поведения, например, ориентирование на местности, в то время как мы, опираясь на теорию функциональных систем, стараемся воссоздать общие принципы.

Нами ранее была разработана система управления мобильным агентом, основанная на теории функциональных систем и семантическом вероятностном выводе (Витяев, 2008; Демин, Витяев, 2008). Стоит также отметить, что в отличие от большинства других адаптивных систем, структура которых задается заранее (Жданов, 1999; Krichmar *et al*., 2005), наша система может перестраивать свою структуру в соответствии с условиями среды, в которой она находится.

Направлением развития нашей системы, которое выбрано в данной работе, является ее адаптация к управлению мобильным агентом в физической среде. Такая адаптация, с одной стороны, демонстрирует способность системы работать в среде, приближенной к той, в которой функционируют животные, с другой, – позволяет испытать разработанный алгоритм на реальных задачах.

В ходе работы было выделено две задачи. Во-первых, необходимо было расширить возможности системы для эффективной работы в физической среде, в частности добавить поддержку непрерывных сенсоров и поставить компьютерный эксперимент. Во-вторых, необходимо было распространить семантический вероятностный вывод на случай непрерывных сенсоров.

Системы управления, реализованные в предыдущих работах (Demin, Vityaev, 2006; Мухортов и др., 2012), использовали бинарные датчики и функционировали в пошаговом режиме, т. е. все действия агента имели одинаковую продолжительность. Однако большинство сенсоров, используемых в робототехнике, а также рецепторы живых организмов дают на выходе непрерывный сигнал. Кроме того, различные действия в реальном мире имеют разную протяженность во времени, что необходимо учитывать при выборе способа достижения цели. Система была дополнена возможностью использования датчиков с непрерывным вещественным сигналом, а также варьирования продолжительности своих действий при выборе способа достижения цели. При этом возможность использования семантического вероятностного вывода сохранилась.

Симуляция механики реального мира представляет собой трудную вычислительную задачу, которую, однако, не нужно выполнять, если в качестве агента использовать робота. Поэтому

для проведения экспериментов в физической среде была сконструирована роботизированная платформа. Она может нести на себе несколько видов датчиков и передвигаться по командам, получаемым по беспроводной связи.

В качестве эксперимента в физической среде роботизированная платформа, не имея какой-либо информации о назначении своих сенсоров и последствиях своих действий, должна была обучиться находить разбросанные в помещении блоки. Разработанный нами алгоритм позволил решить эту задачу и выработать набор для эффективного поиска блоков.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СИСТЕМЫ УПРАВЛЕНИЯ

Математическая модель разработанной нами системы основана на наших предыдущих работах (Demin, Vityaev, 2006; Демин, Витяев, 2008; Мухортов и др., 2012). Для того чтобы система управления могла работать с непрерывными вещественными сигналами датчиков и учитывать продолжительность действий агента, в модель были внесены некоторые изменения. Изменения в основном коснулись процесса формирования системы управления, при этом основные принципы ее работы сохранились.

Основные принципы работы

Коротко рассмотрим основные принципы работы системы управления. Будем предполагать, что система функционирует в дискретном времени $t = 0,1\ldots$

Агент имеет набор сенсоров $S_1, \ldots, S_n$, характеризующих состояние как самого агента, так и внешней среды. Показания каждого сенсора S_i являются действительной величиной, которая может принимать значения в некотором интервале $VS_i = (v_i^{\min}, v_i^{\max})$, где $v_i^{\min}$, $v_i^{\max}$ – минимальное и максимальное значения показаний сенсора S_i соответственно.

Агент располагает набором действий $A_i, \ldots, A_m$. Действия агента могут быть выполнены с различной продолжительностью Δt. Любое действие агента, начатое в момент времени t_i и выполняемое с продолжительностью Δt, может приводить в моменты времени $t_i + 1$, $t_i + 2$, …, $t_i + \Delta t$ к какому-либо изменению среды и, как следствие, к изменению показаний сенсоров. Для каждого действия задана максимально возможная продолжительность выполнения $\Delta t_{\max}$.

Поскольку агент получает информацию об окружающей среде только через сенсоры, то, с его точки зрения, состояние системы в момент времени t может быть представлено вектором показаний сенсоров $v(t) = (v_1, \ldots, v_n)$, где $v_i \in VS_i$ – показания i-го сенсора в момент времени t. Совокупность всех возможных состояний агента обозначим как $SS = (VS_1 \times VS_2 \times \ldots \times VS_n)$.

Вследствие того что сенсоры имеют физические ограничения и их возможностей не всегда достаточно для того, чтобы однозначно охарактеризовать текущее состояние окружающей среды, одно и то же действие, выполненное при одинаковых показаниях сенсоров, может переводить систему в несколько различных состояний. Таким образом, действие агента A_i может быть представлено как отображение, переводящее систему «агент–внешняя среда» из одного состояния в другое с некоторой вероятностью:

$$A_i(\Delta t) : (SS_i) \rightarrow (SS \times P),$$

где SS_i – подмножество состояний системы, в которых действие A_i осуществимо; Δt – продолжительность действия A_i; $SS \times P$ – множество пар вида (ss, p), где $ss \in SS$ – конечное состояние; $p \in [0,1]$ – вероятность перехода системы в одно из состояний этого множества из начального состояния $ss \in SS_i$ при выполнении действия A_i с продолжительностью Δt.

Разобьем интервалы показаний каждого сенсора VS_i на более мелкие интервалы $(vs_{i1}, \ldots, vs_{ik_i})$. Тогда вектором $ST = (vs_1, \ldots, vs_n)$ можно представить множество состояний $V = (v_1, \ldots, v_n)$ таких, что $v_1 \in vs_1, \ldots, v_n \in vs_n$.

Задачей агента является достижение некоторой цели. Зададим цель через вектор интервалов показаний сенсоров:

$$G = (vs_1, \ldots, vs_n).$$

Достижение цели агентом совершается при помощи функциональных систем. Функциональная система FS^{rank} может быть представлена набором:

$$FS^{rank} = (G^{rank}, R_1, \ldots, R_v, FS_1^{rank+1}, \ldots, FS_d^{rank+1}),$$

где G^{rank} – цель, достижение которой является основной задачей FS^{rank}, $R_1, \ldots, R_v$ – правила, FS_1^{rank+1} – подчиненные функциональные сис-

темы, соответствующие некоторым правилам из R_1, ..., R_v.

Правило R является преобразованием $ST_0 \xrightarrow[\hat{p}]{A(\Delta t)} ST_e$, где ST_0 – множество начальных состояний системы, заданное интервалами $(vs_1^0, ..., v_n^0)$; ST_e – множество конечных состояний, заданное интервалами $(vs_1^e, ..., v_n^e)$. Если правило принадлежит FS^{rank}, то $ST_e = G^{rank}$; A – действие агента; Δt – длительность выполнения этого действия; $\hat{p}$ – оценка вероятности, с которой действие A, выполненное с продолжительностью Δt, переводит систему из начального состояния в конечное.

Оценка вероятности $\hat{p}$ правила R рассчитывается следующим образом: если a – число случаев, когда агент в состоянии ST_0 выполнил некоторое действие, а b – число случаев, когда действие $A(\Delta t)$ перевело его из состояния ST_0 в состояние ST_e, то $\hat{p} = \frac{b}{a}$. Пару (a, b) будем называть статистикой правила.

Функциональная система FS^{rank} может формировать подчиненные системы FS^{rank+1}, задачей которых является достижение подцелей, включенных в начальное состояние одного из правил FS^{rank}. Пример иерархии изображен на рис. 1.

Для расчета оценки w_i^{rank} возможности достижения цели G^{rank} путем передачи управления подчиненной системе FS_1^{rank+1} используется тот факт, что цель G_i^{rank+1} является начальным состоянием некоторого правила вышестоящей системы $R_i^{rank} = G^{rank+1} \xrightarrow[\hat{p}_i]{A(\Delta t)} G^{rank}$. Это означает, что при достижении системой FS_1^{rank+1} своей цели G_i^{rank+1} цель G^{rank} системы FS^{rank} может быть достигнута с оценкой вероятности $\hat{p}_i$. Для того чтобы рассчитать w_i, нам необходимо учесть как $\hat{p}_i$, так и оценку w_i^{rank+1} возможности достижения цели G_1^{rank+1} системой FS_1^{rank+1}.

Расчет w_i^{rank+1} производит подчиненная система FS_1^{rank+1}. Для этого она, аналогично FS^{rank}, производит оценку возможности достижения своей цели G_i^{rank+1} для доступных ей способов достижения цели (использование собственного правила или передача управления). Оценка w_i^{rank+1} принимается равной максимальной из оценок этих способов. Расчет ведется рекурсивно. Рекурсия завершается на функциональных системах самого нижнего уровня, у которых нет подчиненных систем и они вынуждены либо выбрать правило и вернуть его оценку, либо вернуть ноль, сообщая тем самым, что у них нет подходящего правила. После расчета w_i^{rank+1} и $\hat{p}_i$ оценка w_i вычисляется как $w_i^{rank} = \gamma \cdot \min(\hat{p}_i, w_i^{rank+1})$, где γ – заданный коэффициент дисконтирования, лежащий в интервале от 0 до 1. Коэффициент γ нужен для того, чтобы более короткий план при одинаковой оценке вероятностей имел преимущество: чем быстрее достигается цель, тем лучше. Типичное значение γ в компьютерных экспериментах составляло 0,95.

Как было показано выше, в вычислении оценки w^0 могут участвовать различные функциональные системы разного уровня иерархии,

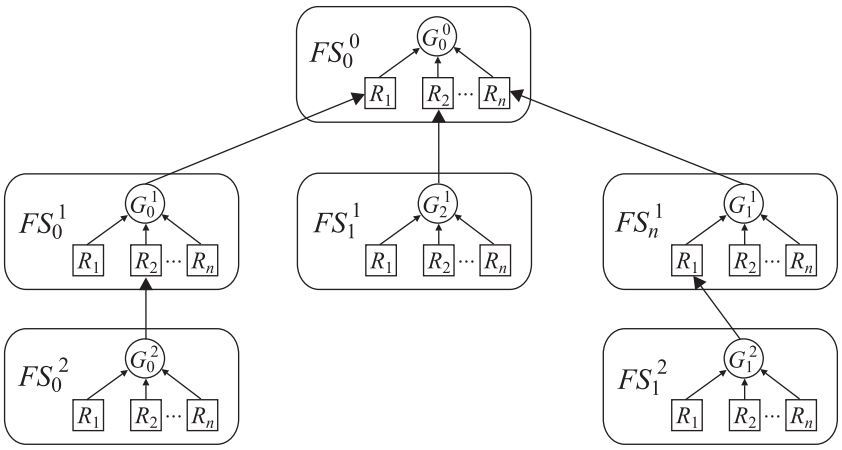


Рис. 1. Иерархия функциональных систем.

Fig. 1. The hierarchy of functional systems.

передающие управление друг другу. Каждой оценке w^0 достижения цели G^0 системой FS^0 верхнего уровня иерархии сопоставлена, кроме того, некоторая последовательность подчиненных друг другу функциональных систем FS^0, FS^1, …, FS^k и последовательность правил R^0, R^1, …, R^k, выбранных в этих функциональных системах для достижения их целей. Принятие решения осуществляется посредством выбора такой последовательности вызывающих друг друга функциональных систем и соответствующих правил, которая имеет максимальную оценку w^0. Таким образом, система FS^0 выбирает одну из многих последовательностей правил R^0, R^1, …, R^k, которые затем выполняются в порядке от k до 0 соответствующими функциональными системами.

Если некоторая функциональная система для достижения своей цели воспользовалась правилом R и цель этой функциональной системы была достигнута, то правило подкрепляется и к его статистике добавляется положительный опыт, иначе правило наказывается и к статистике добавляется отрицательный опыт. В случае если некоторая цель функциональной системой не достигнута, то вся система вызываемых функциональных систем перестраивается.

Формирование функциональных систем

Создание отдельной функциональной системы, ее правил, а также выделение подцелей и создание иерархии происходят при помощи механизма формирования функциональных систем.

Создание функциональной системы FS^{rank} происходит в три этапа:

1. Выделение цели G^{rank};

2. Построение правил R_1, ..., R_n достижения G^{rank};

3. Выделение подцелей G^{rank+1} и формирование подчиненных систем F^{rank+1}.

Этот процесс продолжается, пока не будет достигнут заданный уровень подчиненности $rank_{\max}$ или пока выделение подцелей не станет невозможным. Цель G^0 функциональной системы верхнего уровня задается извне. Цели G^{rank} для $rank > 0$ выделяются при помощи механизма генерации подцелей. Процесс время от времени перезапускается для обновления структуры системы управления.

Выделение подцелей и построение правил происходят при помощи статистических гиперкубов. Статистический куб GS^{A, ST_e} для некоторого множества состояний ST_e и действия A представляет собой многомерную таблицу размерностью $n + 1$. Первые n ее измерений соответствуют каждому из n сенсоров агента. Число интервалов по каждому из этих измерений равно числу разбиений интервала показаний соответствующего сенсора, которое задается извне. Размерность $n + 1$ служит для обозначения длительности действия. Количество ячеек этой размерности равно максимально возможной длительности действия $\Delta t_{\max}$.

Каждая ячейка гиперкуба GS^{A, ST_e} соответствует конкретному вектору интервалов показаний сенсоров $ST – (vs_1, ..., vs_n)$ и определенной продолжительности выполнения действия Δt. Ячейка содержит статистику (b, a) для правила $R = ST \xrightarrow[\hat{p}]{A(\Delta t)} ST_e$. Заполнение ячеек происходит на основании истории событий.

Событием $E = (V_0, V_e, A, \Delta t)$ назовем единичный факт перехода системы из состояния с показаниями сенсоров V_0 в состояние с показаниями V_e при выполнении действия A длительностью Δt. Агент регистрирует события и добавляет их в историю – упорядоченный во времени список событий. При рассмотрении события E в ячейку статистического гиперкуба $GS^{A, G}$, соответствующую показаниям V_0 и длительности действия Δt, заносится положительная статистика, если $V_e \in G$, и отрицательная – в противном случае.

Рассмотрим процесс выделения подцелей для системы FS^{rank}. Для каждого правила R_i системы FS^{rank} анализируется его начальное условие ST_0. Если ST_0 удовлетворяет приведенному ниже критерию формирования подцели, то для системы FS^{rank} создается подчиненная функциональная система FS^{rank+1}, целевым состоянием которой является ST_0. Критерием формирования подцели является наличие в статистике гиперкуба GS^{A, ST_0} для одного из действий A агента такой ячейки (b, a), что:

$$\frac{b}{a} > x \wedge a > y,$$

где x – пороговое значение оценки вероятности, а y – минимальное количество наблюдаемых событий. В ходе различных экспериментов были выбраны следующие значения: x = 0,4, y = 5. Эти значения зависят от процесса обучения и его продолжительности во времени. Приведенные значения были выбраны на основе компьютерных экспериментов.

Для построения правил системы FS^{rank} с целью G^{rank} используются статистические гиперкубы $GS^{A_i,G^{rank}}$ для каждого доступного действия A_i агента. Формирование правил происходит следующим образом:

1. Для каждого действия A_i фиксируется интервал показаний сенсоров ST, соответствующий некоторой ячейке $GS^{A_i,G^{rank}}$, и для всех возможных продолжительностей действия A_i по статистике рассчитываются оценки вероятности $p = \frac{b}{a}$. Затем выбирается такое действие A и его продолжительность Δt, чтобы величина оценки вероятности была наибольшей. Так, для всех интервалов показаний сенсоров ST формируются правила вида $R = ST \xrightarrow[\hat{p}]{A(\Delta t)} G^{rank}$.

2. Происходит обобщение интервалов показаний сенсоров, для которых отсутствует или собрано недостаточное количество статистики. Выдвигается гипотеза о том, что небольшое изменение показаний датчиков мало влияет на результат действия. Обобщение осуществляется следующим образом: из соседних ячеек извлекается и суммируется статистика достижения цели, затем на основании получившихся величин рассчитывается оценка вероятности обобщенного правила $R = ST_0 \xrightarrow[\hat{p}_i]{A(\Delta t)} G^{rank}$, где ST_0 – вектор объединенных интервалов показаний сенсоров, соответствующий рассматриваемым ячейкам.

3. Получившиеся правила обобщаются при помощи алгоритма семантического вероятностного вывода, который описан в работе Демина и Витяева (2008). Алгоритм позволяет избавиться от незначащих сенсоров и тем самым улучшить качество правил.

ЭКСПЕРИМЕНТЫ

Для проверки работоспособности предложенной системы управления были реализованы эксперименты в виртуальной и реальной среде.

Виртуальный мир (рис. 2) представлял собой ограниченную площадку, на которой случайным образом располагалась «пища». Ее «поедание» являлось основной целью агента. «Пища» и агент были представлены окружностями с фиксированным радиусом. «Пища» считалась съеденной, если окружность агента по завершении какого-либо его действия пересекалась с окружностью «пищи».

Агент располагал двумя непрерывными сенсорами: первый сообщал о расстоянии до ближайшего «съедобного» объекта, второй оценивал угол между направлением взгляда агента и этим объектом.

Агент мог выполнять три действия: движение в направлении взгляда, а также повороты налево и направо. Повороты и движение вперед выполнялись с заданной скоростью. Время выполнения действий регулировалось системой управления в рамках предложенной модели.

В начале эксперимента агент ничего не знал ни о назначении своих сенсоров, ни о возможных результатах действий. Методом «проб и ошибок» агент обучался эффективно собирать «пищу». Реализация предложенной модели системы управления за 50–100 действий способствовала вырабатывание идеального поведения: сначала агент одним действием поворачивался к ближайшему объекту, а затем вторым действием приближался к нему и «поедал».

Для демонстрации способности системы управления работать в физической среде был

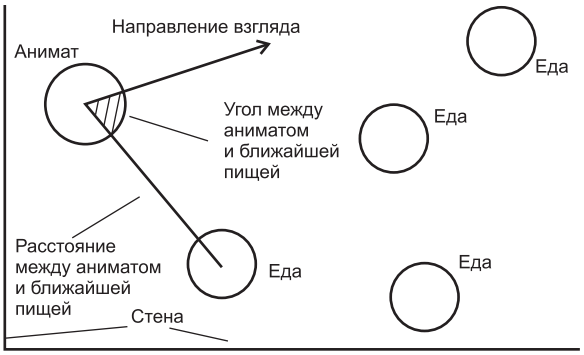


Рис. 2. Эксперимент в виртуальной среде.

Fig. 2. Experiment in the virtual environment.

придуман простой, но показательный эксперимент. Целью агента в этом эксперименте также являлся сбор «пищи».

В некоторой комнате размещались блоки, представляющие собой «пищу». В эту же комнату помещалась роботизированная платформа, управляемая предложенной нами системой. Целью системы управления являлся сбор «пищи». Пример расположения блоков и платформы показан на рис. 3.

На роботизированной платформе был установлен ряд сенсоров, которые давали системе управления частичную информацию о расположении блоков (рис. 3). Когда блок, находящийся в области видимости робота, оказывался достаточно близко, срабатывал специальный сенсор и блок считался «собранным». Системе управления были доступны три действия: поворот направо, поворот налево и движение вперед. Действия выполнялись с фиксированной скоростью. Длительность выполнения действий регулировалась системой управления.

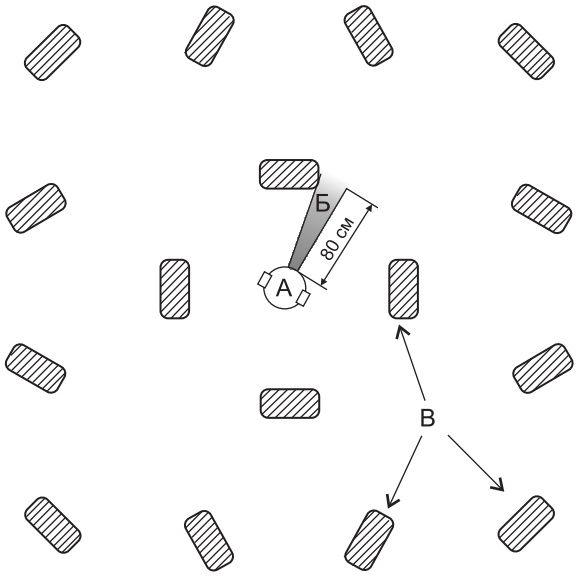


Рис. 3. Схема эксперимента в физической среде.

А – роботизированная платформа; Б – поле зрения платформы. Датчики позволяют роботу видеть на 80 см. Блок считается съеденным, если оказался в поле зрения ближе 10 см; В – блоки «еды».

Fig. 3. Experiment in the physical environment.

A – robotic platform; B – visual field of the robotic platform. Sensors allow robot to «see» in a range of 80 cm. A brick is considered to be eaten if it appears in the visual field closer than 10 cm to the robot; C – «Food» bricks.

В начале каждого эксперимента система управления ничего не знала ни о расположении блоков, ни о назначении сенсоров, ни о возможных результатах своих действий. В ходе эксперимента система должна была самостоятельно обучиться эффективно обнаруживать блоки.

Эксперимент проводился в два этапа: обучение и контроль. На этапе обучения агент в течение фиксированного времени исследовал окружающую среду, свои сенсоры, действия и их результаты. Во время обучения блоки и агент располагались произвольным образом. При «сборе» блока робот автоматически откатывался назад на неизвестное системе управления расстояние и поворачивался на некоторый случайный угол. Расстояние, на которое откатывался робот, увеличивалось в процессе обучения.

На этапе контроля блоки и обученный агент размещались показанным на рис. 3 образом. Когда робот «собирал» блок, эксперимент приостанавливался для удаления блока с поля. Контроль считался законченным, если робот собирал все блоки или если он не мог завершить сбор в течение десяти минут. Эффективность поведения агента оценивалась временем, затраченным на сбор блоков.

Роботизированная платформа

Для эксперимента на базе платы STM32VLDISCOVERY была разработана специальная роботизированная двухколесная платформа, оснащенная двумя наборами датчиков и Wi–Fi модулем для беспроводной связи с системой управления, запущенной на ПК.

Для ориентации в пространстве использовалось два типа датчиков. Первый из них представлял собой инфракрасный дальномер, позволяющий измерять расстояние до объекта в пределах от 10 до 80 см. Второй тип – бинарный датчик, реагирующий на приближение к объекту ближе 10 см. Всего использовалось по два датчика каждого типа. Датчики фиксировались так, чтобы обеспечивать роботу поле зрения, изображенное на рис. 3. Датчики разных типов были закреплены один над другим и объединены в пары. Внешний вид платформы представлен на рис. 4.

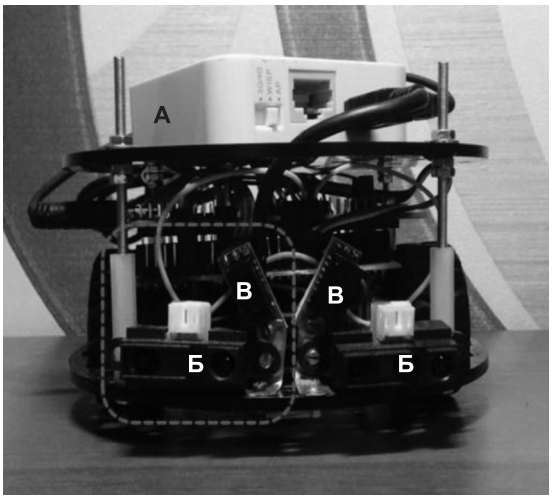


Рис. 4. Роботизированная платформа.
А – Wi–Fi модуль; Б – инфракрасные дальномеры; В – бинарные датчики дальности.

Fig. 4. Robotic platform.
A – Wi–Fi module; B – infrared proximity sensors; C – binary proximity sensors.

Результаты эксперимента в физической среде

В ходе экспериментов в систему управления был введен альтернативный способ оценки возможности достижения цели при передаче управления подчиненной функциональной системе.

В предыдущих работах (Demin, Vityaev, 2006; Демин, Витяев, 2008) оценка возможности достижения цели G^{rank} системой FS^{rank} путем передачи управления подчиненной системе FS_1^{rank+1} происходила следующим образом: пусть w_i^{rank+1} – оценка возможности достижения цели G_i^{rank+1}, подчиненной функциональной системой FS_1^{rank+1}; $\hat{p}$ – оценка вероятности правила R^{rank} системы FS^{rank}, условие которого является целью системы FS_1^{rank+1}, тогда итоговая оценка возможности достижения цели при передаче управления системе FS_1^{rank+1} вычислялась как $w_i = w_i^{rank+1} \cdot \hat{p}$. Произведение нескольких вероятностей давало малую величину. Такой способ оценки оказался неэффективным в физической среде. Из-за шумов в датчиках, ложных срабатываний, недочетов конструкции робота система управления верхнего уровня вырабатывала малоэффективные правила. Например, могло произойти срабатывание датчика близости без срабатывания дальномера, при этом подкреплялось следующее правило: двигаться вперед при слабом сигнале с дальномеров. Хотя это происходило очень редко, оценка такого правила часто оказывалась выше, чем рекурсивная оценка возможности достижения цели при передаче управления подчиненной системе с более эффективными правилами. Система управления могла довольно долго пользоваться таким правилом, прежде чем его оценка понижалась до уровня предпочтения подчиненных систем. Это серьезно замедляло процесс обучения.

В данной работе введен альтернативный способ оценки. Итоговая оценка вычисляется как $w_i^{rank} = \gamma \cdot \min(p_j, w_i^{rank+1})$, где γ – заданный коэффициент дисконтирования, лежащий в интервале от 0 до 1. Такой способ позволяет системе управления использовать подчиненные системы с хорошей оценкой достижения цели вместо правил систем верхних уровней иерархии с плохой оценкой. Коэффициент дисконтирования позволяет предпочитать хорошие правила верхнего уровня передаче управления подчиненным системам.

Эксперименты проводились для различных версий системы управления: рандомизированной системы управления, выбирающей случайные действия и их продолжительность; системы управления, использующей оригинальный способ оценки возможности достижения цели (Demin, Vityaev, 2006; Демин, Витяев, 2008), а также для системы управления с альтернативным способом оценки, приведенной выше. Для каждой системы проводилась серия из 10 экспериментов. Перед каждой серией экспериментов агенту отводился специальный период обучения, ограниченный 30 минутами. Продолжительность фазы контроля эксперимента ограничивалась 10 минутами. Производительность агента оценивалась временем, затраченным на сбор всех блоков «еды». Результаты сведены в таблицу, робот во время эксперимента изображен на рис. 5.

Из таблицы видно, что система управления способна эффективно собирать блоки, кроме того, введение нового способа прогнозирования улучшает ее производительность.

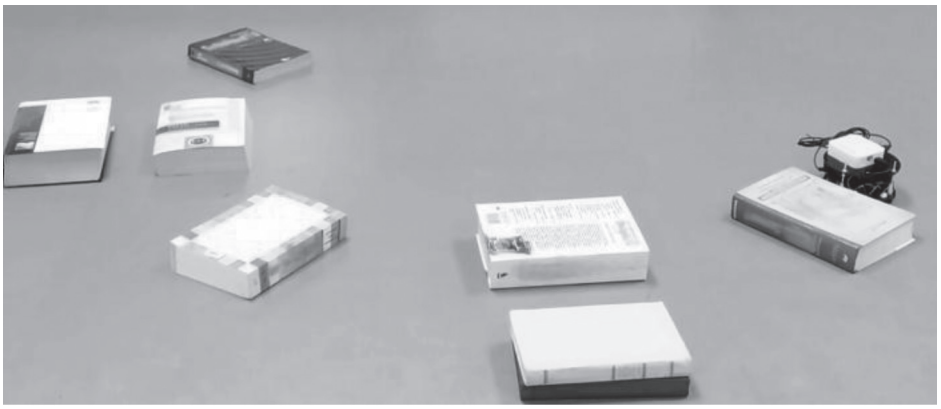


Рис. 5. Робот во время эксперимента.

Fig. 5. The robot during the experiment.

Таблица

Результаты экспериментов в физической среде

Тип системы управления	Время		
	среднее	минимальное	максимальное
Рандомизированная система	> 10 мин	> 10 мин	> 10 мин
с оригинальным способом оценки (Demin, Vityaev, 2006; Демин, Витяев, 2008)	6 мин	4 мин 40 с	> 10 мин
с предложенным выше альтернативным способом оценки	3 мин 40 с	3 мин 10 с	5 мин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система управления мобильным агентом, основанная на теории функциональных систем, была адаптирована к работе в физической среде. В систему была добавлена возможность использования вещественных и непрерывных сигналов датчиков, а также возможность учитывать и варьировать время выполнения действий. Был введен новый способ прогнозирования достижения цели, улучшающий работу в физической среде.

Система управления была протестирована при помощи виртуального эксперимента и эксперимента в физической среде. Для эксперимента в физической среде была разработана роботизированная платформа. В обоих экспериментах система показала хороший результат. В ходе экспериментов с роботом был выявлен и устранен ряд недостатков реализации алгоритма, а также продемонстрирована его способность решать задачи в физической среде.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта СО РАН № 136.

ЛИТЕРАТУРА

Анохин К.В., Бурцев М.С., Зарайская И.Ю., Лукашев А.О., Редько В.Г. Проект «Мозг Агента»: разработка модели адаптивного поведения на основе теории функциональных систем // Восьмая национальная конф. по искусственному интеллекту с междунар. участием. Тр. конф. М.: Физматлит, 2002. Т. 2. С. 781–789.

Anokhin K.V., Burtsev M.S., Zarayskaya I.U., Lukashev A.O., Red'ko V.G. Project «Agent Brain»: Development of adaptive behavior model based on functional systems theory // Vos'maja nacional'naja konf. po iskusstvennomu intellektu s mezhdunar.uchastiem. Trudi konferencii. M.: Fizmatlit, 2002. V. 2. P. 781–789. (In Russian).

Витяев Е.Е. Принципы работы мозга, содержащиеся в теории функциональных систем П.К. Анохина и теории эмоций П.В. Симонова // Нейроинформатика. 2008. Т. 3. № 1. С. 25–78. http://www.niisi.ru/iont/ni/Journal/V3/N1/Vityaev.pdf
Vityaev E.E. The principles of the brain from the Anokhin's theory of functional systems and P.V. Simonov's theory of emotions // Nejroinformatika. 2008. V. 3. No. 1. P. 25–78. http://www.niisi.ru/iont/ni/Journal/V3/N1/Vityaev.pdf (In Russian).

Демин А.В., Витяев Е.Е. Логическая модель адаптивной системы управления // Нейроинформатика. 2008. Т. 3. № 1. С. 79–109.
Demin A.V., Vityaev E.E. Logical model of the adaptive control system // Nejroinformatika. 2008. V. 3. No. 1. P. 79–109. (In Russian).

Жданов А.А. Метод автономного адаптивного управления // Изв. АН. Теория и системы управления. 1999. № 5. С. 127–134.
Zdanov A.A. Method of adaptive control // Izvestija Akademii Nauk. Teorija i sistemy upravlenija. 1999. No. 5. P. 127–134. (In Russian).

Земских Л.В. Возможности оптимизации системы автономного адаптивного управления с помощью генетических алгоритмов. М.: Препринт ИСП РАН, 2004.
Zemskih L.V. The possibility of autonomous adaptive control system optimization using genetic algorithms. M.: ISP RAS Preprint, 2004. (In Russian).

Михиенко Е.В. Логическая спецификация нейронных сетей // Науч. сессия МИФИ-2003. Нейроинформатика-2003 (V Всерос. науч.-техн. конф.). Теория нейронных сетей 2. С. 24–29.
Mikheenko E.V. Logical specification of neural networks // Scientific session of the Moscow Engineering Physics Institute-2003. Neuroinformatics-2003 (5th All-Russian Science and Technology Conference). Theory of neural networks . Nauch. sessija MIFI-2003. Nejroinformatika-2003 (V Vseros. nauch.-tehn. konf.). Teorija nejronnyh setej 2. P. 24–29. (In Russian).

Мухортов В.В., Хлебников С.В., Витяев Е.Е. Улучшенный алгоритм семантического вероятностного вывода в задаче 2-мерного агента // Нейроинформатика. 2012. Т. 6. № 1. С. 50–62. http://www.niisi.ru/iont/ni/Journal/V6/N1/MuhortovKhlebnikovVityaev.pdf
Mukhortov V.V., Khlebnikov S.V., Vityaev E.E. An improved algorithm of the semantic probabilistic inference for the 2-dimensional agent problem // Nejroinformatika. 2012. V. 6. No. 1. P. 50–62. http://www.niisi.ru/iont/ni/Journal/V6/N1/MuhortovKhlebnikovVityaev.pdf. (In Russian).

Сыцко А.В. Система управления автономным мобильным роботом на основе адаптивного резонанса // Матер. XXIX Акад. чтений по космонавтике. 2005. С. 93.
Sutsko A.V. The control system of autonomous mobile robot based on adaptive resonance // Mater. XXIX Akad. chtenij po kosmonavtike. 2005. P. 93. (In Russian).

Demin A.V., Vityaev E.E. Animal control system based on semantic probabilistic inference // Bul. of the Novosibirsk Computing Center, volume of A.P. Ershov Institute of Informatics Systems. Ser. Computer Science. I. 24. 2006. P. 57–72.

Fleischer J.G., Krichmar J.L. Sensory integration and remapping in a medial temporal lobe model during maze navigation by a brain-based device // J. Integr. Neurosci. 2007. V. 6. No. 3. P. 403–431.

Krichmar J.L., Edelman G.M. Brain-based devices for the study of nervous systems and the development of intelligent machines // Artificial Life. 2005. V. 11. No. 1/2. P. 63–78.

Krichmar J.L., Seth A.K., Nitz D.A., Fleischer J.G., Edelman G.M. Spatial navigation and causal analysis in a brain-based device modeling cortical-hippocampal interactions // Neuroinformatics. 2005. V. 3. No. 3. P. 197–222.

Red'ko V.G., Anokhin K.V., Burtsev M.S., Manolov A.I., Mosalov O.P., Nepomnyashchikh V.A., Prokhorov D.V. Project «Animat Brain»: Designing the animat control system on the basis of the functional systems theory // Anticipatory Behavior in Adaptive Learning Systems: From Brains to Individual and Social Behavior / Eds M.V. Butz, O. Sigaud, G. Pezzulo, G. Baldassarre. LNAI 4520, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2007. P. 94–107.
http://www.niisi.ru/iont/ni/Journal/V3/N1/DeminVityaev.pdf

ADAPTIVE CONTROL SYSTEM FOR A MOBILE AGENT IN PHYSICAL ENVIRONMENT BASED ON THE FUNCTIONAL SYSTEMS THEORY

N.I. Putintsev[1], O.V. Isupov[2], E.E. Vityaev[1, 2]

[1] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia,
e-mail: putintsevnikita@gmail.com, cypt@hotmail.com;
[2] Sobolev Institute of Mathematics SB RAS, Novosibirsk,
e-mail: vityaev@math.nsc.ru

Summary

Earlier we developed an adaptive mobile agent control system based on the functional systems theory and semantic probabilistic inference (Vityaev, 2008; Demin, Vityaev, 2008). In the present work, we extended the potential of the system by introducing the ability to control a robot in physical environment. On the one hand, this ability shows that the system can act in a real environment. On the other hand, it allows us to test the developed algorithm on actual physical problems. We identified two objectives. The first was to extend the capabilities of the system so that it could work effectively in the physical environment. In particular, it was necessary to add support for continuous sensors and conduct a simulated experiment. The second task was to extend the semantic probabilistic inference to the work with continuous sensors. We added the ability to use sensors with a continuous real signal and vary the duration of its actions while achieving the goal. The benefits of the semantic probabilistic inference were preserved. We constructed a robotic platform for experiments in the physical environment. The platform could carry several types of sensors and move executing commands received wirelessly. To show the ability to act in the physical environment the system was supposed to learn how to find bricks scattered around the room. Initially, the system did not know neither about the sensors available to it nor about the possible outcome of its actions. During the experiments, the control system generated rules for the effective detection of bricks and proved its efficiency.

Key words: adaptive control system, mobile agent, machine learning, functional systems theory.

УДК 576.333:004.81

АНАЛИЗ КОГНИТИВНЫХ СВОЙСТВ НЕЙРОННЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

© 2014 г. **О.В. Вишневский[1, 2], Н.И. Путинцев[1], Т.А. Запара[3], А.С. Ратушняк[3]**

[1] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: ratushniak.alex@gmail.com

Поступила в редакцию 17 октября 2014 г. Принята к публикации 5 ноября 2014 г.

Решение задач реинжиниринга когнитивных систем, т. е. разработки устройств, обладающих когнитивными свойствами, на основе их биологических прототипов, невозможно без понимания особенностей архитектуры биологических систем, информационных свойств и молекулярной организации основных элементарных ячеек, образующих эту архитектуру, – нервных клеток. Создание аналогов обучения позволяет исследовать активность отдельных клеток не только в условиях поведенческих реакций с естественными стимулами, но и в опытах на изолированных препаратах с использованием как раздражений периферических образований, так и воздействий на отдельные структуры клеток. Нами разработан программно-инструментальный комплекс NeuroFeedBack, включающий в себя систему живых нейронов и нейрокомпьютерный интерфейс с обратной связью. Комплекс обеспечивает прием и обработку входных сигналов, поступающих с нейронов, их визуализацию и хранение, а также формирование выходных подкрепляющих стимулов на нейроны. С помощью этого комплекса проведен анализ функциональной активности нейронов из правого париетального ганглия моллюска *Lymnaea stagnalis* в рамках трех моделей подкрепления. Показано, что в условиях биологической обратной связи происходит оптимизация активности нейрона, дающая ему возможность минимизировать количество получаемых подкрепляющих стимулов. Полученные результаты позволили создать гибридную роботизированную систему, в которой живые нейронные системы с помощью нейрокомпьютерного интерфейса способны решать навигационные задачи, управляя в реальном времени электронно-механическим устройством, функционирующим в реальных времени и среде. Так, использование предложенных программ подкрепления позволило гибридному роботу находить светящуюся лампочку и достигать ее в течение нескольких минут.

Ключевые слова: нейрон, нейронные системы, когнитивные свойства, биологическая обратная связь, гибридный робот.

ВВЕДЕНИЕ

При непрерывно возрастающем количестве информационных потоков возникает проблема их обработки, анализа, принятия решений, предсказания последствий этих решений. Осуществление таких когнитивных задач является насущной необходимостью во всех областях жизнедеятельности человека. При этом информационные мощности современных систем обработки данных последовательного типа в известной мере приближаются к предельным

возможностям, и понятно, что существующие концепции их развития требуют серьезных изменений. Наиболее важной задачей представляется разработка новых биологически инспирированных архитектур и информационных устройств, в том числе обладающих таким свойством, как когнитивность (лат. *cognitio*, познание, изучение, осознание, способность к восприятию, переработке, хранению внешней информации, познанию внешней среды, ориентировке в ней и т. д.). В многочисленных многоуровневых определениях когнитивности редко учитывается то, что в ее основе лежат стабилизация гомеостаза объекта, понижение внутренней энтропии за счет опережающего отражения, предсказания состояния внешней среды и внутриклеточных систем. Поэтому целью работ, необходимых для реинжиниринга, т. е. конструирования на основе биологических прототипов, молекулярных информационных устройств, представляется выявление особенностей архитектуры биологических систем, информационных свойств и молекулярной организации основных элементарных ячеек, образующих эту архитектуру, – нервных клеток. Одним из подходов, который позволяет проводить такие исследования, является создание аналогов обучения (Кэндел, 1980). Такие аналоги позволяют исследовать активность отдельных клеток не только в условиях поведенческих реакций с естественными стимулами, но и в опытах на изолированных препаратах с использованием как раздражений периферических образований, так и воздействий на отдельные структуры клеток. При этом эффект, регистрируемый в эксперименте, оценивается по изменению поведенческих проявлений, а чаще по характеру пластических изменений, вызванных применяемыми воздействиями. Под пластическими изменениями понимают относительно устойчивые функциональные перестройки в системах нейронов, которые превышают по длительности время обычных синаптических и импульсных процессов и определяют эффективность и направленность межнейрональных связей (Костюк, 1983). Пластичность проявляется в изменении реактивности к раздражителю при его повторных воздействиях или ассоциации с действием других факторов и является основной и наиболее специфической функциональной характеристикой нервных клеток (Котляр, 1986). Клеточные аналоги обучения для изучения мембранных механизмов пластических реакций разрабатывались с использованием нейронов моллюсков (Alkon, 1984; Balaban *et al*., 2004). Теоретико-экспериментальный анализ информационных свойств, функциональной архитектуры и молекулярных конструкций нейронов и нейронных систем, лежащих в основе когнитивности, является актуальной задачей.

Подходом, ориентированным на решение такой задачи, является создание гибридных комплексов, включающих живые нейроны или простые нейронные системы, управляющие техническими устройствами или компьютерными эмуляциями (DeMarse *et al*., 2001; Shkolnik, 2003; Bakkum *et al*., 2004, 2007; Cozzi *et al*., 2005; Kudoh *et al*., 2006, 2011; Novellino *et al*., 2007; Hayashi *et al*., 2010, 2011; Mussa-Ivaldi *et al*., 2010; Warwick *et al*., 2010; Tessadori *et al*., 2012). Это позволяет приблизить условия существования нейронов *in vitro* к естественным путям организации обратных связей через окружающую среду. При этом в случае достаточно развитого интерфейса нейрон как молекулярная информационная машина может встраиваться в системы управления и оптимизировать работу технических устройств. Анализ работы нейрона в таких условиях, возможно, позволит экспериментально уточнить характеристики ключевых информационных процессов в живой клетке.

МЕТОДЫ

Работа проведена на изолированных центральных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* в возрасте 0,5–1,5 лет. Регистрировалась активность нейронов из правого париетального ганглия (рис. 1), входящих в систему центрального контроля дыхательной активности.

Методика получения изолированных ганглиев и нейронов описана в работе М.А. Костенко (1972). Эксперименты проводились с помощью аппаратно-программного комплекса (рис. 2).

Регистрация спонтанной и вызванной импульсной активности нейронов осуществлялась стеклянными внутриклеточными микроэлектродами, заполненными 2,5 М KCl (сопротивление 5–15 Мом при диаметре кончика 0,5–1 мкм).

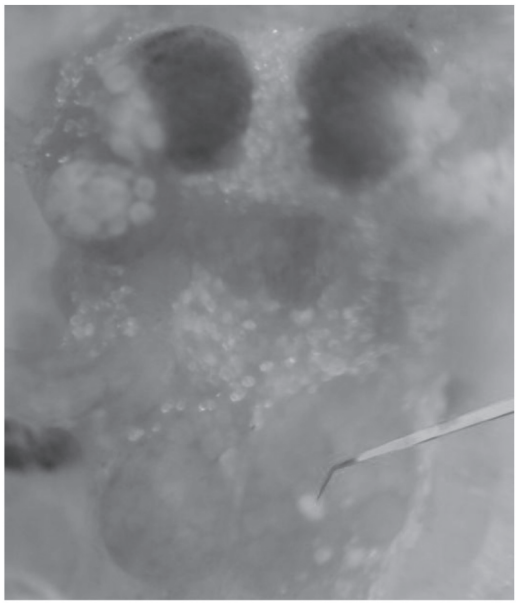


Рис. 1. Центральный ганглий моллюска *Lymnaea stagnalis* с введенным в нейрон правого париетального ганглия внутриклеточным микроэлектродом.

Fig. 1. Central ganglia of *Lymnaea stagnalis* with an intracellular microelectrode introduced into a neuron of the right parietal ganglion.

Поиск фоновоактивных нейронов проводился под визуальным контролем трехкоординатным шаговым микроманипулятором (PatchStar Scientifica). Визуализация рабочего поля достигалась с помощью оптической системы. Импульсная активность усиливалась, преобразовывалась аналого-цифровым преобразователем (LCard) и поступала в управляющий комплекс на базе ЭВМ, где осуществлялись обработка сигнала и программное построение подкрепляющих стимулов, подаваемых на внутриклеточный электрод с помощью цифро-аналогового преобразователя. Длительность подкрепляемых раздражением межимпульсных интервалов (МИ) определялась их средней продолжительностью на контрольном фоновом участке, а амплитуда стимулов, подаваемых с цифро-аналогового преобразователя, выбиралась ниже уровня, оказывающего непосредственное тормозящее или возбуждающее влияние на импульсную активность исследуемого нейрона.

Использованы несколько алгоритмов формирования стимулов. В качестве программы

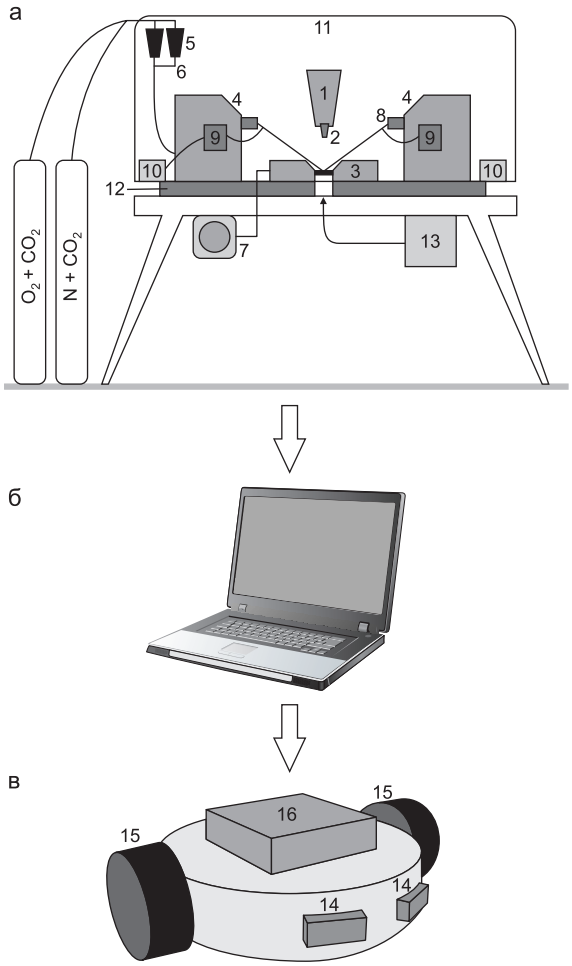


Рис. 2. Схема аппаратно-программного комплекса для анализа функциональной активности нейронов и нейронных систем.

а – комплекс регистрации и анализа нейрональной активности. 1 – видеокамера; 2 – оптическая система; 3 – камера для культивирования нейронов; 4 – микроманипуляторы; 5, 6 – проточная система поддержания физиологического состава среды; 7 – насос проточной системы; 8 – микроэлектроды; 9, 10 – усилители-преобразователи сигнала; 11 – экранированная камера с электромагнитным экраном; 12 – виброзащитный стол; 13 – осветитель со световодом. б – система управления. Аппаратный комплекс визуализации и контроля нейрональной активности. в – гибридный робот. 14 – датчики света гибридного робота; 15 – сервоприводы робота; 16 – Wi-Fi модуль.

Fig. 2. System for the analysis of the functional activity of neurons and neural systems.

a – complex for the registration and analysis of neuronal activity. 1 – camcorder; 2 – optical system; 3 – chamber for culturing neurons; 4 – micromanipulators; 5, 6 – flow system maintaining the physiological composition of the medium; 7 – pump; 8 – microelectrodes; 9, 10 – signal amplifier-converters; 11 – shielded chamber with an electromagnetic shield; 12 – vibration-proof table; 13 – fiber illuminator. b – control system. Hardware system for visualization and control of neuronal activity. c – hybrid robot. 14 – light sensors of the hybrid robot; 15 – robot actuators; 16 – Wi-Fi module.

выработки нейрональной пластической реакции была выбрана модель с автостимуляцией (Василевский и др., 1972; Ратушняк и др., 1976). При этом вне клеточной системы организовывалась обратная связь, позволяющая нейрону своим выходным сигналом корректировать работу внешних устройств, изменяя программу подачи стимулов. В экспериментах, проведенных на спонтанно активных клетках, управляющим параметром являлась длительность межимпульсных интервалов. Использовались два варианта формирования стимулов. В первом варианте (подкрепление длинных МИ) применяли подпороговую стимуляцию, которая вызывала смещения мембранного потенциала (МП) на 1–2 мВ и подавалась спустя время, равное средней фоновой длине МИ до начала стимуляции, и продолжалась до следующего за этим эндогенным потенциалом действия (ПД) нейрона (рис. 3, а). Во второй серии экспериментов (подкрепление коротких МИ) включение подпороговой стимуляции происходило спустя интервал, равный 5–10 % от среднего МИ, вычисленного на фоновом участке работы нейрона (рис. 3, б), а выключение стимуляции – по достижении среднего фонового значения МИ либо при возникновении следующего эндогенного ПД.

При ассоциированном воздействии (рис. 4) характеристики первого из сигналов, подаваемого на внутриклеточный микроэлектрод, подбирались по ответной реакции. Условием являлось появление небольших (0,1–2 мВ) подпороговых колебаний МП на стимул.

Второй сигнал подавался с задержкой, и его характеристики (амплитуда и длительность) выбирались из условия получения клеточного ответа – ПД на каждое предъявление сигнала

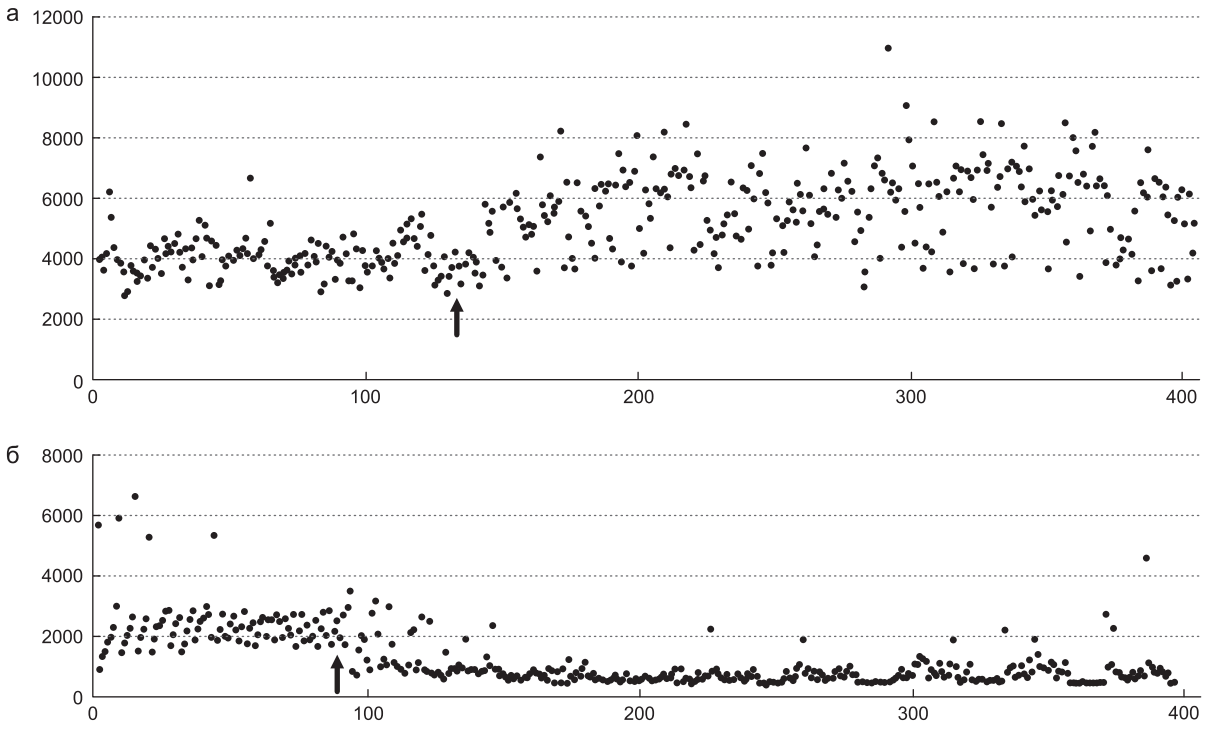


Рис. 3. Пример развития реакции нейрона на автоподкрепления подпороговой стимуляцией, согласно модели подкрепления коротких (а) и длинных (б) МИ.

а – первая серия экспериментов; б – вторая серия экспериментов. ↑ – начало стимуляции. По оси ординат – значение межимпульсного интервала; по оси абсцисс – время (в секундах).

Fig. 3. Example of a neuron response to subthreshold stimulation by biofeedback in the mode with short (a) and long (b) intervals between action potentials.

a – the first series of experiments; b – the second series of experiments. ↑ – the beginning of stimulation; X-axis, time, s; Y-axis, interpulse interval.

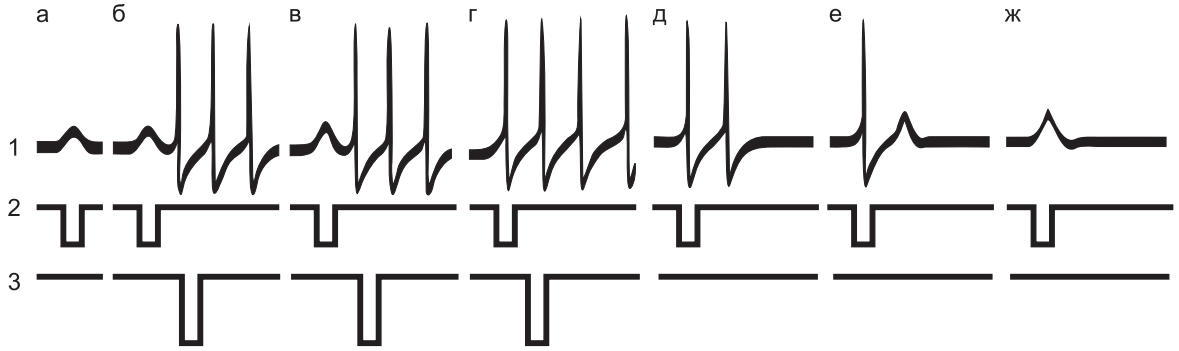


Рис. 4. Схема эксперимента по изучению характеристик нейрональной активности в модели ассоциативной стимуляции.

а – изменение мембранного потенциала в ответ на подпороговую стимуляцию; б – ответы нейрона на парную подпороговую и надпороговую стимуляцию, ПД наблюдается только в ответ на надпороговый стимул; в – в результате применения первых 15–60 сочетанных стимулов происходит увеличение амплитуды подпорогового ответа; г – генерация ПД на исходно подпороговые стимулы после 20–30 парных стимулов; д – устойчивая генерация ПД при продолжении стимуляции только изначально подпороговыми стимулами; е – постепенное угасание ответов на первый стимул, в отсутствие второго (надпорогового); ж – прекращение генерации ПД. 1 – ответы нейрона; 2 – входной подпороговый стимул; 3 – входной надпороговый стимул.

Fig. 4. Design of the study of neuronal activity in the associative stimulation model.

a – subthreshold stimuli alter the membrane potential; b – in paired stimulation (a subthreshold stimulus followed by a suprathreshold one), action potential (AD) is induced in response only to the suprathreshold stimulus; c – application of the first 15–60 paired stimuli results in an increase in the response to the suprathreshold stimulus; d – action potential is induced in response to initially subthreshold stimuli after the subsequent 20–30 paired stimuli; e – continuation of stimulation only with initially subthreshold stimuli consistently evokes AP; f – step-by-step decay of the responses to the first stimulus with the absence of the second (suprathreshold) stimulus; g – termination of AP generation. 1 – neuron responses; 2 – the input subthreshold stimulus; 3 – the input suprathreshold stimulus.

(рис. 4, а). То есть он гарантированно приводил к срабатыванию большинства ионных каналов клетки.

Для решения задач регистрации в реальном времени нейрональной активности, ее анализа и формирования подкрепляющего сигнала в соответствии с одной из трех использованных нами моделей был разработан программный комплекс HubroFeedBack, созданный с помощью среды Microsoft Visual Studio с использованием библиотеки Lusbapi. Он включал в себя модули: а) выделения потенциала действия из входного потока (усиленного сигнала, получаемого с внутриклеточного электрода, введенного в нейрон); б) оценки текущего межимпульсного интервала; в) оценки среднего текущего межимпульсного интервала (усредненный МИ, полученный в течение 5 с); г) оценки среднего фонового межимпульсного интервала (усредненный МИ, полученный в течение 5 мин на нейронах без стимуляции); д) формирования подкрепляющих стимулов, подаваемых по обратной связи на внутриклеточный электрод, согласно одной из трех моделей подкрепления. В качестве таких стимулов могли выступать как отдельные импульсы требуемой длины и амплитуды, так и серии импульсов заданной частоты. Визуальное наблюдение за входным и выходным потоками осуществлялось с помощью программы PowerGraph. Выделение программой потенциала действия сопровождалось звуковым сигналом, что облегчало исследователю оценку хода эксперимента и настройки параметров системы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования нами проанализированы 68 нейронов из правого париетального ганглия *Lymnaea stagnalis*, обладающих спонтанной активностью и способных отвечать на стимул (Kyriakides *et al*., 1989; Syed *et al.*, 1990).

Было показано, что при применении подпороговой стимуляции, зависящей от функциональной активности клетки, эта активность изменялась в 91 % случаев.

При этом изменение активности нейронов в модели стимуляции подкрепления длинных МИ в 19 % случаев сопровождалось уменьшением длительности межимпульсных интервалов. В 8 % длительность интервалов увеличивалась, а в 73 % – оставалась неизменной или изменялась разнонаправленно.

При применении модели подкрепления коротких МИ в 21 % случаев происходило увеличение длительности межимпульсных интервалов. В 5 % случаев длительность интервалов уменьшалась, а в 74 % – оставалась неизменной или изменялась разнонаправленно. При этом наблюдался различный характер перестроек активности, от монотонного до двух- и многофазного. Применение стимуляции, согласно ассоциативной модели, в 14 % случаев приводило к перестройке ответов на подпороговый стимул.

Функциональная пластичность нейронов при автостимуляции

Пластические реакции при автостимуляции были выбраны с целью приблизиться к оценке основных функциональных свойств нейрона как активной системы. Работа проведена на спонтанно активных клетках, генерирующих потенциалы действия без преднамеренных воздействий экспериментатора. Длина межимпульсных интервалов в таком фоновом потоке, как правило, несколько варьирует от импульса к импульсу. В исходном потоке рассчитывалось фоновое среднее значение МИ, которое в дальнейшем использовалось как пороговое в программах подкрепления. Использовались две программы внешней обратной связи, вызывающей автостимуляцию – подкрепление длинных и подкрепление коротких межимпульсных интервалов. При этом в первом случае на клетку подавался стимул, который вызывал подпороговый сдвиг МП на 1–2 мВ (порог генерации ПД при деполяризации 5–7 мВ) в том случае, если длина межимпульсного интервала превышала заданный порог. Во втором случае подпороговый стимул следовал спустя время, равное 5–10 % от значения фонового среднего МИ, рассчитанного на участке до включения стимуляции. Выключение стимуляции происходило по достижении среднего фонового значения МИ либо при появлении следующего ПД. При таких режимах стимуляции подкрепление длинных интервалов приводило к переходу клетки в режим более частой генерации ПД (сокращения МИ) (рис. 3, б). При подкреплении коротких интервалов значение МИ увеличивалось (рис. 3, а). При такой стимуляции клетка в ряде случаев переходила в режим генерации пачек, состоящих из 3–7 импульсов, разделенных интервалом между пачками, превышающим пороговое значение. При этом наблюдалось уменьшение суммарного количества вызванных подкреплений. Можно отметить, что, как правило, такое уменьшение суммарного количества вызванных подкреплений наблюдалось для обеих примененных моделей стимуляции.

В работе Я.И. Вербного и А.Я. Могилевского (1993) внутриклеточная стимуляция нейронов также была «привязана» к определенным временным компонентам спонтанной активности. Однократный надпороговый стимул подавался в случае, если МИ оказывался больше или меньше средних фоновых МИ. Организованная таким образом внешняя стимуляция, ассоциированная с определенными компонентами эндогенной ритмики, позволяет, по мнению авторов, рассматривать ее как ассоциативную внутриклеточную стимуляцию. Только ассоциативная, а не случайная или ритмическая стимуляция в эксперименте позволяла клетке реализовать адаптивные перестройки спайковой активности (Вербный, Могилевский, 1993). Данные о влиянии как над-, так и подпороговой внутриклеточной стимуляции свидетельствуют о том, что адаптивные перестройки – оптимизация внешних воздействий – могут происходить помимо пластических синаптических изменений. В этой работе применялась надпороговая стимуляция, вызывавшая генерацию ПД и, вероятно, метаболические изменения в нейроне. В наших экспериментах применение подпороговых стимулов можно рассматривать как информационное воздействие на клетку. Вероятно, внутриклеточная стимуляция, соотнесенная с определенными временными компонентами спонтанной активности, может вызвать активацию механизмов эндонейрональной пластичности (Mozzachiodi, Byrne, 2010).

Функциональная пластичность нейронов при сочетанных локальных и генерализованных воздействиях (ассоциативное обучение)

Раздражение сомы подпороговыми воздействиями проводили внутриклеточной стимуляцией по алгоритму, приближенному к выработке условного рефлекса (рис. 4). Параметры подпороговых стимулов подбирали так, чтобы первоначально они вызывали только подпороговые ответы (рис. 4, а). Амплитуда подпороговых ответов при этом не превышала 1–3 мВ (потенциал покоя нейронов –55 ÷ –70 мВ). Параметры надпороговых стимулов через внутриклеточный электрод подбирали так, чтобы их применение вызывало генерацию 1–2 ПД. Подпороговый и надпороговый стимулы наносили попарно: подпороговый подавали первым и через определенный интервал (50–100 мсек) подавали надпороговый стимул. Время, за которое МП нейрона (после генерации ПД) возвращался к потенциалу покоя (ПП), определяло выбор этого интервала. В каждом конкретном случае для определения межстимульного интервала на микроэлектроды подавали стимул, вызывающий ПД. Нанесение парных стимулов было нерегулярным, с интервалом между парами 5–15 с.

В 69 % случаев многократное применение подпорогового электрического стимула (в сочетании с надпороговым) сопровождалось изменением нейрональной реакции. В результате применения первых 15–60 сочетанных стимулов происходило увеличение амплитуды подпорогового ответа (рис. 4, б). При продолжении стимуляции на исходно подпороговые стимулы нейрон начинал отвечать генерацией ПД (рис. 4, в). На этой стадии (с 20–30 стимула) ПД могли чередоваться с подпороговыми ответами. После 30–35 сочетанных стимулов генерация ПД в ответ на ранее неэффективный стимул становилась более регулярной. Стимул вызывал генерацию ПД (ответ на второй стимул пары при этом не изменялся). Продолжение стимуляции только ранее подпороговыми стимулами приводило к устойчивой генерации ПД (рис. 4, г). В наших экспериментах в 14 % случаев такая стимуляция не вызывала возвращения к исходной подпороговой реакции в течение значительного времени. Для того чтобы определить время, в течение которого сохраняются модификации ответа нейрона, на участок сомы подавали одиночные стимулы (с интервалом 0,5–1 мин). Обнаружили, что модификация ответа (на первоначально подпороговый стимул) сохранялась в течение 5–7 мин (20–80 стимулов). Затем ответы на стимул постепенно угасали и становились подпороговыми (рис. 4, д, е), как это и было до проведения парной стимуляции. Интересно отметить, что в 17 % случаев ответ на второй (надпороговый) стимул пары изменялся – он становился подпороговым.

Важно отметить, что такие модификации нейрональной активности, индуцируемые как одиночной, так и парной стимуляцией, не вызывали изменений ПП сомы нейрона. То есть они обусловлены не простым смещением мембранного потенциала, а, вероятно, сложными перестройками внутриклеточных сигнальных систем.

Разработка гибридной роботизированной системы

Описанные выше подходы были использованы для создания гибридной системы, в которой живой нейрон смог бы управлять электронно-механическим устройством, маневрирующим в реальной среде и решающим такие навигационные задачи, как, например, достижение источника света. Для этой цели на базе платы STM-32VL-DISCOVERY была разработана роботизированная платформа, представляющая собой круглую тележку (рис. 5), снабженную двумя двигателями и оснащенную датчиками света, установленными в передней части тележки. Сигналы с этих датчиков передавались на центральный компьютер с помощью Wi-Fi роутера TP-Link TL-MR3020. Через него же с компьютера на двигатели тележки подавались управляющие команды. Связь осуществлялась с использованием протокола IP через сокеты Windows. Для взаимодействия центрального компьютера с нейроном использовался аналого-цифровой и цифро-аналоговый преобразователь LCard E-154, работавший на частоте 5 кГц.

Для обеспечения управления гибридным роботом, обработки входных сигналов (получаемых с фотодатчиков и нейрона) и формирования выходных сигналов (как на двигатели

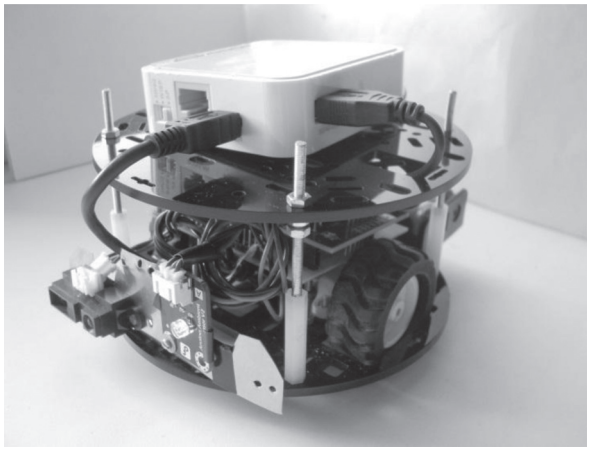


Рис. 5. Роботизированная платформа.

Fig. 5. The hybrid robot in its environment.

тележки, так и на внутриклеточный микроэлектрод) в программный комплекс HubroFeedBack были добавлены сокет-модули получения сигнала с фотодатчиков и передачи управляющих команд на двигатели по протоколу IP. Задачей робота было обнаружение источника света и приближение к нему на минимальное расстояние. При этом управление тележкой осуществлялось живым нейроном, а компьютерная система выступала в роли связующего и декодирующего интерфейса. Система работала следующим образом. Как только программа обнаруживала генерацию нейроном потенциалов действия (возникающих в ходе его спонтанной активности), включался левый двигатель, который начинал вращать тележку с фотодатчиками вокруг своей оси, обеспечивая круговой поиск источника света со скоростью ~ 0,5 об/мин (т. е. робот делал полный оборот за 30 с). Как только величина сигнала, получаемого с фотодатчика, превышала пороговое значение, соответствующее уровню светового шума, на нейрон начинали подаваться подкрепляющие стимулы. Подкрепление проводилось в соответствии с одной из двух моделей автостимуляции (подкрепление длинных и подкрепление коротких межимпульсных интервалов). В соответствии с этими моделями нейрон начинал модифицировать свою импульсную активность и укорачивать или, соответственно, удлинять межимпульсные интервалы. При этом оценивалось отношение средней текущей величины МИ (усредненный МИ, полученный в течение 5 с) к величине фонового среднего МИ. Как только эта величина превышала 1, включался правый двигатель тележки. Скорость его работы соответствовала ~ 0,75 об/мин. Таким образом, тележка начинала движение вперед с некоторой дугой в левую сторону. Как только свет от источника переставал попадать на фотодатчики и сигнал с них, соответственно, оказывался ниже порогового значения, подкрепляющий сигнал переставал поступать на нейрон и тот через некоторое время возвращал МИ к своему первоначальному фоновому значению. Это приводило к отключению правого двигателя, повороту тележки вправо и поиску источника света. Такая последовательность действий продолжалась до тех пор, пока тележка не приближалась к источнику света – лампочке в 20 Вт. Несмотря на спонтанное варьирование нейроном своего МИ, а также относительно большие времена перестройки МИ нейроном, использованные нами параметры системы и предложенный алгоритм поиска позволяли гибридному роботу уверенно решать поставленную задачу. Так, в случае выключения фотосенсоров или подкрепляющих стимулов перемещение робота было совершенно хаотичным, и приблизиться к источнику света ему не удавалось даже в течение десятков минут. Включение программ подкрепления приводило к достижению гибридным роботом лампочки в течение нескольких минут. При этом оказалось, что обе использованные модели подкрепления имеют примерно одинаковые эффективность и скорость решения поставленной задачи.

Можно отметить, что хотя использованный нами подход является крайне упрощенным, он, тем не менее, демонстрирует реальную способность живых нейронов управлять электронно-механическими устройствами, решающими навигационные задачи в реальной среде. Кроме того, в рамках данной работы мы не использовали в управлении гибридным роботом ассоциативной модели, сходной с выработкой условного рефлекса у сложных организмов. Фактически результатом этой части нашего исследования является создание удобной платформы для разработки гибридных систем, включающих в себя живые нейроны или группы нейронов и решающих в рамках произвольных алгоритмов задачи управления внешними устройствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы показано, что в условиях формирования обратной связи нейроны ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis in vitro* способны к формированию адаптивных реакций, позволяющих оптимизировать информационный обмен с внешними устройствами. Подобные реакции могут лежать в основе когнитивных свойств живых систем.

В дальнейшем представляется целесообразным в качестве биологических систем, управляющих внешними устройствами, использовать изолированные нейроны, реконструированные в условиях обратной связи нейронные системы из клеток, полученных от животных, находящихся на разных этапах эволюционного развития. Представляет интерес использование клеток нокаутных животных с модифицированным геномом и нейронов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток. Важно и совершенствование нейрокомпьютерного интерфейса, который позволял бы получать более полную информацию о функциональной клеточной активности и оказывать воздействие в малоинвазивных условиях при длительном поддержании жизнедеятельности клеток *in vitro*.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использованы материалы, полученные при выполнении интеграционного проекта Президиума СО РАН № 136, базового проекта 35.1.5., гранта РФФИ № 12-01-00639-а. Работа также поддержана грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

Разработка компьютерной программы проводилась в рамках бюджетного проекта VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

Василевский Н.Н., Суворов Н.Б., Трубачев В.В. Устойчивые изменения частоты и синхронности разрядов корковых нейронных популяций в экспериментах с обратной связью // Докл. АН СССР. 1972. Т. 206. С. 510–512.
Vasilevsky N.N., Suvorov N.B., Trubachev V.V. Sustainable change frequency and timing of discharges of cortical neuronal populations in experiments with feedback // Doklady Akademii nauk SSSR. 1972. V. 206. P. 510–512. (In Russian).

Вербный Я.И., Могилевский А.Я. Возможный механизм пластических перестроек активности нейрона при различных режимах внутриклеточной электростимуляции по данным методов системного анализа // Журн. высш. нерв. деятельности. 1993. Т. 43. С. 129–138.
Verbnij Ya.I., Mogilevskij A.Ya. A possible mechanism of plastic rearrangements of neural activity in different regimes of intracellular electrical stimulation according to the methods of system analysis // Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. 1993. V. 43. P. 129–138. (In Russian).

Костенко М.А. Выделение одиночных нервных клеток из мозга моллюска *Limnaea stagnalis* для дальнейшего культивирования их *in vitro* // Цитология. 1972. Т. 14. С. 1274–1278.
Kostenko M.A. Isolation of single nerve cells of the brain clam *Limnaea stagnalis* for further culturing them *in vitro* // Tsitologiya. 1972. V. 14. P. 1274–1278. (In Russian).

Костюк П.Г. Проблема реактивности и современные достижения нейрофизиологии // Физиологические науки – медицине. Л.: Наука, 1983. С. 5–10.
Kostyuk P.G. The problem of reactivity and recent advances in neurophysiology // Phisiol. Nauki – Meditcine. Leningrad: Nauka, 1983. P. 5–10. (In Russian).

Котляр Б.И. Пластичность нервной системы. М.: Изд-во МГУ, 1986. 240 с.
Kotlyar B.I. The plasticity of the nervous system. M.: Moscow State University, 1986. 240 p. (In Russian).

Кэндел Е. Клеточные основы поведения. М.: Мир, 1980. 598 с.
Kandel E. Cellular basis of behavior. M.: Mir, 1980. 598 p. (In Russian).

Ратушняк А.С., Воскресенская Л.В., Панкова Т.М., Штарк М.Б. «Адаптивная» следовая реакция нейронов гиппокампа в культуре ткани // Докл. АН СССР. 1976. Т. 228. С. 1479–1481.
Ratushnyak A.S., Voskrecenskaya L.V., Pankov T.M., Stark M.B. «Adaptive» trace reactions of hippocampal neurons in tissue culture // Doklady Akademii nauk SSSR. 02/1976. V. 228. No. 6. P. 1479–1481. (In Russian).

Alkon D.L. Changes of membrane currents during learning // J. Exp. Biol. 1984. V. 112. P. 95–112.

Bakkum D.J., Gamblen P.M., Ben-Ary B., Chao Z.C., Potter S.M. MEART: The semi-living artist // Front. Neurorobotics. 2007. V. 5. P. 1–10.

Bakkum D.J., Shkolnik A.C., Ben-Ary G., Gamblen P., DeMarse T.B., Potter S.M. Removing Some ‘A’ from AI: Embodied Cultured Networks, Embodied Artificial Intelligence, Lecture Notes in Computer Sci. 2004. V. 3139. P. 130–145.

Balaban P.M., Korshunova T.A. Bravarenko N.I. Postsynaptic calcium contributes to reinforcement in a three-neuron network exhibiting associative plasticity // Eur. J. Neurosci. 2004. V. 19. P. 227–233.

Cozzi L., D’Angelo P., Chiappalone M. *et al*. Coding and decoding of information in a bi-directional neural interface // Neurocomputing. 2005. 65–66. P. 783–792.

DeMarse T.B., Wagenaar D., Blau A.W., Potter S.M. The neurally controlled animat: biological brains acting with simulated bodies // Auton Robots. 2001. V. 11. No. 3. P. 305–310.

Hayashi I., Kiyotoki M., Kiyohara A., Tokuda M., Kudoh S.N.

Acquisition of logicality in living neuronal networks and its operation to fuzzy bio-robot system // FUZZ-IEEE. 2010. P. 1–7.

Hayashi I., Kiyotoki M., Kiyohara A., Tokuda M., Kudoh S.N. Fuzzy bio-interface: Indicating logicality from living neuronal network and learning control of bio-robot // Intern. Joint. Conf. on Neural Networks. 2011. P. 2417–2423.

Kudoh S.N., Taguchi T., Hayashi I. Interaction and intelligence in living neuronal networks connected to moving robot // FUZZ-IEEE. 2006. P. 1162–1166.

Kudoh S.N., Tokuda M., Kiyohara A., Hosokawa C., Taguchi T., Hayashi I. Vitroid – the robot system with an interface between a living neuronal network and outer world // Int. J. Mechatronics and Manufacturing Systems. 2011. V. 4. No. 2. P. 135–149.

Kyriakides M., McCrohan C.R., Slade C.T. *et al*. The morphology and electrophysiology of the neurons of the paired pedal ganglia of *Lymnaea stagnalis* (L.) // Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol. 1989. V. 93. P. 861–876.

Mozzachiodi R., Byrne J.H. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory // Trends Neurosci. 2010. V. 33. P. 17–26.

Mussa-Ivaldi F.A., Alford S.T., Chiappalone M. *et al*. New perspectives on the dialogue between brains and machines // Front. Neurosci. 2010. 4. doi: 10.3389/neuro.01.008.2010

Novellino A., D'Angelo P., Cozzi L. *et al*. Connecting neurons to a mobile robot: an *in vitro* bidirectional neural interface // Comput. Intell. Neurosci. 2007. 2725. doi: 10.1155/2007/12725

Shkolnik A.C. Neurally controlled simulated robot: applying cultured neurons to pandle and approach/avoidance task in real time, and a framework for studying learning *in vitro* / S.M. Potter, J. Lu. Dept. of Mathematics and Computer Science. Emory Univ., Atlanta, 2003.

Syed N.I., Bulloch A.G., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk Lymnaea // Science. 1990. V. 250. P. 282–285.

Tessadori J., Bisio M., Martinoia S., Chiappalone M. Modular neuronal assemblies embodied in a closed-loop environment: toward future integration of brains and machines // Front. Neural Circuits. 2012.6:99. doi: 10.3389/fncir.2012.00099. Epub 2012 Dec 12.

Warwick K., Xydas D., Nasuto S.J. Controlling a mobile robot with a biological brain // Def. Sci. J. 2010. V. 60. V. 1. P. 5–14.

ANALYSIS OF THE COGNITIVE PROPERTIES OF NEURAL SYSTEMS BASED ON BIOFEEDBACK

O.V. Vishnevsky[1, 2], N.I. Putincev[2], T.A. Zapara[3], A.S. Ratushnyak[3]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
[3] Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ratushniak.alex@gmail.com

Summary

Problems of cognitive system reengineering, i.e., the development of devices with cognitive properties on the basis of their biological prototypes cannot be solved without understanding the basic features of the architecture of biological systems, information properties, and molecular organization of the primitive units forming the architecture: nerve cells. Construction of learning models permits one to explore the activity of individual cells not only in terms of behavioral responses to natural stimuli, but also in experiments on isolated preparations with excitation of peripheral bodies and isolated cell structures. The software-tool complex NeuroFeedBack has been developed, which includes a system of living neurons and a neuro-computer interface feedback. The complex provides the reception and processing of input signals from neurons, their visualization and storage, as well as the generation of output reinforcing stimuli applied to the neurons. Analysis of the functional activity of neurons of the right parietal ganglion of the *Lymnaea stagnalis* mollusc in three models of reinforcement was performed with the complex. It was shown that optimization of neural activity occurred under the conditions of biofeedback, allowing the neuron to minimize the quantity of the reinforcing stimuli. The results obtained provided grounds for the design of a hybrid robotic system in which living neural systems using neuro-computer interface could solve navigation tasks, controlling a real-time mechanoelectronical device operating in the real environment. In the experiment, the use of the proposed programs of hybrid reinforcements allowed the robot to find a glowing light bulb and reach it in a few minutes.

Key words: neuron, neural network, cognitive features, biofeedback, hybrid robot.

УДК 576.32/36:612.014

РЕКОНСТРУКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ИНТЕРАКТОМА В СИСТЕМЕ ГЛУТАМАТНЫХ СИНАПСОВ

© 2014 г. **А.Л. Проскура, С.О. Вечкапова, Т.А. Запара, А.С. Ратушняк**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: annleop@mail.ru

Поступила в редакцию 9 октября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Субъединичный состав ионотропных глутаматергических рецепторов играет важную роль в функционировании синапсов. НМДА рецепторы опосредуют быструю возбуждающую нейропередачу и способны конвертировать специфические паттерны нейрональной активности в долговременные изменения синаптической структуры и функций. Основные функциональные свойства (ионная проводимость, чувствительность к глутамату и агонистам, ионам магния, время деактивации), пространственное расположение, закрепление на мембране, чувствительность к фармакологическим агентам определяются их субъединичной композицией. Исследование системы межбелковых взаимодействий в макрокомплексах субъединиц НМДА рецепторов является актуальной задачей. Ее решение позволит приблизиться к пониманию принципов и молекулярных механизмов реализации основных функций нейронов, механизмов развития патологических состояний, поиску фармакологических и терапевтических мишеней их коррекции. Целью работы явилось проанализировать и реконструировать белок-белковые взаимодействия субъединиц НМДА рецепторов, которые обеспечивают их подвижность и закрепление на синаптической мембране, а также функциональную роль в процессах изменения и поддержания эффективности синаптической передачи в гиппокампе. Выделено три группы белков. Они обеспечивают формирование макрокомплексов НМДА рецепторов в глутаматергических синапсах гиппокампа. Белки разнесены на группы по их функции в комплексах на основании информации из различных баз данных, научных статей, в которых охарактеризованы структура гена и белка, экспрессия в мозге, их роль в процессах синаптической пластичности. Особое внимание уделялось белкам, для которых установлена связь с различными когнитивными нарушениями.

Ключевые слова: глутаматные рецепторы, макрокомплексы, синаптическая пластичность.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из структурно-функциональных элементов нейрона, опосредующих осуществление им основных информационных функций, являются межклеточные контакты – синапсы. Синаптические процессы наиболее изучены в гиппокампе, который вовлечен в процессы восприятия информации, ее распознавания, анализа и запоминания (Kjelstrup *et al*., 2008; Hawley *et al*., 2012). Одним из основных медиаторов синапсов гиппокампа позвоночных является глутаминовая кислота (глутамат), обеспечивающая быструю возбуждающую нейропередачу (Moloney, 2002), действие которой опосредуется через мембранные глутаматные рецепторы нескольких типов. Существуют ионотропные и метаботропные глутаматные рецепторы.

Метаботропные глутаматные рецепторы связаны с G-белковым комплексом, реализуют медленную реакцию на глутамат и модулируют уровень продукции вторичных мессенджеров (Lee *et al*., 2004).

Ионотропные глутаматные рецепторы формируют проницаемые для катионов ионные каналы и подразделяются на три больших семейства по их чувствительности к действию различных агонистов. НМДА рецепторы чувствительны к N-метил-D-аспарагиновой (НМДАР) кислоте; АМПА рецепторы – к α-амино-3-гидрокси-

5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоте; каинатные рецепторы – к каинатной и квисквалатной кислотам (Bochet, Rossier, 1993).

По современным данным, НМДА рецепторы опосредуют быструю возбуждающую нейропередачу, играя важную роль в функционировании центральной нервной системы (ЦНС) млекопитающих (Paoletti *et al*., 2013). Этот тип глутаматных рецепторов вносит существенный вклад в обеспечение пластичности мозга и способен конвертировать специфические паттерны нейрональной активности в долговременные изменения синаптической структуры и функций, что, как предполагают, лежит в основе высших когнитивных функций (Lau, Zukin, 2007; Traynelis *et al*., 2010).

НМДА рецепторы собираются из гликопротеин-липидных субъединиц, которые формируют несколько подтипов рецепторно-ионофорных комплексов с медленной динамикой запуска, так как для их активации необходимо совпадение химического сигнала (нейромедиатор) с определенным потенциалом на мембране. Для активирования также необходим глицин. НМДА рецепторы проводят ионы кальция и натрия и блокируются ионами магния (Nowak *et al*., 1984; Сергеев и др., 1999).

Все подтипы НМДА рецепторов представляют комплексы двух копий (гомомеров) субъединиц GluN1 (NR1), GluN2 (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D), GluN3 (NR3A, NR3B), каждая из которых кодируется отдельным геном (*Grin1* (субъединица zeta), *Grin2a-2d* (субъединицы epsilon 1-4), *Grin3a-3b*) (Nagasawa *et al*., 1996). Субъединичный состав варьирует в различных отделах мозга и регулируется в процессе развития (Paoletti *et al*., 2013).

В ЦНС находится порядка 10^6 глутаматергических нейронов (Erecińska, Silver, 1990). В центральных отделах ЦНС, в частности в коре и гиппокампе, они часто формируют так называемые шипиковые синапсы, в которых постсинаптическая часть представлена небольшими выростами на поверхности дендрита – дендритными шипиками (Harris, Stevens, 1989; Smrt, Zhao, 2010).

Дендритный шипик имеет упорядоченную организацию на горизонтальном (мембрана шипика – синаптическая (собственно постсинапс в синаптическом контакте), перисинаптическая, экстрасинаптическая) и вертикальном (межбелковые сети сигнальных и структурных белков, постсинаптическое уплотнение (ПСУ)) уровнях (Chen *et al*., 2008; Newpher, Ehlers, 2008).

Глутаматные рецепторы закрепляются на синаптической мембране дендритных шипиков за счет взаимодействия со структурными белками (скаффолд-белки), которые формируют ПСУ наподобие ортогональной решетки (Chen *et al*., 2008). Отличительной особенностью скаффолдов является присутствие в их молекулах PDZ доменов, которые обеспечивают специфическое одновременное объединение разнообразных белков-партнеров, например заякоривание трансмембранных рецепторов к элементам цитоскелета, а также поддержание целостности функциональных белковых макрокомплексов (Gerek *et al*., 2009). В ПСУ обнаружено около 620 белков, более 450 объединяется с НМДА рецепторами (Collins *et al*., 2006). Имеются данные о том, что молекулярная масса таких макрокомплексов может доходить до 2 000 кДа (Husi, Grant, 2001).

В субъединицах НМДА рецепторов выделяют несколько доменов. Внеклеточный модуль доменов отвечает за их объединение, связывание с агонистами. Трансмембранный домен обеспечивает ионную селективность. Внутриклеточный (цитоплазматический) домен вовлечен в транспортировку рецепторов, их закрепление на мембране, связь с сигнальными молекулами (Paoletti *et al*., 2013).

На синаптической мембране дендритных шипиков комплексы НМДА рецепторов варьируют в диапазоне 1–5, являются обязательным составляющим элементом глутаматного синапса (в отличие от присутствия в нем АМПА рецепторов; Takumi *et al*., 1999; Racca *et al*., 2000) и объединяются в центре синаптической мембраны (Chen *et al*., 2008), что, как предполагают, обеспечивает строгую локализацию в пространстве входящего через них потока ионов кальция в течение синаптической активности (Raghuram *et al*., 2012). В нейронах гиппокампа в макрокомплексах НМДА рецепторов синапсов находятся метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR1α/5), локализованные на перисинаптической мембране шипиков (Luján *et al*., 1997), и рецепторы, расположенные на мембране эндоплазматического ретикулума,

ответственные за выброс ионов кальция из внутриклеточного депо (Cai *et al*., 2004). Таким образом, в дендритных шипиках обеспечивается функциональная организация mGluR1α/5-InsP3R-Ca2+ сигнального пути (Tu *et al*., 1999, 2004; Shiraishi-Yamaguchi *et al*., 2009). Через скаффолды также происходит физическое объединение макрокомплексов НМДА рецепторов с белками эндоцитозных зон, расположенных в экстрасинаптической мембране дендритных шипиков (Lu *et al*., 2007; Jaskolski *et al*., 2007).

Следовательно, цитоплазматические домены выступают в качестве остова головки шипика, вокруг которого происходит высокодинамичное функциональное объединение протеинов шипика, что регулируется ионами кальция в период синаптической активности.

По современным представлениям, считается, что четыре субъединицы NR2 определяют функциональную гетерогенность НМДА рецепторов. Для них характерен значительный разброс в профиле пространственно-временной экспрессии (Akazawa *et al*., 1994; Monyer *et al*., 1994; Sheng *et al*., 1994). В мозге новорожденных экспрессируются субъединицы NR2B и NR2D. По мере взросления данные субъединицы встречаются главным образом в каудальных отделах мозга (Schito *et al*., 1997; Paoletti *et al*., 2013). В период активного созревания синапсов и установления межсинаптических контактов происходят активирование экспрессии гена *Grin2a* и активное включение в НМДА рецепторы субъединиц NR2A (Dumas, 2005). В мозге взрослых млекопитающих ди-гетеромерные комплексы NR1/NR2A являются доминирующими, хотя и остается популяция NR2B-содержащих рецепторов, имеющая главным образом несинаптическое расположение (Paoletti *et al*., 2013).

Замена субъединичного состава меняет основные свойства НМДА рецепторов. NR1/NR2A характеризуются быстрой кинетикой и высокой ионной проводимостью, но низкой чувствительностью к глутамату. NR2B-содержащие рецепторы медленнее деактивируются, вероятность их срабатывания гораздо ниже, но при этом их чувствительность к глутамату выше по сравнению с NR2A. Рецепторы с субъединицами NR2C и NR2D характеризуются наиболее медленной кинетикой и низкой чувствительностью к ионам магния (Hedegaard *et al*., 2012). Следовательно, по мере взросления на синапсах появляются НМДА рецепторы с более высокой вероятностью открытия, лучшей проводимостью для ионов кальция, коротким интервалом деактивирования и пониженной аффинностью к глутамату. Также NR2A- и NR2B-содержащие рецепторы по-разному взаимодействуют со своими эндогенными коагонистами (d-серином, глицином) (Papouin *et al*., 2012). Цитоплазматические домены субъединиц отличаются по набору сайтов связывания с различными структурными и сигнальными белками дендритных шипиков (Cousins *et al*., 2009a; Papouin, Oliet, 2014). Межбелковые взаимодействия в постсинапсе (дендритных шипиках) вслед за активированием НМДА рецепторов приводят к изменению эффективности синаптической передачи (Проскура и др., 2013; Fan *et al*., 2014). Субъединичный состав синаптических рецепторов, следовательно, играет важную роль в функционировании синапсов. Так, нарушение баланса NR1/NR2A, NR1/NR2B лежит, по крайней мере отчасти, в основе эксайтотоксичности (значительное поступление в нейроны ионов кальция через НМДА рецепторы в результате их гиперактивации), что может приводить к гибели нейрона и, как следствие, к нарушениям в различных структурах мозга (Lau, Zukin, 2007; Paoletti, 2011; Fan *et al*., 2014).

Таким образом, исследование системы межбелковых взаимодействий в макрокомплексах субъединиц НМДА рецепторов является актуальной задачей, решение которой позволит приблизиться к пониманию принципов и молекулярных механизмов реализации основных функций нейронов, механизмов развития патологических состояний; поиску фармакологических и терапевтических мишеней их коррекции.

Межбелковые взаимодействия в макркомплексах НМДА рецепторов

Проанализированы и реконструированы белок-белковые взаимодействия субъединиц ионотропных глутаматных НМДА рецепторов, которые обеспечивают их подвижность и закрепление на синаптической мембране, а также функциональную роль в процессах изменения и поддержания эффективности синаптической

передачи в гиппокампе. Нами выделено три группы белков, которые обеспечивают формирование макрокомплексов НМДА рецепторов в глутаматергических синапсах, в частности нейронов CA1 поля гиппокампа. Белки разнесены на группы по их функции в комплексах на основании информации из баз данных (главным образом Swiss-Prot, String, Kegg, GeneCards) научных статей (включая как экспериментальные, так и обзорные публикации), в которых охарактеризована структура гена и белка, экспрессия в мозге, в особенности на возбуждающих синапсах гиппокампа, роль в процессах синаптической пластичности. Особое внимание уделялось белкам, для которых установлена связь с различными когнитивными нарушениями.

Первую группу представляют мембранные мультидоменные белки, обеспечивающие сцепление пре- и постсинаптической мембраны синапса, формирование кластеров рецепторов, объединение различных синаптических трансмембранных рецепторов в функциональные комплексы (белки LRFN, PRR7, MPDZ, NETO1, INADL и пр.).

Вторая – скаффолд-белки ПСУ. Ключевым в данной категории выступает белок PSD95, член семейства MAGUK, который часто рассматривается как маркер ПСУ (Chen *et al*., 2008). Семейство Sapap (Dlgap 1, 2, 3, 4 (Disks large-associated protein)) объединяет скаффолды семейства MAGUK между собой. Белки Begain (Brain-enriched guanylate kinase-associated protein) формируют троичный комплекс между белками PSD95 и Dlgap1, выступая в роли каркасной решетки ПСУ (Deguchi *et al*., 1998). Основная роль данной группы белков – закрепление рецепторов через взаимодействие с их цитоплазматическими доменами. Скаффолды являются наиболее представленной группой. Масс-спектрометрия и другие методы дают оценку примерно 60–400 главных молекул скаффолд-белков ПСУ (Peng *et al*., 2004; Chen *et al*., 2005; Cheng *et al*., 2006). Часть скаффолдов можно рассматривать как слоты для посадки трансмембранных рецепторов синапса, их пространственного закрепления в пределах синапса, например, за счет взаимодействия с интегринами. Причем некоторые скаффолды объединяются с рецепторами еще в эндоплазматическом ретикулуме и контролируют, таким образом, их доставку к синапсам и закрепление на ПСУ. Известно, что скаффолд Sap102 (Dlg3) играет ключевую роль именно в доставке NR2B-содержащих НМДА рецепторов, а PSD95 – в их закреплении на синаптической мембране в центре ПСУ (Chung *et al*., 2004).

Третью группу представляют адаптерные, или вспомогательные, белки. Эти белки, по сути, являются функциональными элементами, благодаря которым происходит объединение структурно-функциональных сигнальных, эффекторных молекул в головке дендритного шипика в процессе НМДАР-зависимой индукции синаптической пластичности. В литературе нет четкого разделения между скаффолдами и адаптерами. Адаптеры, согласно нашему мнению, выступают, скорее, в роли динамичных площадок для временного или постоянного закрепления киназ, фосфатаз, малых ГТФаз, регуляторов их активности, молекул сигнальных путей, играя при этом ключевую роль в формировании функциональных комплексов разнообразных белков, межбелковые взаимодействия между которыми обеспечивают изменение и поддержание синаптической эффективности. Основными представителями данной группы в глутаматергических синапсах выступают белки семейств Homer (Homer protein homolog 1), Baiap (Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein), GIT (G protein-coupled receptor kinase-interactor 1). Мультимеризуясь, эти белки могут быстро перестраивать набор макрокомплекса, временно объединять белки различных сигнальных каскадов для определенных процессов. То есть если во второй группе белки формируют устойчивые связи с определенным набором белков, играя главным образом каркасную роль в ПСУ, то адаптеры, объединяясь с предыдущей группой, предоставляют площадки для динамичного закрепления молекул, обеспечивающих функциональную и структурную (основанную на актиновом цитоскелете) пластичность синапса.

NR1 субъединицы являются облигаторными и объединяются с двумя NR2 (NR1/NR2) либо NR3 (NR1/NR3) субъединицами (дигетеромерные комплексы НМДА рецепторов). Существуют варианты тригетеромерных комплексов НМДА рецепторов (NR1/NR2/NR3) (Traynelis *et al*., 2010; Paoletti *et al*., 2013). Спорадические мутации в гене *Grin1* опосредуют, как считается,

несиндромные интеллектуальные нарушения. При этом наблюдаются значительное снижение интеллектуального уровня и нарушение адаптивного поведения (Hamdan *et al*., 2011).

Дигетеромерные комплексы NR1/NR2A доминируют в мозге взрослых млекопитающих, популяция NR2B-содержащих рецепторов имеет главным образом несинаптическое расположение (Paoletti *et al*., 2013; Papouin, Oliet, 2014).

Нами проанализирован набор белков из указанных трех групп для субъединиц NR1, NR2A и NR2B НМДА рецепторов (табл.).

NR1 субъединица объединяется с белками, которые отвечают за адгезию синаптической щели и взаимодействие с ключевыми скаффолд белками ПСУ.

Белки SALM3 и SALM5 (семейство LRFN), как считается, участвуют в индукции пресинаптической дифференцировки у контактирующих с дендритами аксонов (Nam *et al*., 2011). Взаимодействие SALM1 через С-терминальный PDZ мотив с белком ПСУ PSD95 важно для рекрутирования и кластеризации на синаптической мембране НМДА рецепторов (Ko *et al*., 2006). LRFN1 (SALM2) также способен взаимодействовать с GluR1 субъединицей АМПА рецепторов, чем способствует объединению НМДА и АМПА рецепторов в единый функциональный комплекс на синаптической мембране (Nam *et al*., 2011). Таким образом, SALM1 обеспечивает раннее формирование синапсов, а SALM2 обеспечивает созревание уже существующих дендритных шипиков через сокластеризацию АМПА и НМДА рецепторов. Хромосомная транслокация t(14;21)(q21.1;p11.2) приводит к нарушению экспрессии гена, кодирующего LRFN5, что связано с аутизмом (de Bruijn *et al*., 2010).

Интересно отметить роль предшественника амилоида APP695 для экспрессии НМДА рецепторов на синаптической мембране. Считается, что APP695 взаимодействует с NR1 субъединицей (Cousins *et al*., 2009b), но при этом играет существенную роль в доставке во взрослые синапсы NR1/NR2A рецепторов, вероятно, через взаимодействие с трансмембранными белками NETO, которые взаимодействуют с NR2A субъединицами (Cousins *et al*., 2013; Molnár, 2013). У нокаутных по гену *Neto1* мышей наблюдается нарушение долговременной потенциации и связанного с работой НМДА рецепторов пространственного обучения и запоминания (Ng *et al*., 2009).

Таким образом, можно сделать вывод, что NR1 субъединицы взаимодействуют главным образом с скаффолд-белками, которые мы условно относим к первой группе, обеспечивая пространственное позиционирование НМДА рецепторных комплексов на синаптической мембране при образовании и/или созревании синапсов. Вовлеченность в данные взаимодействия белка предшественника амилоида APP695 делает перспективным изучение механизмов закрепления НМДА рецепторов определенного субъединичного состава (а именно NR1/NR2A) на глутаматергических синапсах гиппокампа в исследовании когнитивных нарушений при развитии болезни Альцгеймера.

Субъединицы NR2A и NR2B непосредственно взаимодействуют с ключевым белком ПСУ – PSD95. При этом участки цитоплазматических доменов, отвечающие за данные взаимодействия, различаются у субъединиц (Cousins *et al*., 2009a).

Цитоплазматические домены NR2B и NR2A взаимодействуют с различным, но пересекающимся набором дендритных белков (табл.).

Трансмембранные белки INADL (InaD-like protein, Channel-interacting PDZ domain-containing protein) выступают каркасом, объединяющим структурно разные, но связанные функционально белки на синаптической мембране: субъединицы НМДА рецепторов (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D), калиевые каналы, немедиаторные рецепторы, белки клеточной адгезии. Адаптерный белок KIBRA взаимодействует с INADL и вовлечен в процессы нейропластичности, апоптоза и регулирования цитоскелета (Lauriat *et al*., 2006) (рис. 1). В гиппокампальных нейронах эти белки распределены в соматодендритных компартментах в виде гомодимеров, а также хорошо представлены в ПСУ дендритных шипиков, объединяя сигнальные молекулы с элементами цитоскелета (Johannsen *et al*., 2008). Имеются данные, что KIBRA прямо связывается с PICK1 (protein interacting with C-kinase 1) и формирует комплексы с АМПА рецепторами (Makuch *et al*., 2011). Показана взаимосвязь генетической вариабельности KIBRA с риском возникновения болезни Альцгеймера с возра-

Таблица

Белки макрокомплексов НМДА рецепторов

Субъединица	Белки	Функция	Взаимодействие с	Процессы	Литературный источник
NR1	LRFN 1-5 (SALM1-5)	Адгезионное взаимодействие пре- и постсинапса возбуждающих синапсов	PSD-95, ионотропные каналы, белки клеточной адгезии, скаффолд-белки ПСУ, адапторные белки и пр.	Формирование межбелковых взаимодействий в синаптической зоне дендритного шипика	Ko *et al*., 2006 Nam *et al*., 2011
NR1	PRR7	Трансмембранные белки, объединяющие рецепторы с белками ПСУ			Murata *et al*., 2005
NR1	MPDZ	Трансмембранные белки, объединение различных рецепторов, протеинкиназ, малых ГТФаз	SynGAP, CamkII	Ремоделирование цитоскелета, усиление проводимости ионотропных рецепторов	Ullmer *et al*., 1998; Krapivinsky *et al*., 2004
NR1	APP695	Доставка НМДАР к синаптической мембране			Cousins *et al*., 2009b
NR2B	Magi-3	Трансмембранные белки, объединение медиаторных и немедиаторных рецепторов на мембране	PTEN LPAR2	Модулирование активности киназы Akt1 Регулирование MAPK, ERK1/2 и PI3K-Akt сигнальных путей	Zhang *et al*., 2007; Hoe *et al*., 2006
NR2B	Kalirin7	Регуляция и реорганизация цитоскелета			Penzes *et al*., 2001; Kiraly *et al*., 2011
NR2B NR2A	PSD-95 (Dlg4)	Центральный скаффолд ПСУ	Begain, белки семейств MAGUK, Sapap, Shank	Закрепление НМДР, формирование структуры ПСУ	Cousins *et al*., 2009a; Chen *et al*., 2005, 2008; Cheng *et al*., 2006; Deguchi *et al*., 1998; Iida *et al*., 2007; Park *et al*., 2003
NR2B NR2A	INADL	Трансмембранные белки, объединение на синаптической мембране разнообразные рецепторы, белки клеточной адгезии	KIBRA, PICK1, PKCa	Зависящий от активности НМДАР эндоцитоз рецепторов, в частности AMPAP	Lauriat *et al*., 2006; Johannsen *et al*., 2008; Makuch *et al*., 2011

Окончание таблицы

Субъединица	Белки	Функция	Взаимодействие с	Процессы	Литературный источник
NR2A	S-SCAM	Трансмембранный белок, объединяющий ключевые структурные и адаптерные белки ПСУ в макрокомплексах	Dendrin, ACTN1, KIBRA; RhoA; Dlgap, Shank, GIT1, PIX;	Ремоделирование подмембранного цитоскелета	Kawata *et al*., 2006; Hirao *et al*., 1998; Gout *et al*., 2000; Park *et al*., 2003; Shiraishi-Yamaguchi *et al*., 2009; Iida *et al*., 2004; Deng *et al*., 2006; Iglesias *et al*., 2000; Arévalo *et al*., 2004
			Atrophin1, Baiap2, Tiam, Wave; Shank, Drebrin	Регуляция структурной пластичности шипика	
			Homer, IP3R	Выброс внутриклеточного Ca^{2+}	
			PTEN	Модулирование активности Akt1-сигнального пути	
			KIDINS220	Субстрат для PKD, опосредует работу ERK1/2 сигнального каскада, регулирует работу NTR, объединяя с рецепторами для BDNF	
			Нейролигины	Адгезионное взаимодействие в синаптической щели	
			Stargasin	Объединение в единый функциональный комплекс НМДАР и АМРАР	
NR2A	NETO	Трансмембранный белок, закрепление на синапсах NR2A-НМДАР	Dlg3 (SAP102), Dlg2 (PSD-93)	Доставка НМДАР к синаптической мембране	Ng *et al*., 2009; Cousins *et al*., 2013

Примечание. ПСУ — постсинаптическое уплотнение, НМДАР — НМДА-рецептор, АМРАР — АМРА-рецептор.

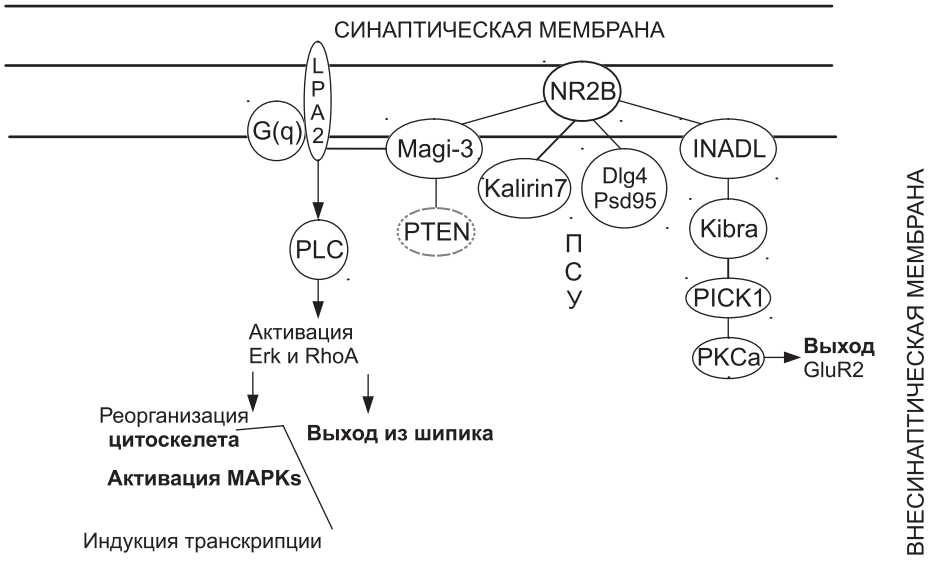


Рис. 1. Межбелковые взаимодействия белков дендритных шипиков с цитоплазматическим доменом субъединицы NR2B НМДА рецепторов.

Стрелками показаны функциональные взаимодействия в течение синаптической активности.

Fig. 1. Protein-protein interactions of dendritic spines with cytoplasmic domains of the NR2B subunit of NMDA receptors.

Arrows indicate functional interactions during the synaptic activity.

стом (Almeida *et al*., 2008; Rodríguez-Rodríguez *et al*., 2009; Corneveaux *et al*., 2010; Burgess *et al*., 2011), депрессией (Galecki *et al*., 2010). У мышей с нарушением экспрессии данного белка наблюдаются серьезные нарушения обучения и памяти (Makuch *et al*., 2011).

NR2A-специфическими белками выступают NETO1 и S-SCAM (рис. 2). NETO1 хорошо представлен в дендритных шипиках возбуждающих синапсов, в частности в поле CA1 гиппокампа, является крайне важным для поддержания NR2A-содержащих НМДА рецепторов на синаптической мембране и вовлечен в процессы обучения и формирования памяти (Ng *et al*., 2009). В литературе обсуждаются его роль в качестве вспомогательной субъединицы НМДА рецепторов и взаимодействие с предшественником амилоидного белка (Molnár, 2013). Установлено, что NETO1 взаимодействует с NR2A через их внутриклеточный цитоплазматический домен. Вероятно, что NETO1 важен для закрепления NR2A-содержащих рецепторов на синапсах и в данное взаимодействие непрямо вовлечен белок APP695 (Cousins *et al*., 2013). Поиск белка, выступающего молекулярным мостиком между APP695, NR2A и NETO1, может быть интересным для понимания развития патологии. Так, показана взаимосвязь между нарушениями синаптических контактов нейронов поля CA1 гиппокампа и когнитивными нарушениями в ранней фазе болезни Альцгеймера (Counts *et al*., 2014).

Наш анализ наборов белков субъединиц позволяет рассматривать S-SCAM как ключевой белок, опосредующий различную функциональную вовлеченность NR2B- и NR2A НМДА рецепторов в процессы синаптической пластичности. S-SCAM – крупный мультидоменный белок, объединяющий в макрокомплексах ключевые белки ПСУ, прежде всего семейства Dlg и Dlgap. Наиболее известными из них являются белки PSD95, Gkap, Shank, дендрин, атрофин, Kiddins220, белки клеточной адгезии (Hirao *et al*., 1998; Gout *et al*., 2000; Iglesias *et al*., 2000; Park *et al*., 2003; Iida *et al*., 2004; Deng *et al*., 2006; Kawata *et al*., 2006; Shiraishi-Yamaguchi *et al*., 2009). Таким образом, данный белок, относясь к структурным белкам ПСУ, выступает площадкой для разнообразных адаптерных белков, которые, в свою очередь, выступают молекулярными мостиками для белков, обеспечивающих структурно-функциональные из-

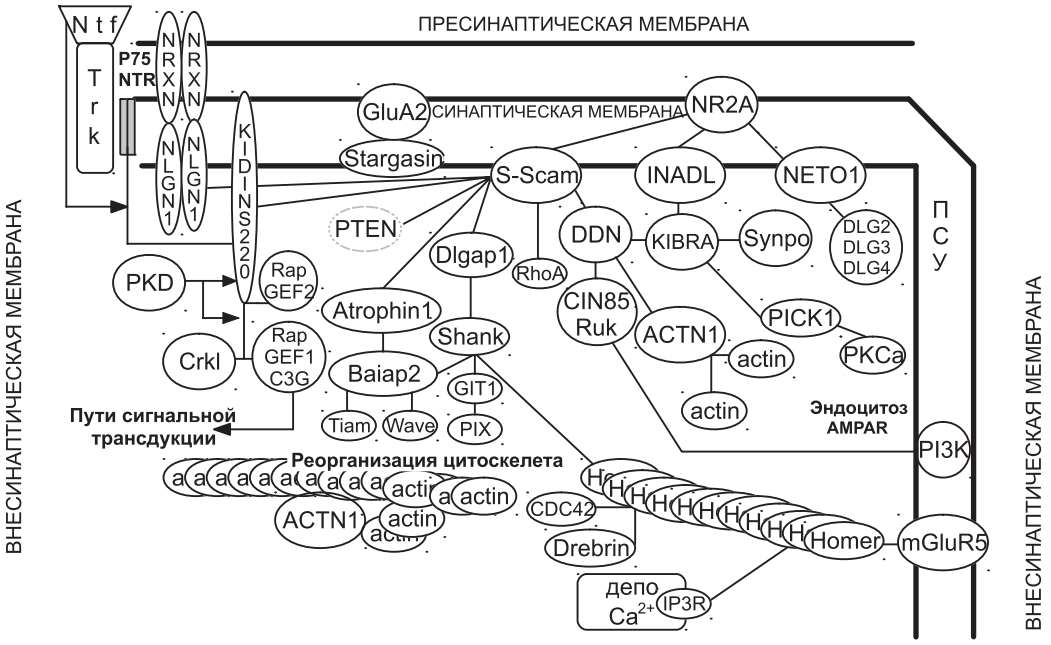


Рис. 2. Межбелковые взаимодействия дендритных шипиков с цитоплазматическим доменом субъединицы NR2A НМДА рецепторов.

Стрелками показаны функциональные взаимодействия в течение синаптической активности.

Fig. 2. Protein-protein interactions of dendritic spines with cytoplasmic domains of the NR2A subunit of NMDA receptors.

Arrows indicate functional interactions during the synaptic activity.

менения, вызванные входящими через НМДА рецепторы ионами кальция (Проскура и др., 2013; Fan *et al*., 2014).

На рис. 2 реконструирована схема межмолекулярных взаимодействий, которые происходят в постсинапсе после активирования NR2A-НМДА рецепторов и обеспечивают связь между ионотропными рецепторами, расположенными на синаптической мембране, и рецепторами нейротрофических факторов, расположенными преимущественно в околосинаптической зоне (рис. 2, показано в виде стрелок). Ключевым при этом выступает белок Kiddins220. Kiddins220 (синоним ARMS) является интегральным мембранным белком, экспрессируется в мозге и выступает субстратом для серин-треониновой киназы D (PKD) (Iglesias *et al*., 2000). ARMS взаимодействует с Trk и p75 рецепторами нейротрофинов через формирование тройничного комплекса, в котором экстраклеточные домены TrkA и p75 рецепторов важны для ассоциации рецепторов, а подмембранный район p75 отвечает за взаимодействие с Kidins220/ARMS. ARMS может быть фосфорилирован по треонину Trk киназой после присоединения к Trk рецептору нейротрофинов. ARMS выступает, таким образом, посадочной площадкой для белков (CrkL-C3G complex (Arévalo *et al*., 2004, 2006)), которые далее включают ERK киназный сигнальный путь (Rap1-зависимое включение) (рис. 2). Вероятно, данный механизм может реализоваться и для такого важного для развития мозга и синаптической пластичности нейротрофического фактора, как BDNF. У мышей ARMS/Kidins220(+/-) наблюдается упрощение ветвления дендритов, снижение плотности дендритных шипиков, нестабильность шипиков (Wu *et al*., 2009). Выключение экспрессии гена Kidins220 приводило к ухудшению базовой активности нейронов и гибели нейронов в условиях эксайтотоксичности (Lypez-Menéndez *et al*., 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа позволила структурировать разнообразный материал о межбелковых взаимодействиях в макрокомплексах субъеди-

ниц НМДА рецепторов на синапсах нейронов поля CA1 гиппокампа. Выделены ключевые белки, обеспечивающие пространственное взаимодействие протеинов партнеров, обеспечивающих изменение синаптической эффективности после активирования НМДА рецепторов и входа в постсинапс ионов кальция.

NR2A- и NR2B-содержащие НМДА рецепторы отличаются по своим основным характеристикам: ионной проводимости, чувствительности к глутамату и агонистам, ионам магния, времени деактивации. В своей работе мы наглядно демонстрируем, что помимо этого субъединичный состав определяет включенность рецептора в постсинаптические процессы, запускаемые интенсивной активацией синапса (например в результате индукции долговременной потенциации). Белковый набор NR2A взаимодействий более обширен, обеспечивает возможности формирования функциональных взаимодействий с немедиаторными рецепторами синапсов. Наиболее представлены в данных макрокомплексах регуляторы ремоделирования цитоскелета, что в очередной раз демонстрирует тесную связь функциональной (изменение силы синапса) и структурной пластичности (изменение формы, размера ПСУ и постсинапса в целом) глутаматергических синапсов гиппокампа взрослых животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использованы материалы, полученные при выполнении интеграционного проекта Президиума СО РАН № 136, базового проекта 35.1.5, гранта РФФИ № 12-01-00639-а.

Работа поддержана грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

ЛИТЕРАТУРА

Проскура А.Л., Малахин И.А., Турнаев И.И., Суслов В.В., Запара Т.А., Ратушняк А.С. Межмолекулярные взаимодействия в функциональных системах нейрона // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. Вып. 4/1. С. 620–628.
Proskura A.L., Malakhin I.A., Turnaev I.I., Suslov V.V., Zapara T.A., Ratuschnyak A.S. Intermolecular interactions in functional neuron systems // Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii. 2013. V. 17. I. No. 4/1. P. 620–628. (In Russian).

Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. Волгоград: Семь ветров, 1999. 640 с.
Sergeev P.V., Schimanovsky N.L., Petrov V.I. Receptors of physiologically active substances. Volgograd: Sem' vetrov, 1999. P. 640. (In Russian).

Akazawa C., Shigemoto R., Bessho Y., Nakanishi S., Mizuno N. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats // J. Comp. Neurol. 1994. V. 347. P. 150–160.

Almeida O.P., Schwab S.G., Lautenschlager N.T., Morar B., Greenop K.R., Flicker L., Wildenauer D. KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in later life, but does not increase the risk of mild cognitive impairment // J. Cell Mol. Med. 2008. V. 12. No. 5. P. 1672–1676.

Arévalo J.C., Pereira D.B., Yano H., Teng K.K., Chao M.V. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. No. 2. P. 1001–1007.

Arévalo J.C., Yano H., Teng K.K., Chao M.V. A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein // EMBO J. 2004. V. 23. No. 12. P. 2358–2368.

Bochet P., Rossier J. Molecular biology of excitatory amino acid receptors: subtypes and subunits // EXS. 1993. V. 63. P. 224–233.

Burgess J.D., Pedraza O., Graff-Radford N.R., Hirpa M., Zou F., Miles R., Nguyen T., Li M., Lucas J.A., Ivnik R.J., Crook J., Pankratz V.S., Dickson D.W., Petersen R.C., Younkin S.G., Ertekin-Taner N. Association of common KIBRA variants with episodic memory and AD risk // Neurobiol Aging. 2011. V. 32. No. 3. P. 557.e1-557.e9. available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3065956/. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.004.

Cai W., Hisatsune C., Nakamura K., Nakamura T., Inoue T., Mikoshiba K. Activity-dependent expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. No. 22. P. 23691–23698.

Chen X., Vinade L., Leapman R.D., Petersen J.D., Nakagawa T., Phillips T.M., Sheng M., Reese T.S. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. No. 32. P. 11551–11556.

Chen X., Winters C., Azzam R., Li X., Galbraith J.A., Leapman R.D., Reese T.S. Organization of the core structure of the postsynaptic density // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. No. 11. P. 4453–4458.

Cheng D., Hoogenraad C.C., Rush J., Ramm E., Schlager M.A., Duong D.M., Xu P., Wijayawardana S.R., Hanfelt J., Nakagawa T., Sheng M., Peng J. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum // Mol. Cell Proteomics. 2006. V. 5. No. 6. P. 1158–1170.

Chung H.J., Huang Y.H., Lau L.F., Huganir R.L. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand // J. Neurosci. 2004. V. 24. No. 45. P. 10248–10259.

Collins M.O., Husi H., Yu L., Brandon J.M., Anderson C.N., Blackstock W.P., Choudhary J.S., Grant S.G. Molecular

characterization and comparison of the components and multiprotein complexes in the postsynaptic proteome // J. Neurochem. 2006. V. 97. P. 16–23.

Corneveaux J.J., Liang W.S., Reiman E.M., Webster J.A., Myers A.J., Zismann V.L., Joshipura K.D., Pearson J.V., Hu-Lince D., Craig D.W., Coon K.D., Dunckley T., Bandy D., Lee W., Chen K., Beach T.G., Mastroeni D., Grover A., Ravid R., Sando S.B., Aasly J.O., Heun R., Jessen F., Kölsch H., Rogers J., Hutton M.L., Melquist S., Petersen R.C., Alexander G.E., Caselli R.J., Papassotiropoulos A.,Stephan D.A., Huentelman M.J. Evidence for an association between KIBRA and late-onset Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2010. V. 31. No. 6. P. 901–909.

Counts S.E., Alldred M.J., Che S., Ginsberg S.D., Mufson E.J. Synaptic gene dysregulation within hippocampal CA1 pyramidal neurons in mild cognitive impairment // Neuropharmacology. 2014. V. 79. P. 172–179.

Cousins S.L., Kenny A.V., Stephenson F.A. Delineation of additional PSD-95 binding domains within NMDA receptor NR2 subunits reveals differences between NR2A/PSD-95 and NR2B/PSD-95 association // Neuroscience. 2009a. V. 158. No. 1. P. 89–95.

Cousins S.L., Hoey S.E., Stephenson F.A., Perkinton M.S. Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery // J. Neurochem. 2009b. V. 111. No. 6. P. 1501–1513.

Cousins S.L., Innocent N., Stephenson F.A. Neto1 associates with the NMDA receptor/amyloid precursor protein complex // J. Neurochem. 2013. V. 126. No. 5. P. 554–564.

de Bruijn D.R., van Dijk A.H., Pfundt R., Hoischen A., Merkx G.F., Gradek G.A., Lybæk H., Stray-Pedersen A., Brunner H.G., Houge G. Severe progressive autism associated with two *de novo* changes: A 2.6-Mb 2q31.1 deletion and a balanced t(14;21)(q21.1;p11.2) translocation with long-range epigenetic silencing of LRFN5 expression // Mol. Syndromol. 2010. V. 1. No. 1. P. 46–57.

Deguchi M., Hata Y., Takeuchi M., Ide N., Hirao K., Yao I., Irie M., Toyoda A., Takai Y. BEGAIN (brain-enriched guanylate kinase-associated protein), a novel neuronal PSD-95/SAP90-binding protein // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. No. 41. P. 26269–26272.

Deng F., Price M.G., Davis C.F., Mori M., Burgess D. Stargazin and other transmembrane AMPA receptor regulating proteins interact with synaptic scaffolding protein MAGI-2 in brain // J. Neurosci. 2006. V. 26. No. 30. P. 7875–7884.

Dumas T.C. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning // Prog. Neurobiol. 2005. V. 76. P. 189–211.

Erecińska M., Silver I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain // Prog. Neurobiol. 1990. V. 35. No. 4. P. 245–296.

Fan X., Jin W.Y., Wang Y.T. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse // Front Cell Neurosci. 2014. available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4051310/pdf/fncel-08-00160.pdf. DOI: 10.3389/fncel.2014.00160.

Galecki P., Szemraj J., Florkowski A., Talarowska M., Bienkiewicz M., Galecka E., Lewinski A. Single nucleotide polymorphism of the KIBRA gene in recurrent depressive disorders // Neuroendocrinol. Lett. 2010. V. 31. No. 1. P. 97–102.

Gerek Z.N., Keskin O., Ozkan S.B. Identification of specificity and promiscuity of PDZ domain interactions through their dynamic behavior // Proteins. 2009. V. 77. No. 4. P. 796–811.

Gout I., Middleton G., Adu J., Ninkina N.N., Drobot L.B., Filonenko V., Matsuka G., Davies A.M., Waterfield M., Buchman V.L. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein // EMBO J. 2000. V. 19. No. 15. P. 4015–4025.

Hamdan F.F., Gauthier J., Araki Y. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability // Am. J. Hum. Genet. 2011. V 88. No. 3. P. 306–316.

Harris K.M., Stevens J.K. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics // J. Neurosci. 1989. No. 9. P. 2982–2997.

Hawley D.F., Morch K., Christie B.R. Differential response of hippocampal subregions to stress and learning // PLoS One. 2012. V. 7. No. 12. P. E53126.

Hedegaard M., Hansen K.B., Andersen K.T., Bräuner-Osborne H., Traynelis S.F. Molecular pharmacology of human NMDA receptors // Neurochem. Int. 2012. V. 61. No. 4. P. 601–609.

Hirao K., Hata Y., Ide N., Takeuchi M., Irie M., Yao I., Deguchi M., Toyoda A., Sudhof T.C., Takai Y. A novel multiple PDZ domain-containing molecule interacting with N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal cell adhesion proteins // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. No. 33. P. 21105–21110.

Hoe H.S., Pocivavsek A., Chakraborty G., Fu Z., Vicini S., Ehlers M.D., Rebeck G.W. Apolipoprotein E receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. No. 6. P. 3425–3431.

Husi H., Grant S.G. Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain // J. Neurochem. 2001. V. 77. P. 281–291.

Iglesias T., Cabrera-Poch N., Mitchell M.P., Naven T.J., Rozengurt E., Schiavo G. Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. No. 51. P. 40048–40056.

Iida J., Hirabayashi S., Sato Y., Hata Y. Synaptic scaffolding molecule is involved in the synaptic clustering of neuroligin // Mol. Cell. Neurosci. 2004. V. 27. No. 4. P. 497–508.

Iida J., Ishizaki H., Okamoto-Tanaka M., Kawata A., Sumita K., Ohgake S., Sato Y., Yorifuji H., Nukina N., Ohashi K., Mizuno K., Tsutsumi T., Mizoguchi A., Miyoshi J., Takai Y., Hata Y. Synaptic scaffolding molecule alpha is a scaffold to mediate N-methyl-D-aspartate receptor-dependent RhoA activation in dendrites // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. No. 12. P. 4388–4405.

Jaskolski F., Martin S., Henley J.M. Retaining synaptic AMPARs // Neuron. 2007. V. 55. No. 6. P. 825–827.

Johannsen S., Duning K., Pavenstädt H., Kremerskothen J.,

Boeckers T.M. Temporal-spatial expression and novel biochemical properties of the memory-related protein KIBRA // Neuroscience. 2008. V. 155. No. 4. P. 1165–1173.

Kawata A., Iida J., Ikeda M., Sato Y., Mori H., Kansaku A., Sumita K., Fujiwara N., Rokukawa C., Hamano M., Hirabayashi S., Hata Y. CIN85 is localized at synapses and forms a complex with S-SCAM via dendrin // J. Biochem. 2006. V. 139. No. 5. P. 931–939.

Kiraly D.D., Lemtiri-Chlieh F., Levine E.S., Mains R.E., Eipper B.A. Kalirin binds the NR2B subunit of the NMDA receptor, altering its synaptic localization and function // J. Neurosci. 2011. V. 31. No. 35. P. 12554–12565.

Kjelstrup K.B., Solstad T., Brun V.H., Hafting T., Leutgeb S., Witter M.P., Moser E.I., Moser M.B. Finite scale of spatial representation in the hippocampus // Science. 2008. V. 321. No. 5885. P. 140–143.

Ko J., Kim S., Chung H.S., Kim K., Han K., Kim H., Jun H., Kaang B.K., Kim E. SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses // Neuron. 2006. V. 50. No. 2. P. 233–245.

Krapivinsky G., Medina I., Krapivinsky L., Gapon S., Clapham D.E. SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation // Neuron. 2004. V. 43. No. 4. P. 563–574.

Lau C.G., Zukin R.S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders // Nature Rev. Neurosci. 2007. V. 8. No. 6. P. 413–426.

Lauriat T.L., Dracheva S., Kremerskothen J., Duning K., Haroutunian V., Buxbaum J.D., Hyde T.M., Kleinman J.E., McInnes L.A. Characterization of KIAA0513, a novel signaling molecule that interacts with modulators of neuroplasticity, apoptosis, and the cytoskeleton // Brain Res. 2006. V. 1121. No. 1. P. 1–11.

Lee H.G., Zhu X., O'Neill M.J., Webber K., Casadesus G., Marlatt M., Raina A.K., Perry G., Smith M.A. The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease // Acta. Neurobiol. Exp. (Wars). 2004. V. 64. No. 1. P. 89–98.

López-Menéndez C., Gascón S., Sobrado M., Vidaurre O.G., Higuero A.M., Rodríguez-Peña A., Iglesias T., Díaz-Guerra M. Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways // J. Cell. Sci. 2009. V. 122. No. 19. P. 3554–3565.

Lu J., Helton T.D., Blanpied T.A., Rácz B., Newpher T.M., Weinberg R.J., Ehlers M.D. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer // Neuron. 2007. V. 55. No. 6. P. 874–889.

Luján R., Roberts J.D., Shigemoto R., Ohishi H., Somogyi P. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites // J. Chem. Neuroanat. 1997. V. 13. No. 4. P. 219–241.

Makuch L., Volk L., Anggono V., Johnson R.C., Yu Y., Duning K., Kremerskothen J., Xia J., Takamiya K., Huganir R.L. Regulation of AMPA receptor function by the human memory-associated gene KIBRA // Neuron. 2011. V. 71. No. 6. P. 1022–1029.

Molnár E. Are Neto1 and APP auxiliary subunits of NMDA receptors? // J. Neurochem. 2013. V. 126. No. 5. P. 551–553.

Moloney M.G. Excitatory amino acids // PLoS One. 2002. V. 19. No. 5. P. 597–616.

Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors // Neuron. 1994. V. 12. P. 529–540.

Murata Y., Doi T., Taniguchi H., Fujiyoshi Y. Proteomic analysis revealed a novel synaptic proline-rich membrane protein (PRR7) associated with PSD-95 and NMDA receptor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 327. No. 1. P. 183–191.

Nagasawa M., Sakimura K., Mori K.J., Bedell M.A., Copeland N.G., Jenkins N.A., Mishina M. Gene structure and chromosomal localization of the mouse NMDA receptor channel subunits // Brain. Res. Mol. Brain. Res. 1996. V. 36. No. 1. P. 1–11.

Nam J., Mah W., Kim E. The SALM/Lrfn family of leucine-rich repeat-containing cell adhesion molecules // Semin Cell Dev. Biol. 2011. V. 22. No. 5. P. 492–498.

Newpher T.M., Ehlers M.D. Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains // Neuron. 2008. V. 58. No. 4. P. 472–497.

Ng D., Pitcher G.M., Szilard R.K., Sertié A., Kanisek M., Clapcote S.J., Lipina T., Kalia L.V., Joo D., McKerlie C., Cortez M., Roder J.C., Salter M.W., McInnes R.R. Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning // PLoS Biol. 2009. V. 7. No. 2. P. 0278–0300. available at http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1000041/. DOI:10.1371/journal.pbio.1000041

Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones // Nature. 1984. V. 307. No. 5950. P. 462–465.

Paoletti P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity // Eur. J. Neurosci. 2011. V. 33. No. 8. P. 1351–1365.

Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease // Nat. Rev. Neurosci. 2013. V. 14. No. 6. P. 383–400.

Papouin T., Ladépêche L., Ruel J., Sacchi S., Labasque M., Hanini M., Groc L., Pollegioni L., Mothet J.P., Oliet S.H. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists // Cell. 2012. V. 150. No. 3. P. 633–646.

Papouin T., Oliet S.H. Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2014. V. 369. No. 1654. available at http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/369/1654/20130601.long/. DOI: 10.1098/rstb.2013.0601

Park E., Na M., Choi J., Kim S., Lee J.R., Yoon J., Park D., Sheng M., Kim E. The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42 // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. No. 21. P. 19220–19229.

Peng J., Kim M.J., Cheng D., Duong D.M., Gygi S.P., Sheng M.

Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. No. 20. P. 21003–21011.

Penzes P., Johnson R.C., Sattler R., Zhang X., Huganir R.L., Kambampati V., Mains R.E., Eipper B.A. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis // Neuron. 2001. V. 29. No. 1. P. 229–242.

Racca C., Stephenson F.A., Streit P., Roberts J.D.B., Somogyi P. NMDA receptor content of synapses in striatum radiatum of the hippocampal CA1 area // J. Neurosci. 2000. V. 20. No. 7. P. 2512–2522.

Raghuram V., Sharma Y., Kreutz M.R. $Ca^{(2+)}$ sensor proteins in dendritic spines: a race for $Ca^{(2+)}$ // Front. Mol. Neurosci. 2012. V. 5. P. 61.

Rodríguez-Rodríguez E., Infante J., Llorca J., Mateo I., Sánchez-Quintana C., García-Gorostiaga I., Sánchez-Juan P., Berciano J., Combarros O. Age-dependent association of KIBRA genetic variation and Alzheimer's disease risk // Neurobiol. Aging. 2009. V. 30. No. 2. P. 322–324.

Schito A.M., Pizzuti A., Di M.E., Schenone A., Ratti A., Defferrari R., Bellone E., Mancardi G.L., Ajmar F., Mandich P. mRNA distribution in adult human brain of GRIN2B, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit // Neurosci. Lett. 1997. V. 239. No. 1. P. 49–53.

Sheng M., Cummings J., Roldan L.A., Jan Y.N., Jan L.Y. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex // Nature. 1994. V. 368. P. 144–147.

Shiraishi-Yamaguchi Y., Sato Y., Sakai R., Mizutani A., Knöpfe T., Mori N., Mikoshiba K., Furuichi T. Interaction of Cupidin/Homer2 with two actin cytoskeletal regulators, Cdc42 small GTPase and Drebrin, in dendritic spines // BMC Neurosci. 2009. V. 10. P. 25.

Smrt R., Zhao X. Epigenetic regulation of neuronal dendrite and dendritic spine development // Front. Biol. 2010. V. 5. No. 4. P. 304–323.

Takumi Y., Ramírez-León V., Laake P., Rinvik E., Ottersen O.P. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses // Nat. Neurosci. 1999. V. 2. No. 7. P. 618–624.

Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function // Pharmacol. Rev. 2010. V. 62. No. 3. P. 405–496.

Tu H., Tang T.S., Wang Z. Association of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor with AKAP9 (Yotiao) and protein kinase A // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. No. 18. P. 19375–19382.

Tu J.C., Xiao B., Naisbitt S., Yuan J.P., Petralia R.S., Brakeman P., Doan A., Aakalu V.K., Lanahan A.A., Sheng M., Worley P.F. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins // Neuron. 1999. V. 23. No. 3. P. 583–592.

Ullmer C., Schmuck K., Figge A., Lübbert H. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein // FEBS Lett. 1998. V. 424. No. 1/2. P. 63–68.

Wu S.H., Arévalo J.C., Sarti F., Tessarollo L., Gan W.B., Chao M.V. Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning/Kidins220 protein regulates dendritic branching and spine stability *in vivo* // Dev. Neurobiol. 2009. V. 69. No. 9. P. 547–557.

Zhang H., Wang D., Sun H., Hall R.A., Yun C.C. MAGI-3 regulates LPA-induced activation of Erk and RhoA // Cell. Signal. 2007. V. 19. No. 2. P. 261–268.

RECONSTRUCTION OF THE MOLECULAR INTERACTOME IN THE SYSTEM OF GLUTAMATERGIC SYNAPSES

A.L. Proskura, S.O. Vechkapova, T.A. Zapara, A.S. Ratushnyak

Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: annleop@mail.ru

Summary

The subunit composition of ionotropic glutamate receptors plays a significant role in synapse functioning. NMDA receptors mediate fast excitatory neurotransmission. They can convert specific patterns of neuronal activity to long-term changes of the synaptic structure and functions. The main functional properties (ionic conductivity, sensitivity to glutamate and agonists, sensitivity to magnesium ions, and deactivation time), spatial location, anchoring on the membrane, and sensitivity to pharmacological agents are defined by their subunit composition. The investigation of the protein-protein interaction system in macrocomplexes of NMDA receptor subunits is an urgent task. Its solution will shed light on the principles and molecular mechanisms that implement the main functions of a neuron and on mechanisms of disorder development. It will be helpful in the search for pharmacological and therapeutic targets for their corrections. The aim of this investigation is to analyze and reconstruct the protein-protein interactions of NMDA receptor subunits that support their mobility and anchoring on the synaptic membrane, as well as their role in the processes of modulation and support of synaptic transmission efficiency in the hippocampus. Three groups of proteins have been recognized. They support the formation of macrocomplexes of NMDA receptors in the glutamatergic synapses of the hippocampus. Proteins are divided into groups according to their functions in complexes. The division is based on information from different databases and scientific articles where the structures of genes and proteins, expression in the brain, and roles in the processes of synaptic plasticity are described. Special attention is focused on proteins for which associations with various cognitive disorders have been established.

Key words: glutamate receptors, macrocomplexes, synaptic plasticity.

УДК 577.113.3:57.087.1

ВЫЯВЛЕНИЕ СВЯЗИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА СО СРОДСТВОМ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА К ПРОМОТОРАМ ЭТИХ ГЕНОВ

© 2014 г. **М.П. Пономаренко[1, 2], В.В. Суслов[1], К.В. Гунбин[1, 2], П.М. Пономаренко[3], О.В. Вишневский[1, 2], Н.А. Колчанов[1, 2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: pon@bionet.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия;
[3] Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

Поступила в редакцию 27 сентября 2014 г. Принята к публикации 5 ноября 2014 г.

Вариабельность экспрессии генов всегда была в самом центре внимания весьма широкого круга исследований, которые были направлены на реконструкцию сайтов на ДНК для связывания регуляторных белков, регуляторных районов генов, генных сетей, путей передачи сигналов в них, а также всего разнообразия других геномных объектов, которые могли бы изменять экспрессию генов. Коэффициент вариации Пирсона (Cv, отношение стандартного отклонения к среднему) был чаще всего использован в качестве меры вариабельности экспрессии генов в таких областях интенсивных исследований, как биомедицина и селекция. В свою очередь, только единственный универсальный общий регуляторный сигнал был идентифицирован в геномах у всех эукариот, а именно: ТАТА-бокс вместе с сопровождающими его тремя оставшимися менее консервативными облигатными элементами, DPE, BPE и INR, в составе коровых промоторов. С помощью нашего экспериментально подтвержденного уравнения для оценки величин сродства ТАТА-бокс связывающего белка (TBP) к ТАТА-боксу мы проанализировали данные высокопроизводительного секвенирования для 35 609 мРНК в 946 сегментах мозга человека, которые были взяты нами из базы данных Allen Brain Atlas. В результате нами была обнаружена статистически достоверная линейная корреляция между экспериментально измеренными *in vivo* величинами коэффициента вариации экспрессии генов путей передачи сигналов в мозге человека и компьютерными *in silico* оценками для величин сродства ТАТА-бокс связывающего белка к промоторам этих генов. Этот результат может помочь в анализе данных высокопроизводительного секвенирования, которые были получены с целью идентификации того, что еще могло бы изменять экспрессию генов.

Ключевые слова: ген, промотор, ТАТА-связывающий белок (TBP), сродство TBP/ДНК, экспрессия, коэффициент вариации (Cv), корреляция, мозг, человек.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших характеристик жизнедеятельности организма является вариабельность экспрессии его генов (дифференциальная, циклическая, стресс- и стимул-зависимая, эпигенетическая и т. п.) на различных уровнях организации живых систем (организменном – внутриклеточном, тканевом, орган- и стадий-специфическом и др.; популяционном – возрастном, пол-специфическом, видовом и т. д.) (Rausenberger *et al*., 2009). Анализ вариабельности экспрессии генов позволяет реконструировать генные сети (Chalancon *et al*., 2012), пути

передачи сигналов регуляции генов (Gilbert *et al*., 2006) и интерференцию между ними (Balazsi *et al*., 2011). Также на основе анализа вариабельности экспрессии генов выявляют регуляторные районы этих генов (Munsky *et al*., 2012), кластеры множественных элементов ответа на регуляторные сигналы (Mironova *et al*., 2013), композиционные элементы (Stepanova, Alonso, 2009) и эпигенетические факторы (Whitelaw *et al*., 2010), которые способны изменять экспрессию генов.

В опытах вариабельность экспрессии генов характеризуют соответствующими статистиками – главные компоненты, фактор Фано, коэффициенты Хилла, детерминации, кластеризации, причинности Грэнджера, авторегрессии, а также корреляциями Пирсона, Фурье, Спирмана и др. (см., например, Rosa *et al*., 2012). Каждая статистика была лучше или хуже для некоторых типов вариабельности, проявлявшихся на определенном уровне организации живых систем.

Коэффициент вариации (Cv, отношение стандартного отклонения к среднему) применялся наиболее часто и показал себя удобным для широкого круга типов вариабельности и уровней организации жизни (Ghosh *et al*., 2011). Его широко используют для оценки эффективности селекции на продуктивность, например, животных – на технологические свойства мяса (Михайлов и др., 2011) и на прядильность шерсти (Кулаков и др., 1999), растений – на содержание витаминов (Расторгуев, 2008), качество зерна (Кислинский, 1997) и количество зеленой массы (Куркина, 2004). С помощью Cv также оценивают степень генетического дрейфа (Pardo *et al*., 2005) и степень фенотипического проявления – экспрессивность и пенетрантность – патологий человека (Ou *et al*., 2011), а также успешность их диагностики (Кравцов и др., 2011), мониторинга (Willems *et al*., 2000) и лечения (Geoerger *et al*., 2009).

С вариабельностью экспрессии признаков, с которыми работают исследователи, напрямую связаны и представления об адаптивной эволюции. Синтетическая теория эволюции (СТЭ) была построена преимущественно на качественных, т. е. с низкой степенью вариабельности, признаках. Для таких признаков отбор может непосредственно менять частоту аллелей (Левонтин, 1978). Ч. Дарвин (1991), имевший дело, прежде всего, с морфологическими признаками с широкой вариабельностью, рассматривал эволюцию как адаптивный переход между изменчивостью неопределенной (признаки с широкой вариабельностью, с широкой нормой реакции (Иогансен, 1933)) и определенной – с низкой вариабельностью. При таком подходе Cv будет являться количественной мерой нормы реакции экспрессии гена, так как он характеризует степень различия признаков фенотипа у генетически однородной группы особей, прежде всего из-за различия факторов внешней среды (например, по доступности пищи, температуре). Ожидалось, что у группы генетически идентичных особей в идентичных условиях это различие будет нивелировано. Однако В.А. Струнников (1989) на популяции партеногенетических, т. е. генетически идентичных *Bombyx mori*, выращенных в среде высококонтролируемой идентичности, показал, что это не так. Природу открытой им реализационной изменчивости он связывал с шумовой вариабельностью – стохастической несогласованностью в многоступенчатых процессах регуляции онтогенеза.

Близкую точку зрения высказал В.А. Черданцев (2003), который связывал открытую им внутрииндивидуальную изменчивость сериальных органов с ограниченностью по ресурсу. Поскольку эмбриональная закладка имеет ограниченные размеры, лишь первые органы серии формируются в оптимальных условиях. Условия работы генетической программы при формировании каждого последующего органа серии будут деформированы предыдущим. Поэтому изменчивость в серии органов нарастает со временем их появления, хотя все они – продукты одной и той же генетической программы. В работе И.А. Аршавского (1982) была показана важность активации такой изменчивости для нормального онтогенеза. Вариабельность, связанная с интерференцией разных генетических программ и/или генных сетей на надгенном онтогенетическом уровне, была выявлена в экспериментах М.М. Камшилова (1939), а также при дестабилизирующем отборе (Belyaev, 1978). Однако возможность контекстного сигнала в геноме, который мог бы вносить достоверный вклад в вариабельность

экспрессии генов, до сих пор не рассматривалась и поэтому никто не искал в геноме такой сигнал. Лишь в узком диапазоне условий опыта (Blake *et al*., 2006) наблюдали *in vivo* изменение Cv экспрессии искусственного гена при мутациях в TATA-боксе его химерного промотора, но экспрессия этого гена была стационарной при всех иных условиях.

В этой работе мы проверили эмпирическое наблюдение (Blake *et al*., 2006) путем анализа экспериментальных данных об экспрессии генов в мозге человека и мыши. В результате мы обнаружили связь между Cv экспрессии генов путей передачи сигналов в мозге человека и сродством TBP к их промоторам. Эта связь означает, что TATA-бокс – один из контекстных сигналов, которые вносят вклад в вариабельность экспрессии генов. В этом состоит главный результат нашей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Транскриптом мозга. Были проанализированы последовательности ДНК районов [–70; –20] относительно стартов транскрипции (район экспериментально доказанных TATA-боксов (Ponomarenko *et al*., 2013)) для 35 609 генов человека и для 12 931 гена мыши. Последовательности генов человека были взяты из референсного генома человека (hg19) из базы данных RefSeq, вып. 52, (Pruitt *et al*., 2012). Последовательности генов мыши были взяты из референсного генома мыши, вып. 69, базы данных Ensembl (Flicek *et al*., 2011) с помощью UCSC Genome Browser (Dreszer *et al.*, 2012). Каждая из этих последовательностей ДНК была охарактеризована величиной Cv. Эти величины отложены по вертикальным осям на рис. 1 и 2. Они были оценены по экспериментальным данным об экспрессии каждого гена. Величины экспрессии генов были в пределах от 0 до 255 условных единиц. Эти величины уровня экспрессии 35 609 генов в 946 сегментах мозга человека были взяты из базы данных Allen Brain Atlas (Jones *et al*., 2009). Аналогично величины уровня экспрессии 12 931 гена мыши в 51 533 вокселях (элементарный образец мозга объемом 200 $\mu м^3$, «voxel, volumetric picture element») были взяты из транскриптома мозга мыши (Lein *et al*., 2007).

Анализ транскриптома мозга. Для каждой последовательности ДНК был найден максимум величины $-\ln(K_D)$ сродства TBP/ДНК в скользящем окне длиной 26 п.о., как описано в статье Рассказова с соавт. (2013). Эти величины в натуральных логарифмических единицах (ln) отложены по горизонтальной оси на рис. 1 и 2.

Пары величин Cv (%) и $-\ln(K_D)$ в ln (ед.) для всех 35 609 гена человека и отдельно для всех 12 931 гена мыши были масштабированы в шкалу [0; 1] относительных единиц и сгруппированы в два кластера с помощью пакета Statistica (StatsoftTM, Tulsa, USA) при предустановленных параметрах без какой-либо иной обработки. Главному и минорному кластерам природных генов соответствуют серые «+» и черные «○» на рис. 1 для человека и на рис. 2 – для мыши. Эти рисунки представляют результаты Statistica для комбинации метода ближайших соседей (Single linkage) с расстоянием Евклида. Результаты Statistica для всех $42 = 7 \times 6$ возможных комбинаций 7 методов кластеризации и 6 мер сходства этого пакета различались в пределах 2 % от объема данных, чаще всего вблизи границы между кластерами (данные не показаны). Эти кластеры генов были аннотированы с помощью пакета DAVID, вып. 6.7 (Huang *et al*., 2009) в форме 10 терминов Gene Ontology (GO) с наивысшими оценками достоверности с поправкой Бонферрони (табл. 1, 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Транскриптом мозга человека. Результат бинарной кластеризации 35 609 генов человека по оценкам Cv экспрессии в мозге (Jones *et al*., 2009) в сравнении с оценками $-\ln(K_D)$ сродства TBP к их промоторам (Рассказов и др., 2013) показан на рис. 1. В табл. 1 можно видеть функциональную GO-аннотацию этого результата с использованием пакета DAVID, вып. 6.7 (Huang *et al*., 2009). Главный кластер (серые «+») включал 27 234 гена (76 %), которые имели низкую 10 ± 6 % среднеарифметическую оценку Cv. Как можно видеть в табл. 1, большинство генов человека из главного кластера с конститутивной (стационарной) экспрессией в мозге соответствуют ферментам внутриклеточного метаболизма. Это, чаще всего, – гены

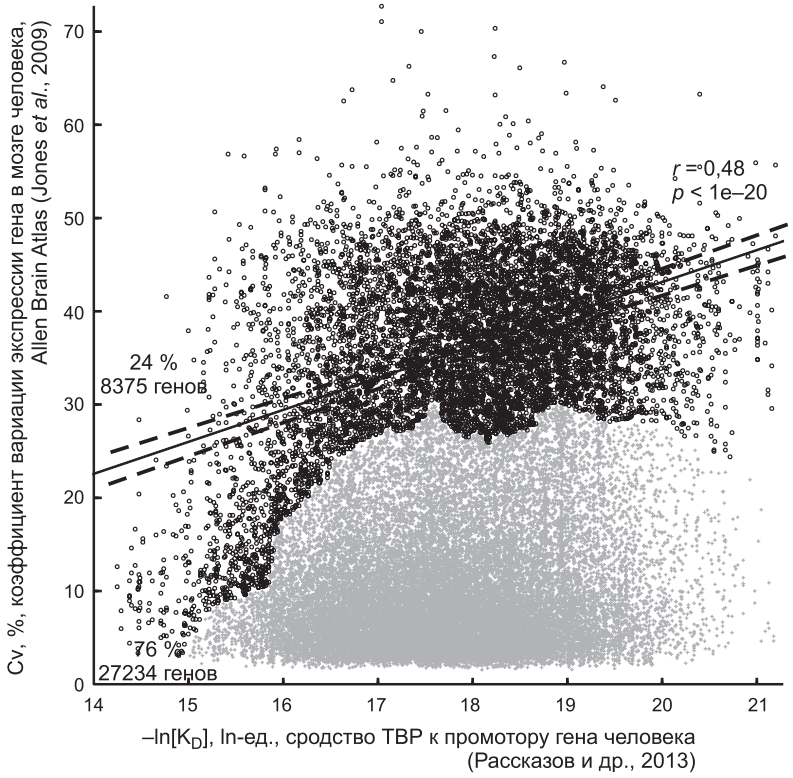


Рис. 1. Достоверная ($r = 0{,}48$, $p < 10^{-20}$) корреляция между коэффициентом вариации Cv экспрессии генов путей передачи сигналов в мозге человека и сродством TATA-связывающего белка к их промоторам, $-\ln(K_D)$.

Главный кластер (серые «+»): 27 234 гена (76 %) с низкой 10 ± 6 % средней оценкой Cv, которые ассоциированы с «домашним хозяйством» внутри клеток мозга человека (табл. 1). Минорный кластер (черные «○»): 8 375 генов (24 %) с высокой 36 ± 9 % средней оценкой Cv, которые ассоциированы с рецепторами путей передачи сигналов на внешних мембранах клеток мозга человека (табл. 1). Пунктир: 95 % – доверительный интервал регрессии, Statistica (Statsoft™, USA).

Fig. 1. The significant correlation ($r = 0{,}48$, $p < 10^{-20}$) between Cv-values for mRNAs of signaling pathway genes in the human brain and -ln[K_D] values of TATA-binding protein affinity for promoters of these genes.

The main cluster (+, gray), of 27 234 genes (76 %), clustered by Statistica (StatsoftTM, USA) had the lowest mean Cv value, 10 ± 6 %. These genes were associated with the «housekeeping» inside cells of the human brain (Table 1). The minor cluster of 8 375 genes (○, black), (24 %), had the highest mean Cv value, 36 ± 9 %. These genes were associated by the same way with the signaling pathway receptors on outer membranes of human brain cells (Table 1). Dashed curves show 95 % confidence intervals for the linear regression (solid lines) built with Statistica.

«домашнего хозяйства», которые обеспечивают базовый уровень жизнеспособности любой живой клетки.

Минорный кластер (черные «○») включал 8 375 генов человека (24 %) с высокой 36 ± 9 % среднеарифметической оценкой Cv. Эти гены кодировали рецепторы путей передачи сигналов на внешних мембранах клеток мозга человека. Была обнаружена достоверная связь между Cv экспрессии этих генов в мозге (Jones *et al*., 2009) и оценкой $-\ln(K_D)$ сродства TBP к их промоторам, $r = 0{,}48$ ($p < 10^{-20}$).

Поскольку стало общепринятым требование (Encode project Consortium ..., 2012) сопоставлять результаты идентичного анализа нескольких независимых транскриптомов, то результат анализа данных RNA-Seq уровня экспрессии генов в мозге человека (рис. 1 и табл. 1) был сопоставлен с результатом идентичного анализа для независимых микрочип-данных уровня экспрессии генов в мозге мыши.

Транскриптом мозга мыши. Как можно видеть на рис. 2, в главном кластере (серые, «+») было 11 805 генов мыши (91 %) с низким 189 ± 98 % средним Cv, тогда как в минорном кластере (черные «○») было 1126 генов (9 %) с высоким 551 ± 166 % средним Cv. При этом минорный кластер был охарактеризован

Таблица 1

Аннотация главного и минорного кластеров генов человека в терминах Gene Ontology, *GO:№ (достоверность), с помощью DAVID, вып. 6.7 (Huang *et al*., 2009)

Главный кластер: 27 234 гена (76 %) с низкой вариабельностью экспрессии	Минорный кластер: 8 375 генов (24 %) с высокой вариабельностью экспрессии
Биологический процесс	
0044237~cellular metabolic process (10^{-33})	0032501~multicellular organismal process (10^{-78})
0009987~cellular process (10^{-29})	0007186~G-protein coupled receptor protein signaling pathway (10^{-61})
0044260~cellular macromolecule metabolic process (10^{-24})	0007600~sensory perception (10^{-60})
0008152~metabolic process (10^{-20})	0007606~sensory perception of chemical stimulus (10^{-59})
0044267~cellular protein metabolic process (10^{-16})	0007608~sensory perception of smell (10^{-58})
0044238~primary metabolic process(10^{-16})	0050890~cognition (10^{-48})
0043170~macromolecule metabolic process (10^{-12})	0007166~cell surface receptor linked signal transduction (10^{-48})
0046907~intracellular transport (10^{-12})	0003008~system process (10^{-41})
0006139~nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process (10^{-11})	0050877~neurological system process (10^{-35})
0034641~cellular nitrogen compound metabolic process (10^{-11})	0050896~response to stimulus (10^{-32})
Внутриклеточный компартмент	
0005622~intracellular (10^{-90})	0005576~extracellular region (10^{-90})
0044424~intracellular part (10^{-85})	0044421~extracellular region part (10^{-41})
0043231~intracellular membrane-bounded organelle (10^{-66})	0005886~plasma membrane (10^{-37})
0043227~membrane-bounded organelle (10^{-66})	0031224~intrinsic to membrane (10^{-28})
0043229~intracellular organelle (10^{-63})	0005615~extracellular space (10^{-28})
0043226~organelle (10^{-62})	0016021~integral to membrane (10^{-27})
0005737~cytoplasm (10^{-54})	0031226~intrinsic to plasma membrane (10^{-17})
0005623~cell (10^{-44})	0005887~integral to plasma membrane (10^{-16})
0044444~cytoplasmic part (10^{-44})	0005578~proteinaceous extracellular matrix (10^{-11})
0044464~cell part (10^{-44})	0031012~extracellular matrix (10^{-10})
Молекулярная функция	
0005488~binding (10^{-21})	0004930~G-protein coupled receptor activity (10^{-74})
0005515~protein binding (10^{-15})	0004888~transmembrane receptor activity (10^{-74})
0003824~catalytic activity (10^{-10})	0004872~receptor activity (10^{-68})
0003723~RNA binding (10^{-7})	0004984~olfactory receptor activity (10^{-62})
0000166~nucleotide binding (10^{-6})	0004871~signal transducer activity(10^{-48})
0046914~transition metal ion binding (10^{-4})	0060089~molecular transducer activity (10^{-48})
0030695~GTPase regulator activity (10^{-3})	0043565~sequence-specific DNA binding (10^{-16})
0017076~purine nucleotide binding (10^{-3})	0005125~cytokine activity (10^{-13})
0060589~nucleoside-triphosphatase regulator activity (10^{-3})	0001653~peptide receptor activity (10^{-13})
0016740~transferase activity (10^{-3})	0008528~peptide receptor activity, G-protein coupled (10^{-13})

* 10 лучших терминов по убыванию достоверности с поправкой Бонферрони.

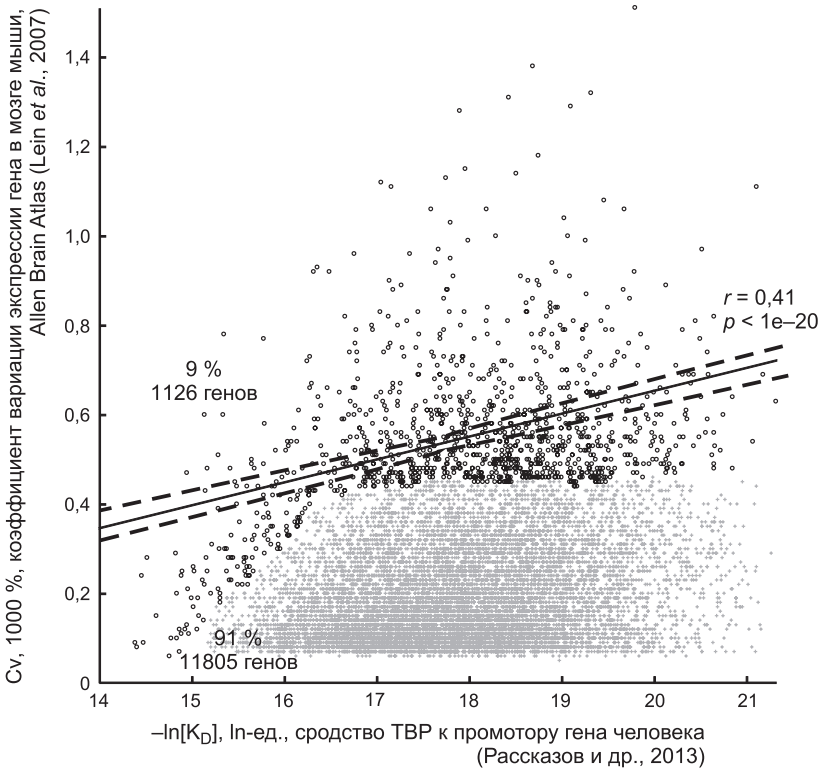


Рис. 2. Достоверная ($r = 0{,}41$, $p < 10^{-20}$) корреляция между коэффициентом вариации Cv экспрессии генов из минорного кластера в мозге мыши и сродством TATA-связывающего белка к их промоторам, $-\ln(K_D)$.

Главный кластер (серые «+»): 11 805 генов (91 %) с низким 189 ± 98 % средним Cv. Минорный кластер (черные «○»): 1 126 генов (9 %) с высоким 551 ± 166 % средним Cv. Пунктир – 95 %-й доверительный интервал, Statistica (Statsoft™, USA).

Fig. 2. The significant correlation ($r = 0{,}41$, $p < 10^{-20}$) between Cv values for mRNAs of the minor cluster of genes in the mouse brain and «$-\ln[K_D]$»-values of TATA-binding protein affinity for promoters of these genes.

The main cluster of genes (+, colored gray), 11 805 out of 12 931 (91 %), clustered by Statistica had the lowest mean Cv-value, 189 ± 98 %. The minor cluster of genes (○, colored black), 1 126 out of 12 931 (9 %), had the highest mean Cv-value, 551 ± 166 %. Dashed curves show 95 % confidence intervals for the linear regression (solid lines) built with Statistica.

достоверной корреляцией между Cv экспрессии генов в мозге мыши и оценкой *in silico* $-\ln(K_D)$ сродства TBP к их промоторам, $r = 0{,}41$ ($p < 10^{-20}$).

Однако пакет DAVID, вып. 6.7 (Huang *et al*., 2009) не нашел достоверных GO-терминов ни для главного, ни для минорного кластеров генов мыши (данные не показаны). Поскольку главный кластер включал 91 % генов мыши, а минорный всего лишь 9 % генов из опыта (Lein *et al*., 2007), то с помощью пакета DAVID были дополнительно аннотированы все исследованные гены мыши из опыта (Lein *et al*., 2007) относительно референсного генома мыши, вып. 69 (Flicek *et al*., 2011).

Результат GO-аннотации 12 931 гена мыши (Lein *et al*., 2007) показан в табл. 2. Ни один из 30 терминов GO-аннотации генов мыши не совпал с GO-терминами минорного кластера генов человека, тогда как 22 термина (73 %) совпали с GO-терминами главного кластера генов человека. Это означает достоверное соответствие генов мыши из опыта (Lein *et al*., 2007) главному кластеру генов человека ($p < 10^{-17}$, закон бинома).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сопоставление результатов анализа независимых данных об экспрессии генов в мозге человека (Jones *et al*., 2009) и в мозге мыши (Lein *et al*., 2007) показало хорошее качественное согласие одних с другими. Прежде всего, абсолютное большинство генов как у человека, так и у мыши имело конститутивную экс-

Таблица 2

Аннотация всех исследованных генов мыши
из экспериментальных данных
(Lein *et al*., 2007) с помощью пакета DAVID,
вып. 6.7 (Huang *et al*., 2009)

Термин Gene Ontology (GO)*	Достоверность с поправкой Бонферрони
Биологический процесс	
GO:0009987~cellular process	$1{,}80 \times 10^{-107}$
GO:0008152~metabolic process	$8{,}56 \times 10^{-57}$
GO:0044237~cellular metabolic process	$2{,}85 \times 10^{-47}$
GO:0044238~primary metabolic process	$5{,}29 \times 10^{-47}$
GO:0043170~macromolecule metabolic process	$1{,}51 \times 10^{-29}$
GO:0044260~cellular macromolecule metabolic process	$1{,}27 \times 10^{-27}$
GO:0019538~protein metabolic process	$7{,}32 \times 10^{-15}$
GO:0044267~cellular protein metabolic process	$2{,}86 \times 10^{-14}$
GO:0006807~nitrogen compound metabolic process	$5{,}63 \times 10^{-14}$
GO:0034641~cellular nitrogen compound metabolic process	$2{,}72 \times 10^{-12}$
Внутриклеточный компартмент	
GO:0044424~intracellular part	$8{,}11 \times 10^{-89}$
GO:0005737~cytoplasm	$3{,}45 \times 10^{-79}$
GO:0005622~intracellular	$5{,}29 \times 10^{-74}$
GO:0043226~organelle	$9{,}40 \times 10^{-62}$
GO:0043229~intracellular organelle	$2{,}03 \times 10^{-61}$
GO:0043231~intracellular membrane-bounded organelle	$6{,}97 \times 10^{-59}$
GO:0043227~membrane-bounded organelle	$7{,}03 \times 10^{-59}$
GO:0044444~cytoplasmic part	$7{,}35 \times 10^{-51}$
GO:0044422~organelle part	$2{,}40 \times 10^{-16}$
GO:0044446~intracellular organelle part	$4{,}89 \times 10^{-16}$
Молекулярная функция	
GO:0005488~binding	$1{,}01 \times 10^{-75}$
GO:0003824~catalytic activity	$6{,}99 \times 10^{-42}$
GO:0005515~protein binding	$2{,}26 \times 10^{-39}$
GO:0000166~nucleotide binding	$6{,}99 \times 10^{-21}$
GO:0017076~purine nucleotide binding	$5{,}03 \times 10^{-20}$
GO:0032553~ribonucleotide binding	$2{,}84 \times 10^{-17}$
GO:0032555~purine ribonucleotide binding	$2{,}84 \times 10^{-17}$
GO:0016740~transferase activity	$6{,}76 \times 10^{-16}$
GO:0001883~purine nucleoside binding	$2{,}28 \times 10^{-15}$
GO:0001882~nucleoside binding	$3{,}64 \times 10^{-15}$

***** 10 лучших терминов по убыванию их достоверности; курсив – 8 GO-терминов, отсутствующих в GO-аннотации главного кластера генов человека, табл. 1.

прессию для функций «домашнего хозяйства» внутри клеток мозга. При этом меньшинство генов имело вариабельную экспрессию в мозге. Наконец, для генов путей передачи сигналов в мозге человека была обнаружена достоверная корреляция между Cv экспрессии этих генов и оценкой $-\ln(K_D)$ сродства TBP к их промоторам. Эта корреляция была в согласии с такой корреляцией для минорного кластера генов мыши. Она указывает на контекстный сигнал генома – TATA бокс, который вносит достоверный вклад в вариабельность экспрессии генов путей передачи сигналов в мозге человека. Это главный результат нашей работы.

Прежде всего, этот результат согласуется с выводами ряда независимых полногеномных исследований. Например, Nakamura с соавт. (2002), Yang с соавт. (2007), Dong с соавт. (2011) достоверно ассоциировали пути передачи сигналов с TATA-содержащими промоторами генов, тогда как у генов «домашнего хозяйства» достоверно более частыми были TATA-несодержащие промоторы.

Аналогично гены с TATA-содержащими промоторами были ассоциированы со стохастическим ответом на индукторы в отличие от детерминированного ответа в случае генов с TATA-несодержащими промоторами (Raser, O'Shea, 2004). Также индуцибельная транскрипция была ассоциирована с TATA-содержащими промоторами генов, в то время как конститутивная – с TATA-несодержащими промоторами (Tora, Timmers, 2010). Наконец, пластичная регуляция экспрессии была достоверно ассоциирована с TATA-содержащими промоторами генов, тогда как постоянная – с TATA-несодержащими промоторами генов (Lin *et al*., 2010).

В свою очередь, обнаружение в геноме контекстного сигнала – TATA бокса, который может вносить достоверный вклад в вариабельность экспрессии генов, развивает существующие представления о реализационной (Струнников, 1989), внутрииндивидуальной (Черданцев, 2003) и интерференционной (Камшилов, 1939; Belyaev, 1979; Аршавский, 1982) изменчивости признаков организмов без необходимости соответствующей вариабельности условий внешней среды.

Обнаруженная связь Cv экспрессии генов со сродством TBP/промотор также может иметь практическую ценность в анализе транскриптомов по крайней мере с целью предварительной группировки генов со сходными паттернами экспрессии – взаимно коррелирующими, циклическими, импульсными, запаздывающими, пороговыми и т. п. для последующего анализа каждой такой группы генов отдельно с помощью соответствующих статистических методов (Oh *et al*., 2014).

Целесообразность подобной группировки генов на основе сравнения оценок *in vivo* для Cv экспрессии генов с оценками *in silico* для сродства TBP к промоторам этих генов показана на рис. 1. Например, мысленно проводя горизонтальную линию, можно разделить все гены на две группы с низкими и с высокими оценками Cv *in vivo*, как и с помощью такой вертикальной линии – с низкими и высокими оценками *in silico* сродства TBP к промоторам генов. В случаях каждой из этих ортогональных линий раздела большинство генов может быть сгруппировано правильно, хотя и с очень большой долей ошибочно сгруппированных генов из-за взаимосвязи этих оценок *in vivo* и *in silico*, а также вследствие соответствующей этой взаимосвязи нелинейной границы между группами генов. Поиск взаимосвязи между оценками *in vivo* и *in silico* способствует биологической интерпретации транскриптомов (для транскриптома мозга человека, см. табл. 1).

В свою очередь, опыт *in vivo* (Mogno *et al*., 2010) доказал значимую корреляцию экспрессии генов со сродством TBP к их промоторам. В приближении «лимитирующей стадии» сайт на ДНК для связывания TBP – TATA-бокс, – может быть оптимизирован лишь для «лимитирующей» функции полифункционального гена. Тогда для всех остальных «нелимитирующих» функций экспрессия этого гена будет тем избыточнее, чем выше сродство TBP к оптимизированному TATA-боксу этого гена. Эта избыточная экспрессия полифункциональных генов для их «нелимитирующих» функций может быть одним из возможных молекулярных механизмов вклада TATA-боксов в вариабельность экспрессии некоторых генов.

Наконец, в опыте Godde с соавт. (1995) было показано, что связывание TBP с промотором ослабляет его нуклеосомную упаковку до уровня, необходимого для сборки преинициаторного

комплекса транскрипции. В этой связи представляется возможным предложить гипотезу о том, что нуклеосомный потенциал и CpG-острова для метилирования промотора также могут быть контекстными сигналами-кандидатами в геноме, способными вносить вклад в вариабельность экспрессии генов. Эта гипотеза согласуется с наблюдениями в опытах Gao с соавт. (2005), Mottis с соавт. (2013) фактов влияния нуклеосомного потенциала ДНК и CpG-островов на эпигенетическую изменчивость определенных признаков некоторых организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе на примере транскриптома мозга человека была обнаружена достоверная связь вариабельности экспрессии генов путей передачи сигналов со сродством TBP к промоторам этих генов. Эта связь означает наличие в геноме контекстного сигнала – TATA бокса, который вносит вклад в вариабельность экспрессии генов. Эта ранее не известная биологическая функция TATA-боксов дополняет их экспериментально доказанный линейно-аддитивный вклад в уровни экспрессии генов (Mogno *et al*., 2010) и развивает существующие представления о некоторых формах изменчивости, которые не требуют необходимости изменений условий среды вокруг организмов. Показано также, что учет обнаруженной связи вариабельности экспрессии генов со сродством TBP к промоторам этих генов может способствовать улучшению биологической интерпретации транскриптома.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана грантами РФФИ 12-04-33112 и 14-04-00485, Интеграционным проектом СО РАН № 136 и проектом VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. М.: Наука, 1982. 270 с.
Arshavsky I.A. Physiological mechanisms and patterns of individual development. Moscow: Nauka, 1982. 270 s. (In Russian).

Дарвин Ч. Происхождение видов. СПб.: Наука, 1991. 540 с.
Darwin C.R. On the origin of species. SPb.: Nauka, 1991. 540 p. (In Russian).

Иогансен В. Элементы точного учения об изменчивости и наследственности с основами биологической вариационной статистики. М : Сельхозгиз, 1933. 410 с.
Johannsen W.L. The elements of an exact theory of variability and heredity based on biological variation statistics, Moscow: Sel'khozgiz, 1933. 410 s. (In Russian).

Камшилов М.М. Отбор как фактор, меняющий зависимость признака от изменений внешних условий // Докл. АН СССР. 1939. Т. 23. № 4. С. 361–364.
Kamshilov M.M. Selection as a factor that changes the trait dependence on changes in environmental conditions // Dokl. Akad. Nauk. 1939. V. 23. No. 4. P. 361–364. (In Russian).

Кислинский К.Н. Оценка устойчивости к загущению различных гибридов кукурузы по величине коэффициента вариации морфоанатомических параметров // Кукуруза и сорго. 1997. № 5. С. 9–10.
Kislinsky K.N. Evaluation of resistance to thickening of corn hybrids by the coefficient of variation of morphoanatomic measures // Kukuruza i sorgo. 1997. No. 5. P. 9–10. (In Russian).

Кравцов А.Л., Ляпин М.Н., Шмелькова Т.П., Головко Е.М., Милюкова Т.А., Костюкова Т.А., Ежов И.Н. Определение содержания ДНК в отдельных клетках Vibrio cholerae методом проточной цитофлуориметрии: сравнительный анализ неоднородности в клетках штаммов с различными биологическими свойствами // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 2011. С. 7–11.
Kravtsov A.L., Liapin M.N., Shmel'kova T.P., Golovko E.M., Maliukova T.A., Kostiukova T.A., Ezhov I.N. Determination of DNA content in individual Vibrio cholerae cells by the flow cytofluorometry method: comparative analysis of inhomogeneity in cells of strains with different biological properties // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011. No. 5. P. 7–11. (In Russian).

Кулаков Б.С., Ибрагимов Ю.Н., Завгородняя Г.В., Остроухов Н.А., Санькова О.Б. Характеристика тонкой шерсти некоторых пород овец Северного Кавказа // Овцы, козы, шерстяное дело. 1999. № 3. С. 10.
Kulakov B.S., Ibragimov Yu.N., Zavgorodnyaya G.V., Ostroukhov N.A., Sankova O.B. Some characteristics of fine wool sheep breeds of North Caucasus // Ovtsy, kozy, sherstyanoe delo. 1999. No. 3. P. 10. (In Russian).

Куркина Ю.Н. Мутанты с детерминантным типом роста // Информ. вестн. ВОГиС. 2004. № 30. С. 146–148.
Kurkina Yu.N. Mutants with the determinant type of growth // VOGiS Herald. 2004. V. 8. No. 3 (30). P. 146–148. (In Russian).

Левонтин Р. С. Генетические основы эволюции. М.: Мир, 1978. 338 с.
Lewontin R.C. The genetic basis of evolutionary change. Moscow: Mir, 1978. 338 p. (In Russian).

Михайлов Н., Свинарев И., Гончаров А. Мясные качества трехпородных гибридов // Животноводство России. 2011. № 3. С. 25–26.
Mikhailov N., Svinarev I., Goncharov A. Meat quality of three-breed hybrids // Zhivotnovodstvo Rossii. 2011. No.

3. P. 25–26. (In Russian).

Рассказов Д.А., Гунбин К.В., Пономаренко П.М., Вишневский О.В., Пономаренко М.П., Афонников Д.А. SNP_TATA_COMPARATOR: Web-сервис применения уравнения равновесия TBP/TATA-комплекса в сравнительной оценке SNPs промоторов генов, связанных с болезнями человека // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 4/1. С. 599–606.
Rasskazov D.A., Gunbin K.V., Ponomarenko P.M., Vishnevsky O.V., Ponomarenko M.P., Afonnikov D.A. SNP_TATA_COMPARATOR: Web-service for comparison of SNPs within gene promoters associated with human diseases using the equilibrium equation of the TBP/TATA complex // Vavilovckii Zhurn. Genetiki i Selektcii. 2013. V. 17. No. 4/1. P. 599–606. (In Russian).

Расторгуев С.Л. Изменчивость растений-регенерантов земляники, полученных методом тканевых культур // Вопр. соврем. науки и практики. 2008. Т. 2. № 1. С. 46–51.
Rastorgouev S.L. The variability of regenerated strawberry plants grown by tissue culture // Voprosy sovremennoi nauki i praktiki. 2008. V. 2. No. 1. P. 46–51. (In Russian).

Струнников В.А. Третья изменчивость // Природа. 1989. № 2. С. 17–27.
Strunnikov V.A. Third variability // Priroda. 1989. No. 2. P. 17–27. (In Russian).

Черданцев В.А. Морфогенез и эволюция. М.: Тов-во научных изданий КМК, 2003. 360 с.
Cherdantsev V.G. Morphogenesis and evolution. Moscow: KMK, 2003. 360 p. (In Russian).

Balazsi G., van Oudenaarden A., Collins J.J. Cellular decision making and biological noise: from microbes to mammals // Cell. 2011. V. 144. No. 6. P. 910–925.

Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication / The Wilhelmine E. Key 1978 Invitational Lecture // J. Heredity. 1979. V. 70. P. 301–308.

Blake W.J., Balazsi G., Kohanski M.A., Isaacs F.J., Murphy K.F., Kuang Y., Cantor C.R., Walt D.R., Collins J.J. Phenotypic consequences of promoter-mediated transcriptional noise // Mol. Cell. 2006. V. 24. No. 6. P. 853–865.

Chalancon G., Ravarani C.N., Balaji S., Martinez-Arias A., Aravind L., Jothi R., Babu M.M. Interplay between gene expression noise and regulatory network architecture // Trends Genet. 2012. V. 28. No. 5. P. 221–232.

Dong D., Yuan Z., Zhang Z. Evidences for increased expression variation of duplicate genes in budding yeast: from cis- to trans-regulation effects // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. No. 3. P. 837–847.

Dreszer T.R., Karolchik D., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Raney B.J., Kuhn R.M., Meyer L.R., Wong M., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Roe G., Rhead B., Pohl A., Malladi V.S., Li C.H., Learned K., Kirkup V., Hsu F., Harte R.A., Guruvadoo L., Goldman M., Giardine B.M., Fujita P.A., Diekhans M., Cline M.S., Clawson H., Barber G.P., Haussler D., James Kent W. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011 // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. D918-D923.

ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome // Nature. 2012. V. 489. No. 7414. P. 57–74.

Flicek P., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Brent S., Chen Y., Clapham P., Coates G., Fairley S., Fitzgerald S., Gordon L. Hendrix M., Hourlier T., Johnson N., Kahari A., Keefe D., Keenan S., Kinsella R., Kokocinski F., Kulesha E., Larsson P., Longden I., McLaren W., Overduin B., Pritchard B., Riat H.S., Rios D., Ritchie G.R., Ruffier M., Schuster M., Sobral D., Spudich G., Tang Y.A., Trevanion S., Vandrovcova J., Vilella A.J., White S., Wilder S.P., Zadissa A., Zamora J., Aken B.L., Birney E., Cunningham F., Dunham I., Durbin R., Fernandez-Suarez X.M., Herrero J., Hubbard T.J., Parker A., Proctor G., Vogel J., Searle S.M. Ensembl 2011 // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. Database issue. P. D800–D806.

Gao S., Skeldal S., Krogdahl A., Sorensen J.A., Andreasen P.A. CpG methylation of the PAI-1 gene 5'-flanking region is inversely correlated with PAI-1 mRNA levels in human cell lines // Thromb Haemost. 2005. V. 94. No. 3. P. 651–660.

Geoerger B., Morland B., Ndiaye A., Doz F., Kalifa G., Geoffray A., Pichon F., Frappaz D., Chatelut E., Opolon P., Hain S., Boderet F., Bosq J., Emile J.F., Le Deley M.C., Capdeville R., Vassal G. (Innovative Therapies for Children with Cancer European Consortium). Target-driven exploratory study of imatinib mesylate in children with solid malignancies by the Innovative Therapies for Children with Cancer (ITCC) European Consortium // Eur. J. Cancer. 2009. V. 45. No. 13. P. 2342–2351.

Ghosh S., Sureka K., Ghosh B., Bose I., Basu J., Kundu M. Phenotypic heterogeneity in mycobacterial stringent response // BMC Syst. Biol. 2011. V. 5. P. 18.

Gilbert D., Fuss H., Gu X., Orton R., Robinson S., Vyshemirsky V., Kurth M.J., Downes C.S., Dubitzky W. Computational methodologies for modelling, analysis and simulation of signalling networks // Brief. Bioinform. 2006. V. 7. No. 4. P. 339–353.

Godde J.S., Nakatani Y., Wolffe A.P. The amino-terminal tails of the core histones and the translational position of the TATA box determine TBP/TFIIA association with nucleosomal DNA // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. No. 22. P. 4557–4564.

Huang da W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources // Nat. Protoc. 2009. V. 4. No. 1. P. 44–57.

Jones A., Overly C., Sunkin S. The Allen Brain Atlas: 5 years and beyond // Nat. Rev. Neurosci. 2009. V. 10. No. 11. P. 821–828.

Lein E.S., Hawrylycz M.J., Ao N., Ayres M., Bensinger A., Bernard A., Boe A.F., Boguski M.S., Brockway K.S., Byrnes E.J., Chen L., Chen L., Chen T.M., Chin M.C., Chong J., Crook B.E., Czaplinska A., Dang C.N., Datta S., Dee N.R., Desaki A.L., Desta T., Diep E., Dolbeare T.A., Donelan M.J., Dong H.W., Dougherty J.G., Duncan B.J., Ebbert A.J., Eichele G., Estin L.K., Faber C., Facer B.A., Fields R., Fischer S.R., Fliss T.P., Frensley C., Gates S.N., Glattfelder K.J., Halverson K.R., Hart M.R., Hohmann J.G., Howell M.P., Jeung D.P., Johnson R.A., Karr P.T., Kawal R., Kidney J.M., Knapik R.H., Kuan C.L., Lake J.H., Laramee A.R., Larsen K.D., Lau C., Lemon T.A., Liang A.J., Liu Y., Luong L.T., Michaels J., Morgan J.J., Morgan R.J.,

Mortrud M.T., Mosqueda N.F., Ng L.L., Ng R., Orta G.J., Overly C.C., Pak T.H., Parry S.E., Pathak S.D., Pearson O.C., Puchalski R.B., Riley Z.L., Rockett H.R., Rowland S.A., Royall J.J., Ruiz M.J., Sarno N.R., Schaffnit K., Shapovalova N.V., Sivisay T., Slaughterbeck C.R., Smith S.C., Smith K.A., Smith B.I., Sodt A.J., Stewart N.N., Stumpf K.R., Sunkin S.M., Sutram M., Tam A., Teemer C.D., Thaller C., Thompson C.L., Varnam L.R., Visel A., Whitlock R.M., Wohnoutka P.E., Wolkey C.K., Wong V.Y., Wood M., Yaylaoglu M.B., Young R.C., Youngstrom B.L., Yuan X.F., Zhang B., Zwingman T.A., Jones A.R. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain // Nature. 2007. V. 445. P. 168–176.

Lin Z., Wu W.S., Liang H., Woo Y., Li W.H. The spatial distribution of cis regulatory elements in yeast promoters and its implications for transcriptional regulation // BMC Genomics. 2010. V. 11. P. 581.

Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Savina M.S., Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P., Likhoshvai V.A., Kolchanov N.A. How multiple auxin responsive elements interact in plant promoters: evidences from a reverse problem solution // J. Bioinform. Comput. Biol. 2013. V. 11. No. 1. P. 1340011.

Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B.A. TATA is a modular component of synthetic promoters // Genome Res. 2010. V. 20. No. 10. P. 1391–1397.

Mottis A., Mouchiroud L., Auwerx J. Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis // Genes Dev. 2013. V. 27. No. 8. P. 819–835.

Munsky B., Neuert G., van Oudenaarden A. Using gene expression noise to understand gene regulation // Science. 2012. V. 336. No. 6078. P. 183–187.

Nakamura M., Tsunoda T., Obokata J. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator // Plant J. 2002. V. 29. No. 1. P. 1–10.

Oh S., Song S., Dasgupta N., Grabowski G. The analytical landscape of static and temporal dynamics in transcriptome data // Front. Genet. 2014. V. 5. P. 35.

Ou Q.S., Cheng Z.J., Yang B., Jiang L., Chen J. Analysis of the ratio of mitochondrial DNA with A1555G mutant to wild type in deaf patients of Fujian province in China by a new method and its relationship with the severity of hearing loss // Chin. Med. J. (Engl). 2011. V. 124. No. 20. P. 3347–3352.

Pardo L.M., MacKay I., Oostra B., van Duijn C.M., Aulchenko Y.S. The effect of genetic drift in a young genetically isolated population // Ann. Hum. Genet. 2005. V. 69. Pt. 3. P. 288–295.

Ponomarenko M., Mironova V., Gunbin K., Savinkova L. Hogness Box // Brenner's Encyclopedia of Genetics: 2nd ed. / Eds S. Maloy, K. Hughes. San Diego: Academic Press, Elsevier Inc. 2013. V. 3. P. 491–494.

Pruitt K., Tatusova T., Brown G., Maglott D. NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. D130–D135.

Raser J.M., O'Shea E.K. Control of stochasticity in eukaryotic gene expression // Science. 2004. V. 304. No. 5678. P. 1811–1814.

Rausenberger J., Fleck C., Timmer J., Kollmann M. Signatures of gene expression noise in cellular systems // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2009. V. 100. No. 1/3. P. 57–66.

Rosa B.A., Jiao Y., Oh S., Montgomery B.L., Qin W., Chen J. Frequency-based time-series gene expression recomposition using PRIISM // BMC Syst. Biol. 2012. V. 6. P. 69.

Stepanova A.N., Alonso J.M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. No. 5. P. 548–555.

Tora L., Timmers H.T. The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics *in vivo* // Trends Biochem. Sci. 2010. V. 35. No. 6. P. 309–314.

Whitelaw N.C., Chong S., Whitelaw E. Tuning in to noise: epigenetics and intangible variation // Cell. 2010. V. 19. No. 5. P. 649–650.

Willems P., Verhagen O., Segeren C., Veenhuizen P., Guikema J., Wiemer E., Groothuis L., Jong T.B., Kok H., Bloem A., Bos N., Vellenga E., Mensink E., Sonneveld P., Lokhorst H., van Der Schoot E., Raymakers R. (Belgium-Dutch Hematology-Oncology Group) Consensus strategy to quantitate malignant cells in myeloma patients is validated in a multicenter study // Blood. 2000. V. 96. No. 1. P. 63–70.

Yang C., Bolotin E., Jiang T., Sladek F.M., Martinez E. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters // Gene. 2007. V. 389. No. 1. P. 52–65.

IDENTIFICATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE VARIABILITY OF THE EXPRESSION OF SIGNALING PATHWAY GENES IN THE HUMAN BRAIN AND AFFINITY OF TATA-BINDING PROTEIN TO THEIR PROMOTERS

M.P. Ponomarenko[1, 2], V.V. Suslov[1], K.V. Gunbin[1, 2], P.M. Ponomarenko[3], O.V. Vishnevsky[1, 2], N.A. Kolchanov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: pon@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
[3] Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA, USA

Summary

Variations in gene expression are the subject of a wide range of research aimed to reconstruct regulatory protein binding sites on DNA, regulatory gene regions, gene networks, signal transduction pathways, and many other entities able to modify gene expression. Pearson's coefficient of variation (Cv, the ratio of the standard deviation to the mean) has been the most often used measure of variations in gene expression within the fields of intense research in biomedicine and breeding. In turn, only one common genomic regulatory signal has been identified in all eukaryotes, namely, the TATA-box together with three other less conservative obligatory elements of promoter cores accompanying it: DPE, BPE, and INR. Using our experimentally proven equation for TATA-box Binding Protein (TBP) affinity for TATA-boxes, we analyzed high-throughput sequencing data on 35609 mRNAs in 946 human brain segments taken from The Allen Brain Atlas. We found a significant correlation between the affinity of the TATA-box binding protein (TBP) binding to promoters of genes of signaling pathways and Pearson's coefficient of variation of the expression of these genes was found. This finding may help scientists analyze high-throughput sequencing data in order to identify more candidate factors modifying gene expression.

Key words: gene, promoter, TATA-binding protein (TBP), of TBP/DNA-affinity, gene expression, coefficient of variation (Cv), correlation, brain, human.

УДК 004.94:57.011

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КАРТИРОВАНИЯ РИДОВ И СБОРКИ ТРАНСКРИПТОМА ДЛЯ ТКАНЕЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ *RATTUS NORVEGICUS*

© 2014 г. **П.Н. Меньшанов[1, 2], Н.Н. Дыгало[1, 2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: menshanovpn@icg.sbras.ru;
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15 сентября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Идентификация и количественная оценка уровней экспрессии всех вариантов транскриптов в исследуемых биологических образцах являются главной задачей при анализе транскриптомов тканей. Особое значение данная задача приобретает при анализе транскриптомов тканей нервной системы, для которых характерны процессы регулируемого альтернативного сплайсинга. В данной статье рассматривается ряд проблем, ассоциированных с локализацией последовательностей транскриптома на референсном геноме и последующей сборкой транскриптомов для образцов, полученных из ткани головного мозга. Внимание уделено вопросу однозначности локализации ридов; вопросу о размере ридов, а также проблеме неполной аннотированности геномов как у всех немодельных видов, так и у модельных организмов. В работе показано, что при одинаковых условиях секвенирования, геномной локализации ридов и последующей их сборки удельное количество межэкзонных ридов в транскриптомах, полученных из образцов ткани головного мозга, достоверно меньше по сравнению с удельным количеством таких ридов в транскриптомах других тканей. Подобная недопредставленность межэкзонных последовательностей в мРНК из тканей мозга может свидетельствовать об экспрессии значительного количества транскриптов, несущих новые неаннотированные сайты сплайсинга. Проведенный анализ стоимости–эффективности свидетельствует о необходимости использования при изучении транскриптома мозга технологий секвенирования, дающих длины ридов не менее 75 пар нуклеотидов. Для геномной локализации ридов и последующей сборки транскриптомов тканей ЦНС целесообразно использовать аннотации, включающие не только уже известные мРНК, но и последовательности транскриптов, предсказанные методом *ab initio* – например, аннотации консорциума Ensemble.

Ключевые слова: NG-секвенирование, транскриптом, геномное картирование последовательностей, сборка последовательностей, аннотация генома.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных задач, решаемых в ходе изучения транскриптома методами NGS-секвенирования, являются идентификация и количественная оценка уровней всех вариантов транскриптов, экспрессируемых в исследуемом биологическом образце (Martin, Wang, 2011). Особое значение данная задача приобретает при анализе транскриптомов тканей нервной системы, в которой активно протекают процессы регулируемого альтернативного сплайсинга (Ule *et al*., 2006). Альтернативный сплайсинг предопределяет количественные и качественные особенности транскриптома в ходе индивидуального развития головного мозга (Lin *et al*., 2010; Irimia *et al*., 2011; Tollervey *et al*., 2011). Преобладание тех или иных вариантов

транскриптов в ткани мозга также может стать отправной точкой развития ряда заболеваний ЦНС, в том числе нейродегенеративных и онкологических (Tollervey *et al*., 2011; Mills, Janitz, 2012; Oltean, Bates, 2014).

Современная биоинформатика имеет в своем арсенале целый набор методов для локализации последовательностей и сборки транскриптома, позволяющих в разумные сроки провести идентификацию и количественную оценку уровней мРНК, транскрибируемых в ткани (Treangen, Salzberg, 2011). Некоторые из этих методов, используемые в программах Tophat/Tophat2, STAR, MapSplice, RUM и Novoalign, были специально оптимизированы для детекции сплайс-вариантов и в настоящее время активно используются научным сообществом (Martin, Wang, 2011; Treangen, Salzberg, 2011; Salzberg *et al*., 2012). В данной работе рассмотрен ряд проблем, с которыми можно столкнуться при картировании ридов и сборке транскриптома из образцов нервной ткани.

ПРОБЛЕМА НЕПОЛНОЙ АННОТАЦИИ ГЕНОМОВ

Анализ статистики экзон-интронной организации генов у позвоночных свидетельствует о высокой консервативности ключевых параметров структурной организации генов среди животных этой группы (табл. 1) (Entrez Genome Database, 2014). Так, медианный размер экзона у позвоночных практически всегда находится в диапазоне 126–146 п.н, а среднее число экзонов на ген колеблется от 9 до 12 (табл. 1). Вместе с тем следует отметить, что у модельных видов позвоночных средняя длина экзонов составляет 340–360 п.н., тогда как для немодельных видов она чаще всего лежит в диапазоне 230–280 п.н. (табл. 1).

Подобное рассогласование является прямым следствием неполной аннотированности геномов у всех немодельных организмов, что может существенно осложнить процедуру локализации ридов транскриптома на референсном геноме и последующей сборки транскриптомов для таких видов.

Исходным материалом для сборки транскриптома является массив ридов – последовательностей, полученных в ходе секвенирования тотальной РНК (Martin, Wang, 2011). После отбраковки последовательностей низкого качества для ридов высокого качества устанавливается их геномная локализация и последовательности с установленной локализацией могут быть использованы для сборки транскриптома. Очевидно, что все последовательности с установленной локализацией могут быть подразделены на два класса: (1) риды с локализацией внутри экзона и (2) риды с межэкзонной локализацией.

Опираясь на статистику экзон-интронной организации, можно оценить ожидаемое удельное количество внутриэкзонных и межэкзонных ридов. Поскольку длина гена не оказывает существенного влияния на интенсивность транскрипции (Grishkevich, Yanai, 2014), то при заданных параметрах распределения длин экзонов на долю внутриэкзонных ридов при длине ридов 100 п.н. должно приходиться около 70–75 % от общей длины транскриптома, тогда как остальные 25–30 % должны составлять межэкзонные риды. Вместе с тем при одинаковых условиях секвенирования, геномной локализации ридов и последующей их сборки удельное количество межэкзонных ридов в транскриптомах, полученных из образцов ткани головного мозга, достоверно меньше по сравнению с удельным количеством таких ридов в транскриптомах других тканей у крысы ($F_{(10, 309)} = 268{,}4$, $p < 0{,}00001$ – SRA архивы взяты из публикации Yu с соавт. (2014), данные по удельной доле выявленных межэкзонных ридов взяты из аннотации Entrez Genome Database, 2014 – Rat 105) и мыши (рис. 1) ($F_{(1, 11)} = 24{,}12$, $p < 0{,}00046$; использованы SRA архивы SRS362207–SRS362218, данные по удельной доле выявленных межэкзонных ридов взяты из аннотации Entrez Genome Database, 2014 – Mouse 104). Подобная недопредставленность межэкзонных последовательностей в транскриптах из тканей мозга может свидетельствовать либо о преимущественной экспрессии транскриптов с более протяженными экзонами, что противоречит уже имеющимся фактам, либо об экспрессии значительного количества транскриптов, несущих новые неаннотированные сайты сплайсинга. Таким образом, проблема недоаннотированности геномов может существенно осложнить локализацию ридов транскриптома на референсном гено-

Таблица 1

Размеры экзонов и интронов у позвоночных

Биологический вид	Аннотация	Экзоны (длина п.н.)		Интроны (длина п.н.)		Число экзонов на транскрипт	
		Медианная длина	Средняя длина	Медианная длина	Средняя длина	Медиана	Среднее число
Homo sapiens GRCh38	106	141	345	1675	6957	8	11,4
Chlorocebus sabaeus	100	145	359	1765	7523	8	11,8
Tarsius syrichta	100	131	225	1470	4678	8	10,0
Mus musculus GRCm38.p2	104	146	362	1456	5955	8	10,9
Rattus norvegicus RNor6	105	144	352	1391	4990	7	10,1
Peromyscus maniculatus	100	132	236	1390	4766	8	10,8
Cricetulus griseus	101	131	239	1334	4324	7	9,9
Bos taurus Btau_4.6.1	103	135	268	1323	5331	5	8,6
Bubalus bubalis	100	135	291	1365	5452	8	10,7
Camelus ferus	100	128	194	1221	4005	9	11,0
Vicugna pacos	100	129	198	1235	4375	9	11,0
Physeter catodon	100	131	251	1335	4323	8	11,0
Lipotes vexillifer	100	130	209	1336	5140	9	10,9
Balaenoptera acutorostrata	100	131	259	1373	5625	9	11,9
Eptesicus fuscus	100	128	191	1265	4579	8	10,9
Equus caballus	101	133	275	1353	5015	8	10,3
Felis catus	101	131	256	1369	4931	8	10,4
Panthera tigris altaica	100	128	236	1424	4918	8	10,3
Oryctolagus cuniculus	101	135	278	1574	6391	8	10,5
Orycteropus afer afer	100	129	196	1550	7909	8	10,6
Pteropus alecto	100	131	227	1198	4120	9	11,0
Ursus maritimus	100	132	255	1360	4999	7	9,2
Tupaia chinensis	100	130	229	1665	6003	7	10
Ornithorhynchus anatinus	102	129	223	1351	4073	5	8,1
Leptonychotes weddellii	100	130	211	1230	4897	7	9,1
Erinaceus europaeus	100	127	183	1568	5432	8	10,6
Alligator mississippiensis	100	129	204	1334	4442	7	9,9
Anolis carolinensis	101	136	287	1609	5128	8	11,1
Chelonia mydas	100	127	183	1548	5020	8	10,6
Python bivittatus	100	131	250	1298	3004	8	10,2
Calypte anna	100	126	177	901	2825	8	11,0
Astyanax mexicanus	100	135	278	907	2957	8	10,33
Callorhinchus milii	100	131	242	965	3012	8	11,15
Cynoglossus semilaevis	100	133	223	268	1140	9	11,65
Lepisosteus oculatus	100	126	167	792	2453	8	10,73
Neolamprologus brichardi	100	134	264	377	1805	8	11,37
Poecilia formosa	100	135	258	443	1756	9	11,34

ме и последующую сборку транскриптомов даже для образцов, полученных из модельных организмов.

ПРОБЛЕМА ОДНОЗНАЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ МЕЖЭКЗОННЫХ РИДОВ

Все современные технологии NGS-секвенирования (Illumina, SOLID, PacBio, Ion Proton) дают риды с длиной не менее 50 п.н. (Buermans, den Dunnen, 2014), что позволяет достаточно уверенно определить происхождение большинства внутриэкзонных последовательностей, даже если они приходятся на высокогомологичные участки генома (Treangen, Salzberg, 2011). Вместе с тем для успешной идентификации ридов с межэкзонной локализацией эти риды должны содержать не только стык сайта сплайсинга, но и прилегающие к данному стыку последовательности, протяженности которых должно хватать для однозначной локализации рида в транскриптоме. Однако какой должна быть длина прилегающего к стыку сайта сплайсинга участка для однозначной локализации последовательности?

В литературе до сих пор не существует какой-либо внятной, теоретически обоснованной позиции по вопросу выбора длины прилегающего к стыку сайта сплайсинга участка, а рекомендуемые значения данного параметра были подобраны эмпирически и лежат в диапазоне от 8 до 11 п.н. (van Bakel *et al*., 2010; Rogers *et al*., 2012; Parada *et al*., 2014). Для проверки пригодности предлагаемых в литературе значений для идентификации стыков сайтов сплайсинга в данной работе была проведена локализация непарных 100-нуклеотидных ридов, полученных из 6 отдельных образцов полиА-обогащенной тотальной РНК гиппокампа 3-дневных крысят линии Вистар (виварий ИЦиГ СО РАН) путем определения последовательностей нуклеотидов на секвенаторе Illumina 2000, относительно референсного генома (сборка rn5) и транскриптома (сборка Ensemble 76) (Hubbard *et al*., 2002) *Rattus norvegicus*. Локализацию ридов проводили с использованием программ пакета Tuxedo: Tophat 2.0.9 и Bowtie 2.1.0.0.

В ходе анализа было показано, что изменение минимальной длины прилегающего к стыку сайта сплайсинга участка, используемого для локализации ридов, практически не влияет на число последовательностей, которые могут быть идентифицированы (рис. 2, а). В то же время увеличение длины прилегающего участка приводило к приросту числа ридов с однозначной локализацией, при этом при значениях показателя 14–15 п.н. число однозначно локализованных последовательностей стабилизировалось (рис. 2, б) $F_{(9, 45)} = 427{,}3$, $p < 0{,}00001$).

Вместе с тем само по себе увеличение числа ридов с однозначной локализацией не является достаточным маркером качества геномной локализации таких ридов и полученных на основании такой локализации сборок транскриптома. По этой причине значения представленности транскриптов в исследованных образцах были сопоставлены в сборках транскриптома, полученных при задании различных длин участка, прилегающего к стыку сайта сплайсинга. Сборку проводили с использованием программ пакета Tuxedo: Cufflinks, Cuffmerge, Cuffcompare и CuffDiff версии 2.1.1. Было показано, что существенных достоверных различий по представленности транскриптов в сборках, полученных при длинах прилегающего к стыку сайта сплайсинга участка в 8, 16 и 24 п.н., выявлено не было, что свидетельствует об однозначной локализации большинства ридов при подобных значениях данного параметра. Таким образом,

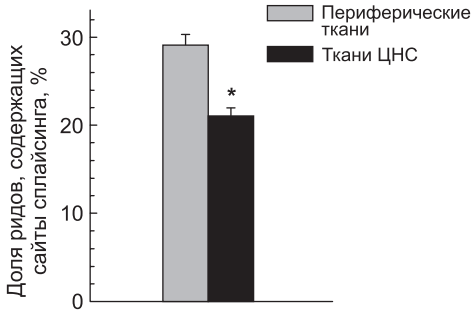


Рис. 1. Доля ридов, содержащих стыки сайта сплайсинга, в общем массиве ридов, полученных из образцов тканей ЦНС и периферических тканей мыши.

***** $p < 0{,}05$ по сравнению с другими периферическими тканями.

Fig. 1. The fraction of reads that contain splice sites in the total number of reads derived from the CNS and non-CNS tissue samples in mice.

***** $p < 0{,}05$ vs other non-CNS tissues.

при картировании непарных ридов транскриптома, полученных из образцов тканей ЦНС, целесообразно использовать значения 14–16 п.н.

ПРОБЛЕМА ВЫБОРА ДЛИНЫ И ТИПА РИДОВ

Поскольку однозначная локализация межэкзонных ридов возможна лишь при наличии прилегающей к стыку сайта сплайсинга последовательности определенной длины, не все межэкзонные риды, содержащие стык сайта сплайсинга, могут быть использованы для идентификации сплайс-вариантов. Вместе с тем вероятность попадания стыка сайта сплайсинга в зоны рида, не позволяющие однозначно локализовать последовательность, уменьшается по мере увеличения протяженности рида (рис. 3). Если сопоставить удельную цену секвенирования при различных длинах ридов на платформах Illumina и SOLID, при которой будет выявлено одинаковое количество стыков (табл. 2), то становится очевидно, что для повышения качества распознавания сплайсированных транскриптов необходимо применять технологии секвенирования, дающие более длинные последовательности, желательно не менее 75 п.н.

Альтернативным вариантом решения проблемы качества распознавания сплайсированных транскриптов является использование технологии парных ридов, которая позволяет верифицировать локализацию первого рида путем проверки местоположения соседней парной последовательности. Парные риды, использованные в данной работе, также были локализованы с помощью программ пакета Tuxedo – Tophat 2.0.9 и Bowtie 2.1.0.0. Процедура верификации подтвердила корректность местоположения для 90 % непарных ридов с ранее идентифицированной позицией. В то же время число ридов с множественной локализацией сократилось на 30 %, что свидетельствует о преимуществе использования данной технологии при секвенировании транскриптомов.

Как и в случае с непарными ридами, изменение минимальной длины прилегающего к стыку сайта сплайсинга участка, используемого для локализации последовательностей, практически не влияло на число пар, которые были идентифицированы (рис. 4, а). В то же время по сравнению с ранее проведенной локализацией непарных ридов число однозначно локализованных пар ожидаемо стабилизировалось при меньших значениях длины прилегающего к

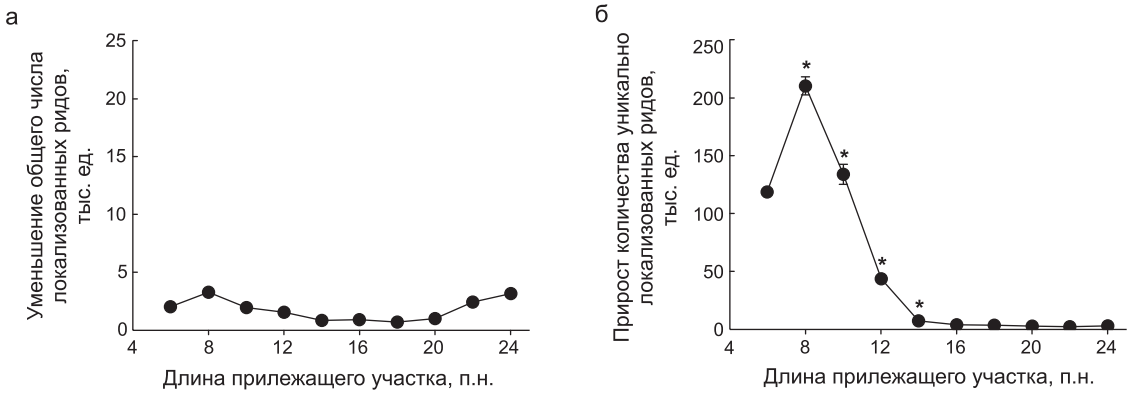


Рис. 2. Зависимость общего числа локализованных непарных ридов (а) и числа уникально локализованных непарных ридов (б) от длины прилежащего к стыку сайта сплайсинга участка, который был использован для локализации стыков сайтов сплайсинга.

* $p < 0{,}05$ по сравнению с приростом количества ридов, локализованных при меньшем значении длины прилежащего участка.

Fig. 2. Variation in the number of mapped single reads with the fixed minimal length of anchors on each side of the junction used to detect the splice site: (a) total number of mapped single reads, (b) uniquely mapped single reads.

* $p < 0{,}05$ vs. the increase in the number of mapped single reads, mapped with shorter anchors on each side of the junction used to detect the splice site.

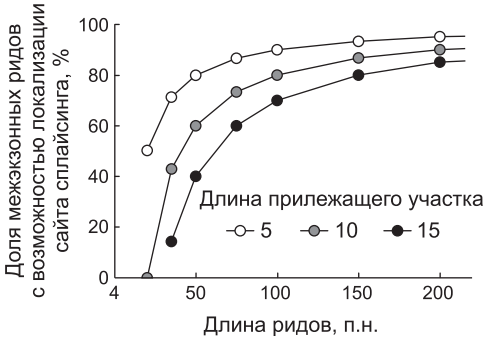


Рис. 3. Максимально возможная доля межэкзонных ридов в общей массе ридов определенной длины (ось X – п.н.), которая может быть локализована при заданной длине прилегающего к стыку сайта сплайсинга участка.

Fig. 3. The maximal portion of interexonic reads in the total number of reads of a fixed size (X axis: base pairs), that can be mapped under the condition of a preset minimal length of anchors on each side of the junction used to detect the splice site.

Таблица 2

Зависимость удельной цены при секвенировании 1 Гб для различных длин непарных ридов

Платформа	Длина рида, п.н.	Стоимость секвенирования 1 Гб, долларов США	Коэффициент пересчета стоимости (при длине прилегающего участка к стыку 15 п.н.)	Стоимость получения одинакового количества межэкзонных ридов, долларов США
SOLID	50	70	1,75	122,5
SOLID	75	55,6	1,17	64,9
Illumina	50	110	1,75	192,5
Illumina	75	90	1,17	105,0
Illumina	100	75	1,00	75,0

стыку сайта сплайсинга участка – 12–13 п.н. (рис. 4, б). Следовательно, при картировании парных ридов транскриптома, полученных из образцов тканей ЦНС, целесообразно использовать значения 12–13 п.н.

ПРОБЛЕМА ВЫБОРА АННОТАЦИИ РЕФЕРЕНСНОГО ГЕНОМА

Отдельно стоит отметить проблему выбора аннотации референсного генома для локализации ридов у организмов, для которых существует более чем одна референсная аннотация. Так, для крысы существует три общедоступных и постоянно обновляемых ресурса с аннотацией генома и транскриптома – Ensemble, RefSeq и Genscan. К сожалению, ни одна из предложенных аннотаций не позволяет идентифицировать все транскрипты, представленные в общем пуле мРНК. Вместе с тем из 10 000–12 000 транскриптов с представленностью не ниже 1 рида на 1 000 п.н., выявляемых при аннотировании ридов с использованием ресурсов Ensemble и Genscan, неидентифицированными остаются лишь порядка 300 и 500 транскриптов соответственно. В то же время применение аннотации RefGen, включающей лишь известные мРНК, неидентифицированными остаются порядка 800 транскриптов. Следовательно, для геномной локализации ридов и последующей сборки транскриптомов тканей ЦНС целесообразно использовать аннотации, включающие не только уже известные мРНК, но и последовательности транскриптов, предсказанные методом *ab initio*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные подтверждают сложность процесса сборки транскриптомов для тканей нервной системы и необходимость дальнейшего совершенствования как методов локализации и сборки, так и существующих аннотаций. Показано, что для транскриптомов из нервной ткани характерна недопредставленность межэкзонных ридов по сравнению с удельной долей таких ридов в транскриптомах из других тканей. Проведенный анализ стоимости–эффективности также однозначно свидетельствует о необходимости использования при изучении

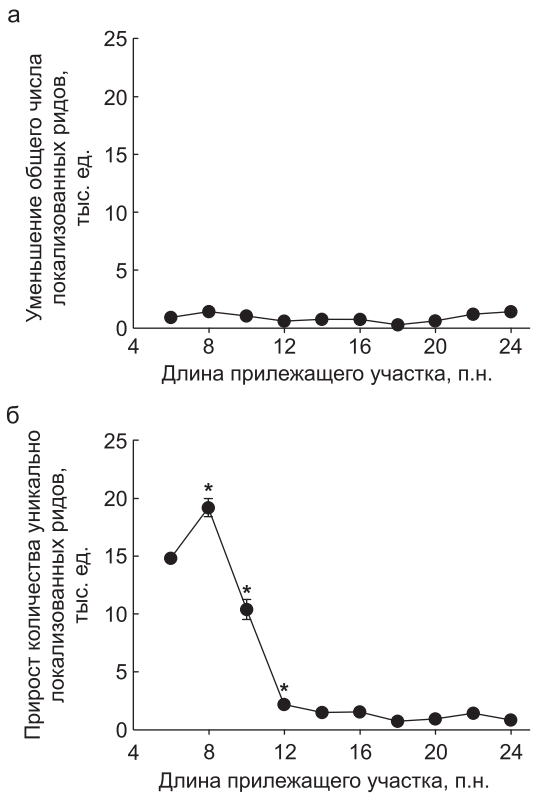


Рис. 4. Зависимость общего числа локализованных парных ридов (а) и числа уникально локализованных парных ридов (б) от длины прилежащего к стыку сайта сплайсинга участка, который был использован для локализации стыков сайтов сплайсинга.

***** $p < 0{,}05$ по сравнению с приростом количества ридов, локализованных при меньшем значении длины прилежащего участка.

Fig. 4. The numbers of mapped reads as functions of the fixed minimal length of anchors on each side of the junction used to detect the splice site: (a) total number of mapped single reads, (b) uniquely mapped single reads.

* $p < 0{,}05$ vs the increase in the number of reads mapped with smaller anchor lengths on each side of the junction used to detect the splice site.

транскриптома мозга технологий секвенирования, дающих длины ридов не менее 75 п.н. Более предпочтительным является использование методов секвенирования, дающих парные риды. Следует отметить, что для геномной локализации ридов и последующей сборки транскриптомов тканей ЦНС целесообразно использовать аннотации, включающие не только уже известные мРНК, но и последовательности транскриптов, предсказанные методом *ab initio*, – например аннотации консорциума Ensemble.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-15-00115.

ЛИТЕРАТУРА

Buermans H.P., den Dunnen J.T. Next generation sequencing technology: Advances and applications // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1842. No. 10. P. 1932–1941.

Entrez Genome Database [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); [Updated 01.09.2014]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/all/

Grishkevich V., Yanai I. Gene length and expression level shape genomic novelties // Genome Res. 2014. V. 24. No. 9. P. 1497–1503.

Hubbard T., Barker D., Birney E., Cameron G., Chen Y., Clark L., Cox T., Cuff J., Curwen V., Down T. *et al*. The Ensembl genome database project // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. No. 1. P. 38–41.

Irimia M., Denuc A., Burguera D., Somorjai I., Martín-Durán J.M., Genikhovich G., Jimenez-Delgado S., Technau U., Roy S.W., Marfany G., Garcia-Fernàndez J. Stepwise assembly of the Nova-regulated alternative splicing network in the vertebrate brain // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. No. 13. P. 5319–5324.

Lin L., Shen S., Jiang P., Sato S., Davidson B.L., Xing Y. Evolution of alternative splicing in primate brain transcriptomes // Hum. Mol. Genet. 2010. V. 19. No. 15. P. 2958–2973.

Martin J.A., Wang Z. Next-generation transcriptome assembly // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. No. 10. P. 671–682.

Mills J.D., Janitz M. Alternative splicing of mRNA in the molecular pathology of neurodegenerative diseases // Neurobiol. Aging. 2012. V. 33. No. 5. P. 1012.e11-24.

Oltean S., Bates D.O. Hallmarks of alternative splicing in cancer // Oncogene. 2014 [Epub ahead of print] doi:10.1038/onc.2013.533.

Parada G.E., Munita R., Cerda C.A., Gysling K. A comprehen-sive survey of non-canonical splice sites in the human transcriptome // Nucl. Acids Res. 2014. [Epub ahead of print] doi:10.1093/nar/gku744.

Rogers M.F., Thomas J., Reddy A.S., Ben-Hur A. SpliceGrapher: detecting patterns of alternative splicing from RNA-Seq data in the context of gene models and EST data // Genome Biol. 2012. V. 13. No. 1. P. R4.

Salzberg S.L., Phillippy A.M., Zimin A., Puiu D., Magoc T., Koren S., Treangen T.J., Schatz M.C., Delcher A.L., Roberts M., Marçais G., Pop M., Yorke J.A. GAGE: A critical evaluation of genome assemblies and assembly algorithms // Genome Res. 2012. V. 22. No. 3. P. 557–567.

Tollervey J.R., Wang Z., Hortobágyi T., Witten J.T., Zarnack K., Kayikci M., Clark T.A., Schweitzer A.C., Rot G., Curk T., Zupan B., Rogelj B., Shaw C.E., Ule J. Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain // Genome Res. 2011. V. 21. No. 10. P. 1572–1582.

Treangen T.J., Salzberg S.L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 13. No. 1. P. 36–46.

Ule J., Stefani G., Mele A., Ruggiu M., Wang X., Taneri B., Gaasterland T., Blencowe B.J., Darnell R.B. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation // Nature. 2006. V. 444. No. 7119. P. 580–586.

van Bakel H., Nislow C., Blencowe B.J., Hughes T.R. Most «dark matter» transcripts are associated with known genes. // PLoS Biol. 2010. V. 8. No. 5. P. e1000371.

Yu Y., Fuscoe J.C., Zhao C., Guo C., Jia M., Qing T., Bannon D.I., Lancashire L., Bao W., Du T., Luo H., Su Z., Jones W.D., Moland C.L., Branham W.S., Qian F., Ning B., Li Y., Hong H., Guo L., Mei N., Shi T., Wang K.Y., Wolfinger R.D., Nikolsky Y., Walker S.J., Duerksen-Hughes P., Mason C.E., Tong W., Thierry-Mieg J., Thierry-Mieg D., Shi L., Wang C. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 3230.

METHODOLOGICAL ASPECTS OF READ MAPPING AND ASSEMBLY OF TRANSCRIPTOMES DERIVED FROM BRAIN TISSUE SAMPLES OF *RATTUS NORVEGICUS*

P.N. Menshanov[1, 2], N.N. Dygalo[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: MenshanovPN@icg.sbras.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Identification of all transcripts expressed in a biological sample and quantification of transcript levels are two major objectives in transcriptome research. They are particularly challenging in case of CNS transcriptomes, since alternative splicing is of wide occurrence in the brain. This paper recognizes and analyzes several problems associated with read mapping and subsequent assembly of transcriptomes derived from samples of CNS tissue, in particular: unambiguous read identification, read size, and incomplete reference annotations available for both model and non-model species. It is shown that the relative abundance of interexonic reads in transcriptomes derived from CNS tissues is lower than in those derived from non-CNS tissues provided that identical procedures of read sequencing, genomic mapping, and transciptome assembly are applied. The underrepresentation of interexonic reads in the transcriptomes derived from CNS vs. non-CNS tissues appears to be indicative of the existence of a large number of transcripts with novel sites of splicing not annotated yet. Cost-benefit analysis affirms the superiority of sequencing technologies that generate reads with lengths ≥ 75 bp. For genomic mapping of reads and subsequent transcriptome assembly, it is advisable to use genomic annotations that include both known and ab initio predicted transcripts, such as Ensemble transcriptome annotations.

Key words: next generation sequencing, transcriptome, read mapping, transcriptome assembly, genome annotation.

УДК 004.94:004.942

SIBERNETIC: ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС НА БАЗЕ АЛГОРИТМА PCI SPH, ОРИЕНТИРОВАННЫЙ НА ЗАДАЧИ МОДЕЛИРОВАНИЯ В ОБЛАСТИ БИОМЕХАНИКИ ЖИВЫХ СИСТЕМ

© 2014 г. **А.Ю. Пальянов, С.С. Хайрулин**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систем информатики им. А.П. Ершова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: palyanov@iis.nsk.su

Поступила в редакцию 16 сентября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Описан программный комплекс Sibernetic, разрабатываемый нами в рамках работы над международным проектом OpenWorm, нацеленным на создание биологически обоснованной компьютерной модели нематоды *Caenorhabditis elegans*, включая ее нервную систему. Для моделирования тела *C. elegans* и фрагмента внешней среды, в которой оно могло бы перемещаться под действием мышечных сокращений, понадобился алгоритм, способный рассчитывать динамику жидкости, эластичного тела, водонепроницаемых эластичных пленок и мышечных волокон. За основу был взят алгоритм PCI SPH – модификация известного алгоритма «гидродинамики сглаженных частиц», позволяющая моделировать несжимаемую жидкость, который мы реализовали в параллельной форме (OpenCL) и существенно дополнили функционалом, ориентированным на задачи моделирования в области биомеханики живых систем. В данной работе описываются возможности Sibernetic, проиллюстрированные на примере разработанной нами модели тела нематоды *C. elegans*, снабженного мышечной системой, чрезвычайно актуальной ввиду неизменно высокого уровня интереса к исследованию и моделированию этого организма среди нейробиологов и специалистов по биомеханике беспозвоночных. С помощью предложенного подхода эта задача впервые была решена со столь высокой степенью реалистичности и детализации.

Ключевые слова: математические модели в науках о живом, программное обеспечение для научных исследований, PCI SPH, метод частиц, гидродинамика, биомеханика беспозвоночных, *C. elegans*, высокопроизводительные параллельные вычисления, OpenCL.

ВВЕДЕНИЕ

Симулятор Sibernetic (sibernetic.org) был создан в рамках работы над международным проектом OpenWorm, целью которого является создание биологически обоснованной компьютерной модели (виртуального организма) нематоды *Caenorhabditis elegans*, включающей тело организма, сенсорную, нервную и мышечную системы, а также фрагмент внешней среды, в которой действуют необходимые физические законы. Центральный объект интереса OpenWorm – изучение фундаментальных принципов, лежащих в основе работы нервной системы *C. elegans*, однако ограничиться моделированием одной лишь нервной системы в рамках данной задачи не представляется возможным. Необходимы и сенсорная система, чтобы обеспечить поток входящих сигналов, и мышечная система, дающая телу способность передвигаться, подчиняясь командам нервной системы; и фрагмент внешней среды, в котором будет происходить перемещение нематоды, приводя, в свою очередь, к изменению сенсорных сигналов (Palyanov *et al.*, 2012; Cohen, Sanders, 2014).

Интерес к моделированию *C. elegans* понятен – это самый изученный на сегодня многоклеточный организм, состоящий из 959 клеток, с нервной системой, насчитывающей всего 302 нейрона, образующих около 7 000 межней-

ронных соединений. Несмотря на кажущуюся простоту, эта нематода воспринимает мир посредством хемо-, термо-, механо- и фоточувствительных рецепторов, имеет довольно широкий спектр поведенческих паттернов, обладает зачатками памяти и способна к формированию условных рефлексов (Rankin, 2004). Многие исследователи разделяют мнение, что именно *C. elegans* может оказаться ключом к пониманию фундаментальных принципов работы нервной системы. Сенсорная система *C. elegans* способна воспринимать механические воздействия различного характера, концентрации широкого спектра химических веществ, температуру окружающей среды и степень освещенности в видимом диапазоне. Все эти факторы будет необходимо учесть при создании виртуального организма и изначально принимать во внимание при разработке его модели.

На первом этапе мы взялись за решение задачи, связанной с моделированием тела червя, оснащенного мышечной системой, а также внешней среды. В настоящее время создан работающий прототип, имеющий высокий уровень детализации и точности моделирования физических характеристик тела нематоды и его окружения, включающий в себя следующие компоненты: 1) водонепроницаемая оболочка тела, заполненная жидкостью под давлением (гидростатический скелет); 2) полный набор из 95 мышечных клеток тела, каждая из которых расположена на своем месте и представлена десятками мышечных волокон; 3) реалистичная модель фрагмента внешней среды, позволяющая сочетать твердые, эластичные и жидкие объекты и учитывающая все необходимые силы: вязкость, трение, поверхностное натяжение, силу тяжести и др.

В статье расматриваются возможности симулятора Sibernetic, достигнутые результаты и дальнейшие перспективы.

МЕТОДЫ

Моделирование динамики жидкости

В качестве базового метода моделирования динамики жидкости был выбран метод SPH (гидродинамика сглаженных частиц) (Gingold *et al*., 1977), который базируется на описании динамики сплошных сред, введенном Лагранжем. Жидкость представляется набором дискретных элементов – частиц, которые характеризуются координатами в трехмерном пространстве, скоростью и массой. Эти частицы имеют пространственное расстояние (известное как «длина сглаживания», обычно обозначаемая как h), на котором их свойства «сглаживаются» функцией ядра. Любая скалярная физическая величина в точке $\mathbf{r}$ рассчитывается как взвешенная сумма вкладов от всех частиц, находящихся в пределах длины сглаживания:

$$A(\mathbf{r}) = \sum_j m_j \frac{A_j}{\rho_j} W(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j, h),$$

где A_j – значение величины A для частицы j, ρ_j – плотность, связанная с частицей j, h – радиус сглаживания и W – сглаживающая функция ядра.

В табл. 1 представлены широко используемые, хорошо зарекомендовавшие себя ядра сглаживания, которые мы используем для расчета ряда физических величин.

Таблица 1

Ядра сглаживания, используемые в Sibernetic

Величина	Ядро сглаживания
Плотность	$W_{poly6}(x_{ij}, h) = \frac{315}{64\pi h^9} \begin{cases} (h^2 - x_{ij}^2)^2, & 0 \le x_{ij} \le h \\ 0, & \text{иначе} \end{cases}$
Давление	$W_{spiky}(x_{ij}, h) = \frac{15}{\pi h^6} \begin{cases} (h - x_{ij})^3, & 0 \le x_{ij} \le h \\ 0, & \text{иначе} \end{cases}$
Вязкость	$W_{viscous}(x_{ij}, h) = \frac{15}{2\pi h^3} \begin{cases} -\frac{x_{ij}^3}{2h^3} + \frac{x_{ij}^2}{h^2} + \frac{h}{2x_{ij}^2} - 1, & 0 \le x_{ij} \le h \\ 0, & \text{иначе} \end{cases}$

Движение несжимаемой жидкости описывается системой дифференциальных уравнений Навье-Стокса:

$$\rho(\frac{\partial}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla)\mathbf{v} = -\nabla p + \mu\nabla \cdot (\nabla \mathbf{v}) + \mathbf{f}$$

(сохранение момента),

$$\frac{\partial}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{v}) = 0$$ (сохранение массы),

где μ – коэффициент вязкости; $\mathbf{f}$ – сумма всех внешних сил, действующих на частицу; $\mathbf{v}$ – скорость частицы, p – давление. Использование частиц существенно упрощает эти уравнения. Число частиц постоянно, и масса каждой из них неизменна, поэтому сохранение массы гарантировано и второе уравнение становится ненужным. Поскольку частицы движутся вместе с жидкостью, полная производная поля скоростей обращается в частную производную скорости по времени, т. е. для системы частиц конвективный член $\mathbf{v} \cdot \nabla \boldsymbol{v}$ равен нулю (Müller *et al*., 2003). Для i-й частицы уравнение движения можно записать следующим образом:

$$m_i \frac{\partial \boldsymbol{v}_i}{\partial t} = \mathbf{F}_i^{pressure} + \mathbf{F}_i^{external} + \mathbf{F}_i^{viscosity}.$$

Сила давления и сила вязкости рассчитываются по следующим формулам (Müller *et al*., 2003):

$$\mathbf{F}_i^{pressure} = -\frac{m_i}{\rho_i} \frac{p_i + p_j}{2} \nabla W(\mathbf{r}_{ij}, h),$$

$$\mathbf{F}_i^{viscosity} = \frac{m_i}{\rho_i} \sum_j \frac{m_j}{\rho_j} \frac{\mu_i + \mu_j}{2} (\mathbf{v}_j - \mathbf{v}_i) \nabla^2 W(\mathbf{r}_{ij}, h).$$

Базовый алгоритм SPH не предполагает несжимаемости моделируемой жидкости, однако для решения этой проблемы было предложено несколько модификаций стандартного метода SPH: WCSPH (Becker *et al*., 2007), ISPH (Shao *et al*., 2003) и PCI SPH (Solenthaler *et al*., 2009a). При выборе оптимального варианта мы ориентировались как на минимизацию вычислительных затрат в единицу времени и возможность работы симуляции при относительно большом временном шаге, так и на приемлемый уровень точности получаемого решения. Всем этим требованиям отвечает метод PCI SPH (predictor-corrector incompressible smoothing particle hydrodynamics), при котором несжимаемость жидкости обеспечивается путем использования схемы «предиктор–корректор» для определения давления в точках пространства, занимаемых частицами. Для этого информация о флуктуациях плотности активно распространяется через жидкость, и значения давления обновляются до тех пор, пока значения плотности во всей системе не станут удовлетворительными. При таком подходе исчезает необходимость решать уравнение Пуассона для давления, требующее значительных вычислительных затрат, и в то же время остается возможность корректной работы симуляции с большим временным шагом, более чем на порядок бóльшим, чем при использовании метода WCSPH.

Моделирование эластичного тела

Эластичный материал представляется в виде сложной упорядоченной системы частиц, связанных между собой эластичными неразрывными соединениями (пружинами) (Terzopoulos *et al*., 1988). Каждая частица в такой системе обладает свойствами жидкости (на нее действуют все внутренние силы, характерные для частиц жидкости, такие как вязкость, давление и проч.), но при этом на них дополнительно действует сила упругости (в соответствии с законом Гука):

$$\mathbf{F}_i^{elastic} = -k \sum_j \frac{\mathbf{r}_{ij}}{\|\mathbf{r}_{ij}\|} (\|\mathbf{r}_{ij}\| - \|\mathbf{r}_{ij}^0\|),$$

где k – коэффициент упругости, $\|\mathbf{r}_{ij}\|$ – расстояние между частицами i и j, $\|\mathbf{r}_{ij}^0\|$ – равновесная длина пружины, j – индекс j-й эластичной частицы, с которой i имеет эластичное соединение. Коэффициент упругости может быть задан независимо для каждой пары частиц i и j, соединенных пружиной.

Также на основе обычного эластичного тела создан дополнительный тип «материи», способный сокращаться под действием приходящего внешнего сигнала в соответствии с его уровнем. В этом случае на пару частиц, i и j, будет дополнительно воздействовать соответствующая внешняя сила, сближающая эти частицы, направленная вдоль соединяющей их прямой.

Неподвижные объекты и границы

Механизм обработки взаимодействия движущихся объектов с неподвижными границами базируется на методе, описанном в работе M. Ihmsen с соавт. (2010). Граница представляется в виде набора особых частиц, расположенных

в узлах решетки с заданным шагом; для каждой такой частицы используются те же характеристики, что и для обычных частиц, но в отличие от них граничные частицы неподвижны в течение всей симуляции и для каждой из них задан вектор нормали. При попадании i-й частицы в поле действия граничных частиц (это происходит в случае, если $||\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_b|| \le r_0$, где $r_0 = h/2$) на нее начинают влиять силы отталкивания, пропорциональные расстояниям от частицы до границы; координаты и скорость частицы в этом случае корректируются следующим образом:

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t) = \varepsilon\,[\mathbf{v}_i^*(t + \Delta t)]_t - \delta[\mathbf{v}_i(t)]_n$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i^*(t + \Delta t) + ||\mathbf{r}_i^*(t + \Delta t) - \mathbf{r}_b|| \cdot \mathbf{n}_b,$$

где $[\mathbf{v}_i(t)]_n = (\mathbf{v}_i(t) \cdot \mathbf{n}_b) \cdot \mathbf{n}_b$ определяет компоненту скорости, нормальную к границе, а $[\mathbf{v}_i^*(t + \Delta t)]_t = \mathbf{v}_i^*(t + \Delta t) - [\mathbf{v}_i^*(t + \Delta t)]_n$ – тангенциальную. ε и δ, лежащие в интервале от 0 до 1, контролируют трение и эластичность столкновения с границей. Величины со звездочкой «*» – исходное значение (до учета столкновения). Индекс «b» – граничная частица (boundary), t – тангенциальная и n – нормальная компоненты вектора.

Возможно, что при контакте с поверхностью частица i оказывается одновременно взаимодействующей с несколькими граничными частицами. В этом случае их вектора нормалей образуют усредненный вектор нормали, в который входят с различным «весом» в зависимости от расстояния между i-частицей и данной граничной частицей (Ihmsen *et al*., 2010):

$$\mathbf{n}_i^c = \sum_b w_{ib}^c \mathbf{n}_b,$$

$$\text{где } w_{ib}^c = \max\Big(0, \frac{\mathbf{r}_0 - ||\mathbf{r}_{ib}^*||}{\mathbf{r}_0}\Big),$$

$||\mathbf{r}_{ib}^*|| = ||\mathbf{r}_i^*(t + \Delta t) - \mathbf{r}_b||$. Затем координаты и скорость частицы i корректируются следующим образом:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i^*(t + \Delta t) + \frac{1}{\sum_b w_{ib}^c} \sum_b w_{ib}^c ||(\mathbf{r}_0 - \mathbf{r}_{ib}^*)|| \cdot \frac{\mathbf{n}_i^c}{||\mathbf{n}_i^c||}, \quad (1)$$

$$\mathbf{v}_i(t + \Delta t) = \varepsilon\,[\mathbf{v}_i^*(t + \Delta t)]_t. \quad (2)$$

Данный подход позволяет корректно обрабатывать контакт с границей, а кроме того, обеспечивает возможность создавать границы различных форм.

Моделирование непроницаемой мембраны

Одной из оригинальных возможностей симулятора Sibernetic является поддержка моделирования непроницаемых эластичных материалов, в том числе однослойных пленок. Многие биологические объекты обладают водонепроницаемыми оболочками, однако при их моделировании посредством обычного эластичного тела наблюдается значительная утечка жидкости сквозь них. Это особенно актуально для оболочки тела *C. elegans*, форма которого поддерживается благодаря «гидростатическому скелету» – внутренней среде, находящейся под избыточным давлением 2–30 кПа (Harris *et al*., 1957).

В основе моделирования непроницаемых мембран лежит описанный выше метод, предложенный в работе M. Ihmsen с соавт. (2010) для расчетов взаимодействия движущихся объектов с границей, представленной неподвижными частицами. Мы реализовали его в Sibernetic в исходном виде для неподвижных границ, а также разработали его модификацию для взаимодействия с границами подвижных эластичных объектов. Для ее реализации был введен дополнительный класс физических примитивов, поддерживаемых симулятором, названный «мембранами». Каждая элементарная мембрана представляет собой объект, составленный из трех соседних частиц эластичного тела (находящихся на его поверхности), образующих треугольник. Тройка индексов частиц, образующих мембрану, указывается явным образом. Окрестность треугольника, образованного тройкой частиц, отталкивает любую частицу жидкости, подошедшую достаточно близко. На каждом шаге симуляции при контакте частицы жидкости с окрестностью мембраны для частицы вычисляется сила отталкивания, которая корректирует ее координаты и скорость.

На каждой итерации при контакте частицы жидкости i с частицей эластичного тела j (т. е. при $||\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|| \le r_0$) определяется число элементарных мембран, в состав которых она входит (т. е. имеющих один из трех своих индексов, j). Если это число больше нуля, то для каждой из этих элементарных мембран вычисляется сначала проекция частицы i на мембрану, затем – вектор нормали к плоскости

мембраны и наконец результирующий вектор нормали $\mathbf{n}_i^m$, усредненный по всем мембранам. Далее скорость и позиция частицы i корректируются в соответствии с (1) и (2) с использованием $\mathbf{n}_i^m$ вместо $\mathbf{n}_i^c$.

Параллельная реализация на OpenCL

Один из недостатков симуляции на основе системы частиц по сравнению с сеточными методами состоит в том, что необходимо использовать большое количество частиц для симуляций с эквивалентной разрешающей способностью. Одним из возможных решений этой проблемы является использование параллельного алгоритма вместо последовательного, поскольку даже современные настольные ПК, как правило, располагают многоядерными процессорами или мощными видеокартами, которые было бы разумно использовать «в полную силу».

Моделируемая система состоит из N «независимых» частиц; для каждой отдельной частицы последовательно вычисляются все действующие на нее силы, на основе которых затем вычисляются новые координаты и скорость; все эти действия для каждой частицы происходят независимо и теоретически могут быть выполнены параллельно, так как входными данными для них служат координаты и скорости, полученные на предыдущей итерации. Отсюда следует, что алгоритм хорошо распараллеливается по данным.

Для решения этой задачи мы решили остановиться на платформе OpenCL, предназначенной для создания приложений, связанных с параллельными вычислениями на гетерогенных вычислительных системах (Munshi *et al*., 2011). Основными преимуществами OpenCL является открытость стандарта, поддержка большинства основных производителей как комплектующих, так и программного обеспечения, например Intel, AMD, NVIDIA (более подробный список – на сайте http://www.khronos.org/opencl/), а также возможность исполнять программный код на различных устройствах: GPU, CPU, FPGA.

В табл. 2 представлены результаты сравнения производительности различных реализаций SPH и PCI SPH. Мы использовали данные о Bullet-Fluid и параллельной реализации SPH. Bullet-Fluid реализован на OpenCL и имеет ограничение на максимальное число частиц в симуляции (65536). Исходный код реализации SPH (Goswami *et al*., 2010) является закрытым, и для сравнения мы использовали табличные данные, представленные в этой статье. Для сравнения производительности с Bullet-Fluid одинаковые конфигурации тестировались на нем и на Sibernetic, а затем вычислялось среднее время, затрачиваемое симуляцией на одну итерацию.

Таблица 2

Результаты сравнения производительности различных реализаций SPH и PCI SPH

Название	Алгоритмы	Устройство, платформа	Среднее время на 1 шаг, мс	Количество частиц
Bullet-Fluid	SPH	GPU NVIDIA Tesla C1060, OpenCL	70	65 536
Goswami *et al*., 2010	SPH	GPU NVIDIA GeForce GTX280, CUDA	89	75 200
Solenthaler *et al*., 2009b	PCISPH	Intel Core2 Quad, 2.66 ГГц (1 поток)	722	100 000
Solenthaler *et al*., 2009b	PCISPH	Intel Core2 Quad, 2.66 ГГц (OpenMP)	218	100 000
Sibernetic	PCI SPH, эластичное тело, мембраны	GPU NVIDIA Tesla C1060, OpenCL	125	65 536
Sibernetic	PCI SPH, эластичное тело, мембраны	CPU Intel Core i7-2700K (3.5 ГГц), OpenCL	139	65 536
Sibernetic	PCI SPH, эластичное тело, мембраны	GPU AMD Radeon R9 290X, OpenCL	82,8	65 536

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результатом данной работы, во-первых, является сам программный код Sibernetic. Завершив этап разработки программного кода, мы приступили к проверке соответствия результатов, получаемых в симуляции, с точными аналитическими решениями или результатами экспериментов. Ниже приведены несколько проведенных тестов:

1. Тест на корректность поведения частицы в гравитационном поле. Одна частица или эластичное тело свободно падает в пространстве, находясь под действием силы гравитации; на каждой итерации детектируется смещение, которое проделала отдельная частица или центр масс эластичного тела от начала движения до текущей позиции, и сравнивается с точным решением. При этом тесте, в частности, проверяется точность численного интегратора системы уравнений движения.

2. Тест на возникновение вязкого трения. Симулируется стационарное течение жидкости внутри трубки. На некотором ее участке детектируется распределение скоростей в зависимости от удаленности от стенок трубки. Предполагается, что поток жидкости стабилизирован вдоль координаты y, так что $\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial y} \equiv 0$ (труба стоит вертикально, имеет гладкие стенки, на жидкость из внешних сил действует только гравитация). Поэтому общие уравнения Навье-Стокса упрощаются до одного двумерного эллиптического уравнения (Лойцянский, 1978; Ландау, Лифшиц, 2001):

$$\frac{\partial^2 \mathbf{v}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \mathbf{v}}{\partial y^2} = \frac{1}{\mu} \frac{\mathrm{d}p}{\mathrm{d}y},$$

где $\mathbf{v}$ – скорость потока, μ – вязкость жидкости, p – давление. Предполагается, что на границе с трубой скорость жидкости равна 0. Точное решение показывает, что профиль скоростей описывается параболической кривой.

3. Тест на затухание колебаний пружины. Одиночная эластичная частица или тело, состоящее из множества частиц, подвешено на пружине к неподвижной верхней стенке. Из внешних сил на объект действует только сила гравитации, которая тянет объект вниз. При смещении в пружине, в соответствии с законом Гука, возникает сила, действующая в противоположном направлении, в результате возникают осцилляции. При неправильной работе интегратора амплитуда колебаний пружины будет со временем неограниченно возрастать, тогда как при правильной – колебания должны либо затухнуть через некоторое время при наличии трения в системе, либо осциллировать бесконечно при его отсутствии. Мы реализовали два различных симплектических метода интегрирования, известных своей стабильностью и хорошей точностью для своего класса: полунеявный метод Эйлера первого порядка и Leap-Frog второго порядка.

Проведенные тесты показали, что результаты расчетов Sibernetic хорошо согласуются с известными результатами экспериментов или аналитическими данными для рассмотренных конфигураций. Результаты представлены на графиках (рис. 1, 2).

Завершив разработку и тестирование Sibernetic, мы смогли приступить к одной из главных целей проекта – проектированию детальной реалистичной модели тела *C. elegans*, представляющей из себя водонепроницаемую эластичную оболочку (воспроизводящую геометрические размеры реальной нематоды), наполненную жидкостью под давлением для поддержания формы. К оболочке крепятся продольные тяжи мышечных клеток, расположенных в четырех боковых квадрантах тела. Результат представлен на рис. 3, а также доступен в форме видеозаписи (http://www.youtube.com/watch?v=r2OBznK6HkI).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Большинство существующих реализаций алгоритмов SPH и PCISPH либо являются независимыми коммерческими продуктами, либо входят в состав платных программных пакетов для создания анимированных сцен, моделирования гидродинамики жидкости и т. д. Sibernetic (sibernetic.org) на сегодняшний день является единственной реализацией алгоритма PCI SPH с открытым исходным кодом. Ряд дополнительных оригинальных функций и типов «материи», ориентированных на задачи моделирования в области биофизики, в частности биомеханики беспозвоночных (эффективность которых продемонстрирована на примере моделирования тела

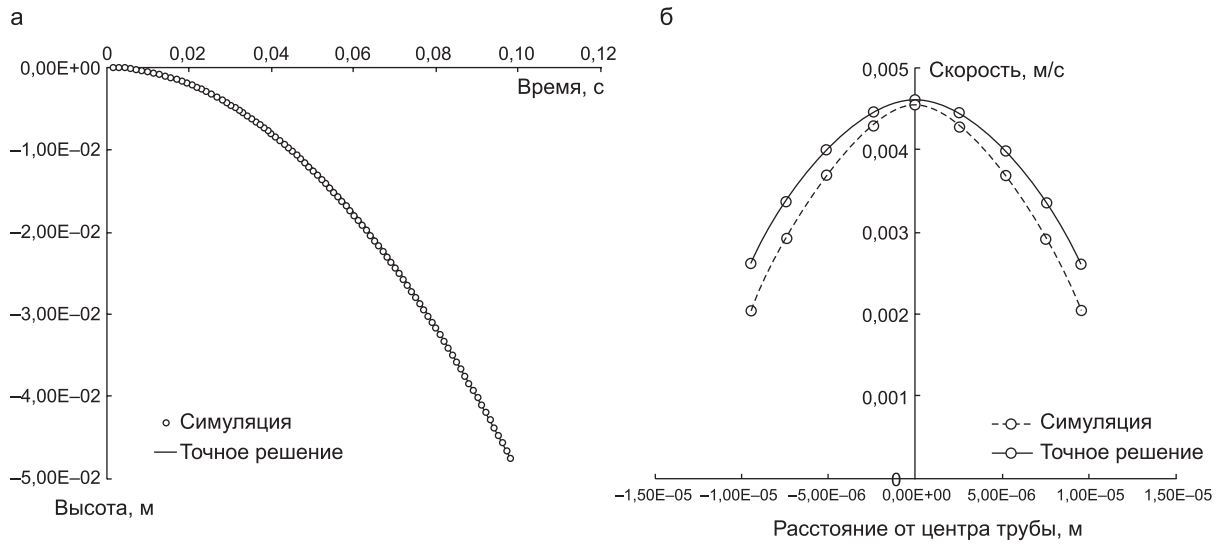


Рис. 1. Результаты тестов.

а – зависимость координаты свободно падающей точечной массы от времени; б – профиль распределения скоростей в трубе (в зависимости от расстояния от центра трубы).

Fig. 1. Test results. Diagram (a) shows the dependence of coordinate of free falling mass on time. Diagram (b) shows the profile of velocities distribution inside the pipe (depending on the distance from the center of the pipe).

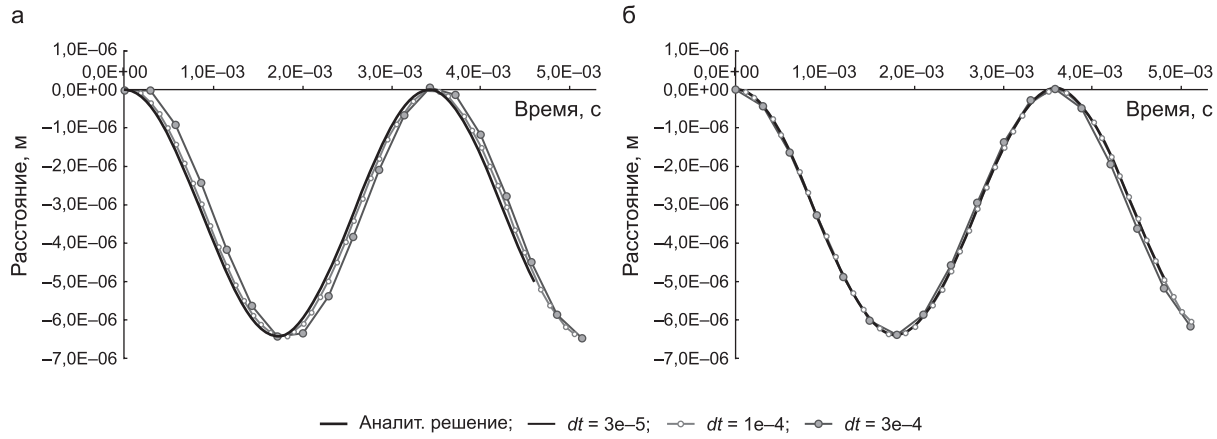


Рис. 2. Сравнение результатов численного моделирования с точным решением задач колебания массы на пружине.

а – результаты, полученные для полунеявного метода Эйлера 1-го порядка точности; б – результаты для метода Leap-frog 2-го порядка точности. Черная линия – точное решение, остальные кривые – результаты, полученные при моделировании в Sibernetic при разных значениях временного шага *dt*.

Fig. 2. Comparison of numerical modeling results with precise solution for an oscillating mass connected to a spring.

a – results for the case of semi-implicit Euler's method (1-st order of accuracy); b – results for the case of using Leap-frog method (2-nd order of accuracy). Black line corresponds to exact solution, all the rest show the results of simulation using Sibernetic at various values of integration time step *dt*.

C. elegans), значительно увеличивает область возможных практических применений данной разработки. Кроме того, параллельные вычисления на основе OpenCL обеспечивают значительную производительность, а кросс-платформенность (Windows/Linux/MacOS), достигнутая благодаря использованию при разработке только стандартных библиотек языка C++, позволяет выполнять код на большинстве современных устройств и операционных систем.

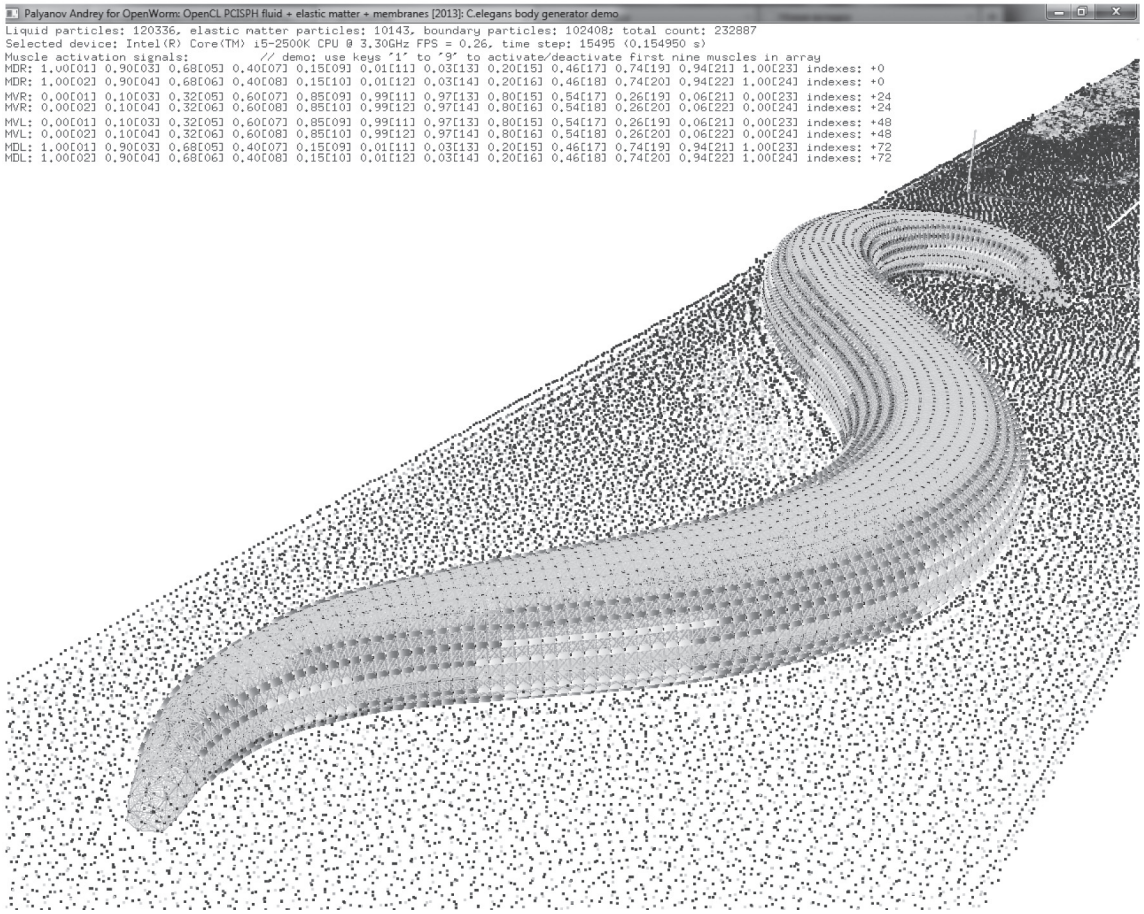


Рис. 3. «Скриншот», иллюстрирующий общий вид симулятора Sibenetic при расчете и визуализации движения модели тела *C. elegans* по поверхности, покрытой тонким слоем жидкости. Команды для мышечных сокращений левой и правой сторон задаются двумя синусоидальными сигналами, находящимися в противофазе.

Fig. 3. General view of a Sibernetic «screenshot» for case of calculation and visualization of *C. elegans* body prototype locomotion over a flat surface covered with a thin layer of water. Muscular contractions are driven by simple sinusoidal patterns opposite in phase between the left and right sides of the body.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта СО РАН № 136 «Исследование информационных и молекулярно-генетических механизмов функционирования сетей нейронов на основе экспериментально-компьютерных подходов» и гранта РФФИ № 14-07-31039 «Разработка методологии и алгоритмической базы для задач моделирования в области биофизики живых систем».

ЛИТЕРАТУРА

Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Гидродинамика. 5-е изд. Физматлит, 2001. 731 с.

Landau L.D., Lifshitz E.M. Fluid Mechanics, 5-th edition. M.: Fizmatlit, 2001. 731 p. (In Russian).

Лойцянский Л.Г. Механика жидкости и газа. М.: Наука, 1978. 736 с.

Loitsyanskiy L.G. Mechanics of Liquids and Gases. M.: Nauka, 1978. 736 p. (In Russian).

Becker M., Teschner M. Weakly compressible SPH for free surface flows // Proc. ACM SIGGRAPH/Eurographics SCA. 2007. P. 63–72.

Cohen N., Sanders T. Nematode locomotion: dissecting the neuronal-environmental loop // Curr. Opin. Neurobiol. 2014. V. 25. P. 99–106.

Gingold R.A., Monaghan J.J. Smoothed particle hydrodynamics – theory and application to non-spherical stars // Mon. Not. R. Astr. Soc. 1977. P. 375–389.

Goswami P., Schlegel P., Solenthaler B., Pajarola R. Interactive SPH Simulation and Rendering on the GPU // Proc. of the 2010 ACM SIGGRAPH/Eurographics Symp. on Computer Animation, 2010. P. 55–64.

Harris J.E., Crofton H.D. Structure and Function in the Nematodes: Internal Pressure and Cuticular Structure in Ascaris // J. Exp. Biol. 1957. V. 34. P. 116–130.

Hut P., Makino J. The Art of Computational Science (2007). Section 4.1 (electronic book). http://www.artcompsci.org/kali/vol/n_body_problem/title.html.

Ihmsen M., Akinci N., Gissler M., Teschner M. Boundary Handling and Adaptive Time-stepping for PCISPH // Proc. VRIPHYS. Copenhagen, Denmark, 2010. P. 79–88.

Munshi A., Gaster B., Mattson T., Fung T. OpenCL. Programming Guide. 2011.

Müller M., Charypar D., Gross M. Particle-based fluid simulation for interactive applications // Proc. of the ACM Siggraph/Eurographics Symposium on Computer Animation. 2003. P. 154–159.

Palyanov A., Khayrulin S., Larson S.D., Dibert A. Towards a virtual *C. elegans*: a framework for simulation and visualization of the neuromuscular system in a 3D physical environment // In Silico Biol. 2012. V. 11. P. 137–147.

Rankin C.H. Invertebrate learning: what can't a worm learn? // Curr. Biol. 2000. V. 14. No. 15. R617–R618.

Shao S., Lo E. Incompressible SPH method for simulating Newtonian and non-Newtonian flows with free surface // Adv. Water Resour. 2003. P. 787–800.

Solenthaler B., Pajarola R. Predictive-corrective incompressible SPH // SIGGRAPH'09: ACM SIGGRAPH 2009 papers. N.Y., 2009a. P. 1–6.

Solenthaler B., Pajarola R. Performance Comparison of Parallel PCISPH and WCSPH // Technical Report, Department of Informatics, University of Zurich, December 17, 2009b.

Terzopoulos D., Fleischer K. Modeling inelastic deformation: viscolelasticity, plasticity, fracture // Proc. of the 15th Ann. Conf. on Computer Graphics and Interactive Techniques. ACM Press, 1988. P. 269–278.

(http://www.artcompsci.org/msa/web/vol_1/v1_web/node34.html)

SIBERNETIC: A SOFTWARE COMPLEX BASED ON THE PCI SPH ALGORITHM AND ORIENTED TO PROBLEMS OF SIMULATIONS IN BIOMECHANICS

A.Yu. Palyanov, S.S. Khayrulin

A.P. Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: palyanov@iis.nsk.su

Summary

Highly detailed realistic simulation of a biological neural network should include the organism's body for efficient work: a sensory system to provide a realistic stream of input data and a muscular system for body movement. The construction of a robotic system coupled with software simulation of a nervous system that would operate in the real world is quite challenging. Moreover, only a scientific group possessing such a robot can perform this research, while it is of worldwide interest. We see a promising alternative to this approach in the design of a computational model of a body. The international project called OpenWorm is aimed at building the first comprehensive computational model of *Caenorhabditis elegans*, a tiny 1-mm long roundworm, possessing a nervous system of 302 neurons, highly interesting to neurobiologists. As part of this project, we developed a special-purpose 3D physical engine, called Sibernetic, oriented to realistic computational simulation of invertebrate biomechanics, particularly *C. elegans*. In doing it, we developed and implemented a number of original features, which supplemented the PCI SPH algorithm, simulating incompressible liquid dynamics. The modified algorithm allowed computation of elastic matter, including its subtype able to contract in response to an incoming signal for simulation of muscle tissue, and liquid-impermeable 'membranes' preventing liquid particles from passing through their surface. The algorithm can be used for modeling a variety of objects from a single living cell membrane to a full body surface of invertebrates, such as mollusks or worms. A set of test scenarios illustrating Sibernetic capabilities was developed to check the correct work of the implemented mechanisms. Sibernetic is the first open source, cross-platform (Windows/Linux/MacOS) parallel OpenCL/C++ PCISPH based high-performance software of the kind.

Key words: computer simulation, software for scientific research, PCI SPH, particle method, computational fluid dynamics, invertebrate biomechanics, *C. elegans*, high-performance parallel computing.

УДК 591.181:004.942

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СИГНАЛОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ *C. ELEGANS*

© 2014 г. **А.Ю. Пальянов[1], А.С. Ратушняк[2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт систем информатики им. А.П. Ершова
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: palyanov@iis.nsk.su;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: ratush@kti.nsc.ru

Поступила в редакцию 16 сентября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Среди организмов, наиболее широко используемых для изучения фундаментальных механизмов функционирования нервной системы, нематода *Caenorhabditis elegans* занимает особое место благодаря исключительно малому количеству нейронов. Уже на протяжении 25 лет она остается единственным организмом, для которого определен *коннектóм* – описание всех нейронов и межнейронных связей. Однако этих данных оказалось в значительной степени недостаточно, для того чтобы разобраться в механизмах работы даже столь малой нервной системы. Последующие годы были посвящены как экспериментальным исследованиям, существенно дополнившим изначально полученные знания, так и созданию компьютерных моделей, охватывающих отдельные фрагменты нервной и мышечной систем. С 2005 г. предпринимаются попытки создания виртуальной копии *C. elegans* – сложной компьютерной модели, объединяющей нервную, сенсорную и мышечную системы, тело и фрагмент окружающей среды. Несмотря на определенный прогресс в этом направлении, результаты работы не столько приблизили исследователей к решению задачи, сколько пролили свет на ее действительную сложность. В данной работе мы проанализируем ряд проблем, возникающих перед исследователем, задавшимся целью создать биологически обоснованную модель нервной системы *C. elegans*, на примере простейшего нервного контура, связанного с реакцией на механосенсорный сигнал.

Ключевые слова: *C. elegans*, нейробиология, коннектом, моделирование, электротоническое проведение сигнала.

ВВЕДЕНИЕ

Задачи анализа работы биологических информационных систем обусловлены как возникшими в последние годы новыми возможностями их реинжиниринга, так и потребностями в понимании причин возникновения нейрональных расстройств, необходимостью поиска средств и методов их коррекции. При этом основной вектор исследований ориентирован на теоретико-экспериментальный анализ молекулярных механизмов работы нервных клеток и нейронных систем достаточно продвинутых в эволюционном смысле организмов. Однако методология анализа многоуровневых молекулярных информационных систем, какими являются нейроны таких организмов, пока недостаточно развита. Известно, что в процессе эволюции изменялись и усовершенствовались межклеточные коммуникации и структурная организация нервной системы. Однако основной вектор развития ориентирован на усложнение и усовершенствование, прежде всего, внутриклеточных молекулярных сигнальных процессов (Barbosa-Morais *et al*., 2012). При этом молекулярная организация многих базовых функций, возникшая на ранних этапах эволюции, в той или иной мере сохранилась и

у организмов, находящихся на более высоком уровне эволюционного развития. Поэтому структурно-функциональный анализ работы более простых нейронов и нейронных систем позволяет надеяться на выявление базовых функций, лежащих в основе как простых нейрональных реакций, так и более эволюционно усовершенствованных.

C. elegans среди простых организмов принадлежит особая роль. С точки зрения нейробиологии это, пожалуй, самый изученный на сегодня многоклеточный организм, состоящий всего из 959 клеток, 302 из которых – нейроны. Пионерская работа J.G. White с соавт. (1986) по определению строения *C. elegans* на клеточном уровне потребовала 12 лет упорного труда и положила начало целому ряду направлений в исследовании этого организма. Основной ее акцент был сделан на исследовании архитектуры нервной системы, включая морфологию нейронов, их отростков, а также связей нейронов между собой и с мышечными клетками организма. По оценкам J.G. White с соавт. (1986), коннектом *C. elegans* включает около 5 000 химических синапсов и около 2 000 *эфапсов* (электрических щелевых контактов, «gap junctions»), которые, в отличие от первых, способны проводить сигнал в обоих направлениях. Дальнейшие исследования привели к тому, что диаграмма связности нейронной сети *C. elegans*, по оценкам L.R. Varshney с соавт. (2011), завершена приблизительно на 90 %.

Таким образом, в настоящее время *C. elegans* – пожалуй, единственный многоклеточный организм, для которого существует потенциальная возможность создания его виртуального двойника – на пределе возможностей современной науки и технологий. За десятилетия исследований уже вложены настолько значительные усилия, что никакой другой многоклеточный организм не сможет с ним сравниться в этом отношении в обозримом будущем. Несмотря на кажущуюся простоту, эта нематода имеет довольно широкий спектр поведенческих паттернов, обладает зачатками памяти и способна к формированию условных рефлексов (Rankin, 2004). Многие исследователи разделяют мнение, что именно *C. elegans* может оказаться ключом к пониманию фундаментальных принципов работы нервной системы. Сенсорная система *C. elegans* способна воспринимать механические воздействия различного характера, концентрации широкого спектра химических веществ, температуру окружающей среды и степень освещенности в видимом диапазоне. Все эти факторы будет необходимо учесть при создании виртуального организма и изначально принимать во внимание при разработке его модели.

Предположим, однако, что мы уже сейчас обладаем достоверной информацией о расположении и типах всех межнейронных контактов в нервной системе *C. elegans*. Какая еще информация понадобится для того, чтобы достоверно описывать и рассчитывать распространение сигналов по нейронной сети? В данной работе мы попробуем вкратце познакомиться с тем, какие проблемы могут встретиться на пути исследователя, задавшегося целью создать биологически обоснованную компьютерную модель нервной системы *C. elegans*, построенную по образу и подобию живого организма. Основное внимание будет уделено коннектому, или диаграмме связности нейронной сети, нейрофизиологическим характеристикам отдельного нейрона, а также наблюдаемым характеристикам, описывающим поведение *C. elegans*, связанным с его нейронной активностью.

ДИАГРАММА СВЯЗНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ

Нервная система взрослой особи *C. elegans* мужского пола содержит 383 нейрона, а гермафродита – 302, других полов нет (White *et al.*, 1986). Последняя, вероятно, из-за меньшего числа нейронов является более изученной, и именно о ней будет идти речь в данной работе. Информация о коннектоме на сегодняшний день представлена различными источниками данных. Основная информация по данному вопросу представлена в табл. 1.

Интерактивная веб-страница, отображающая информацию о нейронах и связях между ними, основанная на объединенных данных, полученных до 1999 г., доступна онлайн (http://wormweb.org/details.html) и включает в себя 5 396 химических синапсов, 1 783 эфапса и 1 290 нейромышечных соединений. С другой стороны, согласно данным проекта WormWiring.org (более детальная реконструкция, вклю-

Таблица 1

Число синаптических контактов в нервной системе *C. elegans* по данным разных источников

Число химических синапсов	Число эфапсов («gap junctions»)	Число нейромышечных соединений	Литературный источник
~ 5 000	~ 2 000	?	White *et al*., 1986
5 396	1 883	1 290	http://wormweb.org/details.html
3 419	2 190	?	http://wormwiring.org
6 393	890	1 410	http://wormatlas.org

чающая морфологию нейритов и координаты контактов между ними), к настоящему времени обнаружено 3 419 химических синапсов и 2 190 эфапсов. Этот проект находится в процессе реализации и к настоящему времени данные реконструкции базируются на двух сериях электронных микрофотографий (ТЭМ) поперечных срезов *C. elegans* в интервалах примерно от 0,09 до 0,61 («N2U», 5 041 изображение) и от 0,85 до 1,0 («JSE», 2 143 изображения), где 0 – головной, а 1 – хвостовой конец (полный список серий доступен на веб-ресурсе http://www.wormimage.org/wormList.php). Наиболее современный взгляд на достигнутые результаты реконструкции нервной системы *C. elegans* изложен в работе L.R. Varshney с соавт. (2011). Согласно мнению авторов, хотя нейронная сеть *C. elegans* относительно мала и практически идентична для каждого экземпляра данного вида, опубликованные ранее диаграммы связности между нейронами не являются ни точными, ни полными, ни самосогласованными. Им удалось на основе тех же и новых серий микрофотографий создать полную, самосогласованную диаграмму связности нейронной сети, включающую 6 393 химических синапса, 890 эфапсов и 1 410 нейромышечных соединений. Относительно предыдущей версии было добавлено более 3 000 синаптических контактов, включая химические синапсы, эфапсы и нейромышечные соединения. Поскольку сумма для WormWiring.org составляет 8 469, а по Varshney с соавт. (2011) – 8 693, то, по-видимому, из 3 000 новых синаптических контактов значительная часть заменила прежние ошибочные данные. Varshney с соавт. (2011) считают, что несмотря на значительный прогресс, диаграмма связности нейронной сети *C. elegans* завершена приблизительно на 90 % из-за недостающих данных и технических трудностей. Описанные результаты реконструкции доступны на веб-ресурсе WormAtlas.org.

ОБ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ НЕЙРОНОВ *C. ELEGANS*

В нервной системе *C. elegans* имеется обычный набор ионных каналов. Геном содержит все известные семейства K^+ каналов, потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы, и другие катионные каналы, Cl^- каналы, а также каналы, зависимые от циклических нуклеотидов (cyclic-nucleotide-gated) (Wei *et al*., 1996; Bargmann, 1998). Однако есть одно фундаментальное отличие – отсутствие потенциал-зависимых Na^+ каналов, лежащих в основе передачи, кодирования и обработки сигналов посредством потенциалов действия (ПД) в большинстве нервных систем. Это подтверждается как отсутствием Na^+ каналов в геноме *C. elegans*, так и электрофизиологическими экспериментами, показывающими отсутствие быстрых Na^+ токов. Таким образом, функции, выполняемые в нервных системах других организмов посредством потенциала действия, у *C. elegans*, по-видимому, осуществляют градуальная деполяризация и электротоническое проведение. Предположительно, ионные каналы *C. elegans* адаптированы для этого необычного режима функционирования (Nickell *et al*., 2002).

Ключевая роль в электротоническом проведении принадлежит ионам Ca^{2+}, участвующим в генерации тока через возбудимую мембрану нейрона (исключительно важная деталь в свете того, что нейроны *C. elegans* не способны генерировать ПД) (Goodman *et al*., 1998). Кальций

выполняет также ряд других специализированных функций: высвобождение синаптических везикул, содержащих нейромедиатор, модуляцию активности ионных каналов. Важную роль играют также калиевые каналы, модулирующие потенциал покоя нейрона и являющиеся, таким образом, определяющими факторами для возбуждения нейрона и работы синапсов. Исследование 43 различных нейронов из латерального, вентрального и дорсального ганглиев (содержащих сенсорные нейроны, интернейроны и мотонейроны) методом фиксации потенциала (voltage clamp) выявило сходную для всех них картину. Ток ионов K^+ наружу клетки и встречный ток ионов Ca^{2+} внутрь клетки, активируемые при деполяризации, обеспечивают околонулевой полный ток через мембрану в интервале от –30 до –90 мВ, ее высокое сопротивление и высокую чувствительность к сенсорным или синаптическим сигналам. За пределами этого интервала гиперполяризация активирует ток внутрь клетки, а деполяризация – наружу. Таким образом, все вышеупомянутые нейроны *C. elegans* оказались практически изопотенциальными в состоянии покоя (Goodman *et al*., 1998). Также имеется свидетельство, что для хемосенсорного нейрона AWA потенциал, соответствующий нулевому току через мембрану (zero-current potential), равен –40 мВ, а область высокого сопротивления лежит в интервале от –40 до –60 мВ; помимо этого, для множества (21) различных неидентифицированных нейронов головного нервного ганглия 17 нейронов имели потенциал нулевого тока в интервале от –16 до –22 мВ, а остальные 4 показали значения –65, –31, –37 и –44 мВ (Nickell *et al*., 2002). Потенциал нулевого тока иногда используют как оценочную величину для потенциала покоя, однако в данном случае, как мы видим, околонулевой ток регистрируется в достаточно широком интервале напряжений.

Для большинства изученных нервных систем в зависимости от типа нейрона мембранный потенциал покоя имеет величину от –30 до –100 мВ. Относительно значения потенциала покоя нейронов *C. elegans* имеются весьма скудные данные ввиду чрезвычайной сложности такого измерения, обусловленной по меньшей мере двумя существенными факторами. Во-первых, тело взрослой нематоды имеет длину всего 1,0 … 1,2 мм и покрыто достаточно прочной эластичной оболочкой, форму которой поддерживает избыточное внутреннее давление (гидростатический скелет), так что добраться сквозь нее до нейронов само по себе является нелегкой задачей. Во-вторых, нейроны чрезвычайно малы: всего 2–3 μм (Schafer, 2006); для сравнения, размеры тела нейрона человека варьируют от 5 до 120 μм. Несмотря на описанные сложности, недавно (Piggott *et al*., 2011) методом фиксации тока (current clamp) удалось провести измерения для сенсорного нейрона ASH и интернейронов AVA, AIB и RIM. Показано, что потенциал покоя RIM имеет значение около –20 мВ, а AIB – около –50 мВ, что достаточно близко к рассмотренным выше значениям потенциала нулевого тока. Для сравнения, потенциал покоя нейронов значительно более крупной нематоды *Ascaris suum* также имеет достаточно высокое значение: около –40 мВ.

Электротоническое проведение сигналов имеет существенные отличия по сравнению с потенциалами действия. Амплитуда и длительность ПД фиксированы благодаря лежащему в его основе механизму активного распространения, позволяющему преодолевать значительные расстояния (до 1–1,5 м) при скорости до 100–150 м/с и частоте импульсов до 500 Гц (в нервной системе человека). Электротоническое проведение, происходящее без участия импульсных процессов, основано на пассивном распространении сигнала. Напряжение, приложенное к нервному волокну, не распространяется на значительное расстояние из-за низкой проводимости аксоплазмы и утечек тока через мембрану нейрона. В результате напряжение в зависимости от расстояния между отводящим электродом и точкой инъекции тока спадает экспоненциально и характеризуется постоянной длиной волокна λ (расстояние, на котором потенциал снижается в *e* раз, т. е. до 37 % от начального значения). Постоянная длины волокна зависит от удельного сопротивления мембраны R_m (Ом·см^2), удельного сопротивления аксоплазмы R_i (Ом·см) и диаметра нервного волокна d: $\lambda = \sqrt{\frac{d \cdot R_m}{4R_i}}$, (Rall, 1989).

Диаметр нервного волокна у нейронов *C. elegans* варьирует в пределах от 0,1 до 0,5 μм, а длина некоторых нейритов превышает 1 мм.

Измерение R_m и R_i для *C. elegans* ввиду малого размера нейронов представляется чрезвычайно сложным, однако имеются данные, полученные на 4 мотонейронах нематоды *Ascaris suum*: R_m лежало в пределах 61–251 кОм·см^2 (среднее значение 150 кОм·см^2), а R_i – в пределах от 79 до 314 Ом·см (среднее значение 180 Ом·см) (Roehrig, 1998). Для сравнения, при измерениях на животных других видов данные варьировали в диапазоне от 1 до 50 кОм·см^2 (R_m) и от 30 до 250 Ом·см (R_i). Это согласуется с наблюдением, что нейроны *C. elegans* имеют заметно более высокое сопротивление мембраны нейрона, чем у других организмов, благодаря малому числу ионных каналов на единицу площади. Расчеты на основе приведенных величин дают значение λ (с учетом различных d в пределах от 0,2 до 0,3 μм) в пределах от 0,3 до 1,5 мм (среднее – 0,73 мм), что действительно подтверждает возможность электротонического распространения сигнала на всю длину нейритов *C. elegans*.

Нейроны с электротоническим проведением сигнала также встречаются в сетчатке и других отделах ЦНС позвоночных, в глазу усоногих раков, в нервной системе насекомых и в стоматогастральном ганглии ракообразных. Обычно общая длина этих клеток не превышает нескольких миллиметров, и, как правило, для них характерно высокое удельное сопротивление мембраны, благодаря чему достигается эффективное электротоническое распространение сигналов с малым затуханием. По мере распространения подобные сигналы угасают, однако их амплитуда остается все же достаточно высокой, для того чтобы, дойдя до окончаний нейронов, они могли инициировать высвобождение медиатора. (Эккерт и др., 1991, Гл. 6).

Одним из важнейших параметров, описывающих электротоническое проведение сигнала, является скорость распространения электрического возбуждения по мембране нейрита. Согласно расчетам Johnston и Wu (1995), она выражается формулой:

$$\theta = \sqrt{\frac{2d}{R_m \cdot R_i \cdot C_m^2}},$$

где C_m – удельная емкость единицы площади мембраны нейрона, составляющая около 1 мкФ/см^2 для всех нервных и мышечных волокон (клеточные мембраны образованы липидным бислоем толщиной всего 5 нм, благодаря чему могут накапливать достаточно большой заряд). Таким образом, получаем, что для нейронов *C. elegans* предполагаемые значения лежат в интервале от 7,1 до 35,3 мм/с, т. е. даже при минимальной скорости сигнал пройдет от головного до хвостового конца за 0,14 с. Стоит отметить, что поскольку и λ, и θ зависят одновременно от R_m и R_i, причем различным образом, то максимум и минимум λ вовсе не совпадают с максимумом или минимумом θ. Так, для минимального λ = 0,3 мм θ = 14,4 мм/с, для максимального λ = 1,5 мм θ = 17,4 мм/с; минимальному θ = 7,1 мм/с соответствует λ = 0,63 и максимальному θ = 1,54 мм/с соответствует λ = 0,76 мм. При этом в результате затухания сигнала на участке нейрита длиной 1 мм его амплитуда составит, предположительно, от 3 % (для λ = 0,3 мм) до 51 % (для λ = 1,5 мм) относительно исходного значения. Видно, что степень затухания может изменяться достаточно существенно в зависимости от λ, поэтому весьма желательно знать как можно более точное ее значение.

Теперь, обладая базовыми представлениями о распространении сигналов в нервной системе *C. elegans*, попробуем применить эти знания на практике для анализа простейшего фрагмента ее нейронной сети.

НЕЙРОННЫЙ КОНТУР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ВОСПРИЯТИЕ СЛАБЫХ ПРИКОСНОВЕНИЙ. СВЯЗЬ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ И НАБЛЮДАЕМЫХ ПАРАМЕТРОВ ДВИЖЕНИЯ

В нервной системе *C. elegans* имеются 6 механосенсорных нейронов, обладающих длинными отростками. Нейриты первых 3 (ALML, ALMR и AVM) иннервируют переднюю половину тела, а оставшихся 3 (PLML, PLMR и PVM) – заднюю (Chalfie *et al*., 1985). Слабые прикосновения (от 0,1 μН) способны вызывать быстро активирующиеся механорецепторные токи; бóльшие силы вызывают бóльшие токи, выходящие на насыщение в области 1–2 μН (O'Hagan *et al*., 2005). Начиная от 100 μН активируются другие нейроны, реагирующие на сильное давление. Обычно в экспериментах для того чтобы вызвать реакцию на слабое

прикосновение, используют одиночный волосок ресницы. При этом нематода почти сразу после касания меняет направление своего движения с прямого на обратное (http://www.youtube.com/watch?v=olrkWpCqVCE). Такое поведение сформировалось в ходе эволюции и предназначено для того, чтобы избегать попадания в кольца-ловушки хищных грибов *Drechslerella doedycoides*, встречающихся в естественной среде обитания *C. elegans*. Показано, что задержка между моментом касания внутренней стороны кольца и срабатыванием ловушки составляет около 5 с (Maguire *et al*., 2011). Описанная реакция *C. elegans* на прикосновение представляет собой пример того, как нейронная сеть преобразует входной сенсорный сигнал в координированный двигательный ответ. Попробуем разобраться, как устроен и как работает данный нейронный контур.

Упомянутая выше высокая сложность электрофизиологических измерений активности нейронов *C. elegans* и неизбежное при этом повреждение оболочки тела, исключающее возможность наблюдения поведения интактной нематоды одновременно с регистрацией ее нейронной активности, побудили исследователей искать альтернативные способы для решения этой задачи. Весьма успешным оказался подход, основанный на оптогенетике. Была создана трансгенная линия *C. elegans*, у которой в вышеупомянутых 6 механосенсорных нейронах экспрессировался флюоресцентный белок YC2.12, содержащий одновременно CFP и YFP компоненты (Suzuki *et al*., 2003). В присутствии ионов Ca^{2+} отношение между интенсивностями флюоресценции на длинах волн, соответствующих CFP (Cyan Fluorescent Protein) и YFP (Yellow Fluorescent Protein), отражает изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Miyawaki *et al*., 1997). Значительный интерес представляет эксперимент по измерению времени распространения сигнала по дендриту нейрона ALM (точнее билатерально симметричная пара нейронов – левый ALML или правый ALMR; какой именно был задействован в эксперименте – не уточняется). Тело нейрона ALM расположено в средней части нематоды (относительно направления голова–хвост), а длинный дендрит идет в направлении к голове, иннервируя переднюю половину тела. В эксперименте Suzuki с соавт. (2003) было показано, что легкое касание передней половины тела червя (продолжительность стимула – 90 мс) на расстоянии около 350 μм до тела нейрона ALM привело к достижению статистически значимого уровня активации самого нейрона (на основании уровня Ca^{2+}) через 45 мс после момента начала стимуляции. В течение первых 22 мс не было никакого свидетельства ответа нейрона на возбуждение. По мнению авторов, неясно, какая доля 20–30 мс задержки соответствует времени распространения сигнала по дендриту до тела нейрона. Однако эти данные все-таки позволят нам оценить минимальную скорость электротонического распространения сигнала, равную 350 μм/22 мс, т. е. около 16 мм/с, что вполне согласуется с нашей оценкой, полученной выше, – интервалом от 7,1 до 35,3 мм/с.

Какими путями сигнал, воспринятый нейронами ALM(L/R), будет распространяться дальше? ALM(L/R) и AVM имеют протяженные дендриты и формируют эфапсы друг с другом, а также значительное число соединений со многими другими нейронами; позиции этих межнейронных контактов расположены в области головного нервного ганглия (White *et al*., 1986). Обычно в статьях, посвященных изучению работы нервного контура *C. elegans*, обрабатывающего слабые прикосновения, упоминаются химические синапсы от ALM(L/R) и AVM к паре командных интернейронов AVD(L/R), которые, в свою очередь, образуют синапсы с сериями мотонейронов DA (DA1…DA9) и VA(VA1…VA12), обеспечивающих движение нематоды назад (Chalfie *et al*., 1985; Rankin, 2002). Также имеются данные о том, что в результате стимуляции механосенсорных нейронов ALML, ALMR или AVM активируются нейроны AVA(L/R) (основываясь на уровне Ca^{2+}), правда, судя по приведенным графикам, примерно на одну секунду позже, чем произошла смена направления движения нематоды (Shipley *et al*., 2014, Fig. 2, B), хотя благодаря химическим синапсам от AVD к AVA это должно происходить значительно быстрее (мы теперь имеем представление о характерных скоростях распространения сигналов по нейритам *C. elegans*). Из того же графика скорости распространения волны мышечных

сокращений (Shipley *et al*., 2014. Fig. 2, B) следует, что смена направления движения на противоположное происходит примерно через 1,5 с после начала оптической стимуляции механосенсорного нейрона ALM генетически модифицированного *C. elegans*. Однако покадровый анализ видеозаписей движения *C. elegans* в моменты реверса позволяет выявить, что смена направления движения нематоды происходит практически мгновенно после прикосновения к ней. Попробуем на его основе оценить, с какими масштабами времен и скоростей мы имеем дело при реверсе направления движения.

Как мы видим, поступательное движение при ползании по влажной поверхности (слою агара в чашке Петри) реализуется посредством волнообразных сокращений тела, форма которого при этом напоминает фрагмент синусоиды, у которой в процессе движения плавно меняется фаза: при движении вперед в одном направлении, а при движении назад – в обратном. Разбив видеофрагмент на отдельные кадры с помощью программы VirtualDub (частота их следования составляет 30 кадров в секунду), а также точно определив кадр, соответствующий моменту касания нематоды, мы решили рассмотреть серию из 30 кадров до этого момента и 30 кадров после. Благодаря хорошему отличию между фоном и телом нематоды удалось написать достаточно несложную программу, которая выделила на каждом кадре контур тела нематоды и вычислила положение его центра масс.

Как видно из рисунка, равномерное движение вперед (со скоростью ≈ 0,19 мм/с) после касания тела *C. elegans* сменяется переходным периодом, продолжающимся в течение 7 кадров, т. е. ≈ 0,23 с, после чего наблюдается равномерное движение в направлении назад (со скоростью ≈ 0,30 мм/с). Наши расчеты, как оказалось, находятся в согласии с экспериментальными данными о том, что скорость продвижения взрослой нематоды по поверхности агара при движении вперед варьирует от 0,1 до 0,3 мм/с (Lüersen *et al*., 2014). Интересно, что скорость движения назад оказалась примерно в 1,3 раза больше, чем исходная скорость движения вперед, что может свидетельствовать о различных нейронных механизмах, управляющих движением вперед и назад. Согласно данным Faumont с соавт. (2011), обнаружены мотонейроны, активные во время движения как вперед, так и назад; по мнению авторов, необходимо продолжать исследования в области регистрации нейронной активности в свободно движущихся нематодах.

Имеются данные, что скорость распространения волны мышечных сокращений при движении вперед по поверхности агара составляет 0,39 мм/с (Shen *et al*., 2012). Анализ видеозаписи позволил рассчитать эту величину, которая в данном случае составила 0,26 мм/с. Эта скорость более чем в 10 раз меньше, чем рассмотренная нами ранее скорость распространения сигналов по нейритам *C. elegans* (от 7,1 до 35,3 мм/с). Распространение сигнала по кратчайшему пути от ALML/ALMR/AVM к AVDL/AVDR, затем к мотонейронам DA/VA (расположенным последовательно от головы к хвосту вдоль всего тела) и, наконец, к мышечным клеткам, даже с учетом задержки на синаптических контактах (которая обычно составляет около 2 мс для химических синапсов и 0,2 мс для эфапсов), таким образом, не может объяснить наблюдаемую скорость распространения мышечных сокращений. Имеется гипотеза о том, что отростки мотонейронов серий DB и VB, расположенных вдоль брюшной нервной цепочки, имеющие достаточно длинные концевые отделы, не образующие синаптических контактов, могут служить проприоцепторами, реагирующими на растяжение тела червя в местах изгибов. Влияние этих дополнительных сигналов могло бы, например, подавлять распространение основного сигнала далее вдоль тела нематоды до тех пор, пока предыдущий участок не произведет достаточный изгиб или, наоборот, не станет достаточно прямым. Однако у каждого нейрона, имеющего такой не образующий синапсы отросток, одно и то же направление – от головы к хвосту. Даже если эта гипотеза сможет объяснить распространение волны мышечных сокращений при движении вперед, то с движением назад возникают сложности. Таким образом, на сегодняшний день механизм, лежащий в основе генерации волн мышечных сокращений, несмотря на многочисленные попытки разобраться в принципах его действия (Cohen, Sanders, 2014), до сих пор остается необъясненным. С учетом того что все

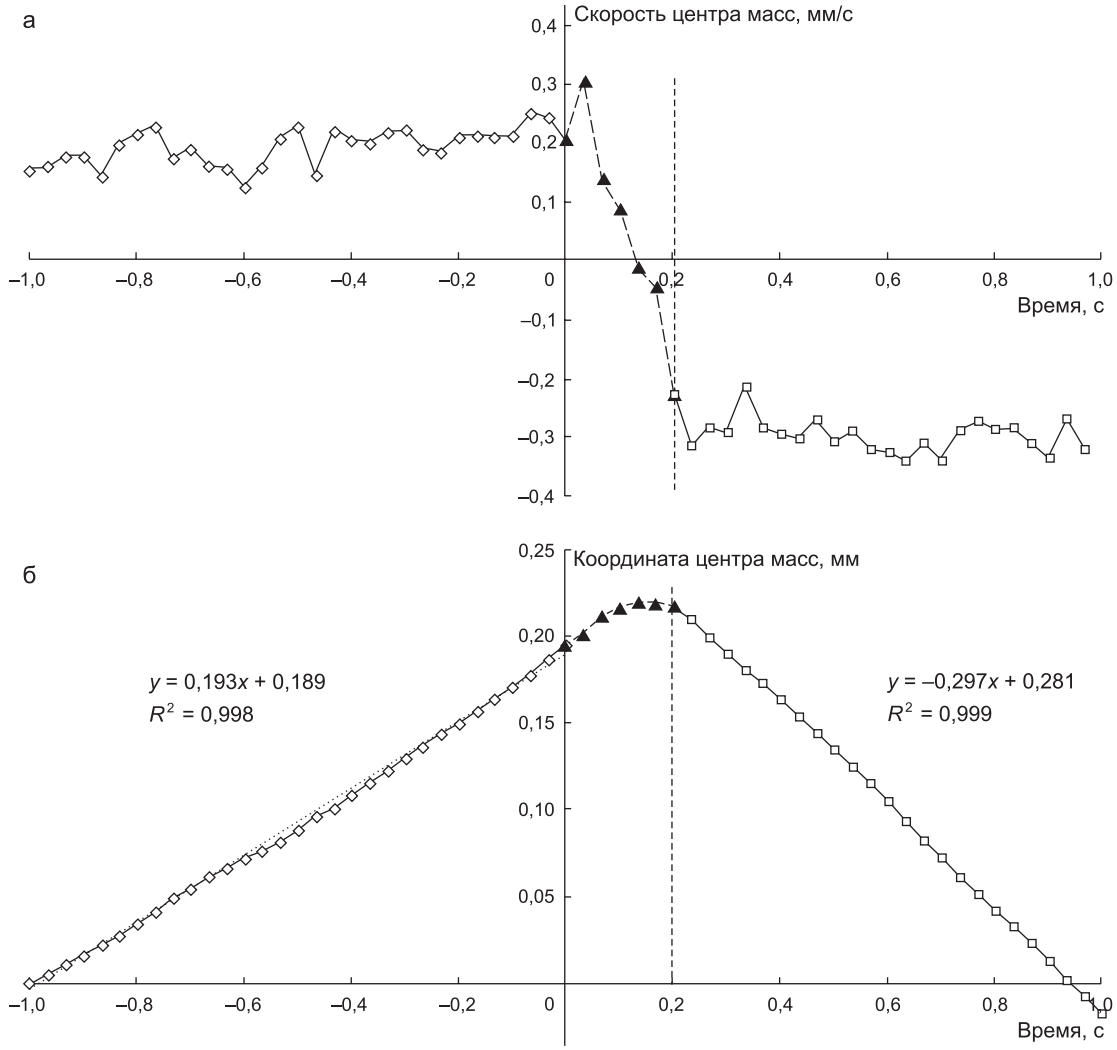


Рис. Изменение скорости движения (а) и координаты центра масс (б) *C. elegans* в направлении движения в результате легкого прикосновения к передней части тела.
Ноль по оси времени – момент касания.

Fig. Dependence of *C. elegans* velocity (a) and center of mass coordinate (b) along the direction of movement as a result of gentle touch to the anterior part of its body.
Zero of the time axis corresponds to the moment of touch.

наши вычисления, касающиеся видеозаписи реакции *C. elegans* на слабое прикосновение, оказались в согласии с имеющимися экспериментальными фактами, есть все основания считать верным и интервал продолжительностью ≈ 0,23 с, который требуется нематоде, чтобы переключиться с режима движения вперед на движение назад. Однако в упомянутом нами ранее оптогенетическом эксперименте (Shipley *et al*., 2014) для этого потребовалось около 1,5 с, что может свидетельствовать либо об ошибках в их методике измерения, либо о существенной задержке сигнала от механосенсорных нейронов при их возбуждении не путем касания *C. elegans*, а посредством оптогенетической активации.

В данной работе, посвященной созданию предпосылок для моделирования нервной системы *C. elegans*, мы попытались собрать информацию, имеющую отношение к поставленной цели, попутно производя необходимые расчеты, предпринимая попытки анализа и соотнесения между собой разрозненных фактов, полученных разными авторами, и т. д.

Таблица 2

Основные электрофизиологические и морфологические характеристики нейронов *C. elegans*

Параметр	Значение	Литературный источник
Потенциал нулевого тока (для выборки из 43 различных нейронов)	–30 … –90 мВ	Goodman *et al*., 1998
Потенциал нулевого тока (для выборки из 21 нейрона из головного нервного ганглия)	–16 … –22 мВ	Nickell *et al*., 2002
Потенциал нулевого тока (для 4 других нейронов из головного нервного ганглия)	–65, –44, –37, –31 мВ	
Потенциал нулевого тока нейрона AWA	–40 мВ	
Потенциал покоя интернейрона RIM	–20 мВ	Piggott *et al*., 2011
Потенциал покоя интернейрона AIB	–50 мВ	
Типичный размер тела нейрона (сомы)	2 … 3 мкм	Schafer, 2006
Диаметр нейрита	0,1 ... 0,5 мкм	Roehrig, 1998; Lockery, Goodman, 2009
Длина нейрита	до 1 мм и более	WormAtlas.org; caltech.wormbase.org/virtualworm/
Удельное сопротивление мембраны нейрона	61 ... 251 кΩ·см^2	Roehrig, 1998
Удельное сопротивление аксоплазмы	30 ... 250 Ω·см	Николлс и др., 2003
λ, константа длины для электротонического распространения потенциала	0,3 ... 1,5 мм	Рассчитана на основе приведенных выше значений по формуле из: (Rall, 1989)
Удельная электрическая емкость мембраны	1 мкФ/см^2	Одинакова для всех типов нервных и мышечных волокон
Скорость электротонического распространения потенциала	7,1 ... 35,3 мм/с	Рассчитана на основе приведенных выше значений по формуле из: (Johnston, Wu, 1995)
Задержка сигнала на химическом синапсе	~ 2 мс	en.wikipedia.org /wiki/Electrical_synapse
Задержка сигнала на щелевом контакте («gap junction»)	~ 0,2 мс	

Основные данные, имеющие отношение к описанию нейронов и нейронных сетей *C. elegans*, приведены в табл. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа позволила обобщить, соотнести и упорядочить множество фактов и данных, касающихся механизмов распространения сигналов в нервной системе *C. elegans*. Мы составили достаточно обоснованное представление о скоростях распространения сигналов, их затухании со временем и о скоростях, характеризующих движение нематоды. Показано, что электротоническое проведение сигнала на расстояния до 1 мм и более, характерное для *C. elegans*, возможно в пределах рассмотренных интервалов значений параметров, описывающих морфологию и электрофизиологию нейронов данного организма (табл. 2). Этих данных достаточно для создания подробной, биологически обоснованной модели фрагмента нервной системы *C. elegans* – например, с помощью пакета NEURON (Carnevale, Hines, 2006), ориентированного на симуляцию биологических нейронных сетей, что и планируется предпринять на следующем этапе нашей работы.

Простое объяснение генерации волн мышечных сокращений, основанное на задержке сигнала при движении от головы к хвосту, очевидно,

не работает, а для выявления истинной картины происходящих при этом нейронных процессов, по-видимому, недостаточно данных. Таким образом, дальнейший прогресс в данном направлении исследований можно ожидать либо в результате новых оптогенетических экспериментов, одновременно регистрирующих активность многих нейронов у движущейся в естественной среде нематоды, либо посредством биологически обоснованного компьютерного моделирования нейронных контуров, по которым распространяются сигналы от механосенсорных нейронов ALML/ALMR/AVM, что и будет предпринято в ближайшем будущем. Возможно, облегчить понимание работы нейронов *C. elegans* и уточнить их функциональные характеристики помогут методы культивирования этих клеток и реконструкция нейронных сетей *in vitro*.

Согласно данным о коннектоме *C. elegans*, три механосенсорных нейрона ALML/ALMR/AVM, иннервирующих переднюю половину тела, образуют контакты по меньшей мере с 26 другими нейронами, лишь малая часть из которых учитывается в имеющихся моделях генерации волн мышечных сокращений.

Мы надеемся, что данная работа и последующие исследования в данном направлении позволят значительно приблизиться к решению этой проблемы.

Отдельно стоит отметить наблюдение о том, что движение *C. elegans* назад при реверсе начинается с той же фазы, на которой закончилось движение вперед, вероятно, оно может свидетельствовать о том, что нематода способна либо хранить информацию о своей текущей форме тела, либо считывать ее при помощи проприоцепторов.

Полученные данные и предложенные подходы также могут быть использованы при моделировании более сложно организованных биологических нейронных систем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта СО РАН № 136 «Исследование информационных и молекулярно-генетических механизмов функционирования сетей нейронов на основе экспериментально-компьютерных подходов».

ЛИТЕРАТУРА

Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Гл. 7. Изд-во Едиториал УРСС, 2003. 686 с.
Nicholls J.G. From Neuron to Brain / Eds J.G. Nicholls, A.R. Martin, B.G. Wallace, P.A. Fuchs. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2001. 682 p. (In Russian).

Эккерт Р., Рэндалл Д., Огастин Д. Физиология животных. Механизмы и адаптации: Учебник в двух томах. М.: Мир, 1991. Т. 1.
Eckert R., Randall D., Ogastin D. Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations. M.: Mir, 1991. V. 1. (In Russian).

Barbosa-Morais N.L., Irimia M., Pan Q., Xiong H.Y., Gueroussov S., Lee L.J., Slobodeniuc V., Kutter C., Watt S., Colak R., Kim T., Misquitta-Ali C.M., Wilson M.D., Kim P.M., Odom D.T., Frey B.J., Blencowe B.J. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species // Science. 2012. V. 338. No. 6114. P. 1587–1593.

Bargmann C.I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome // Science. 1998. V. 282. P. 2028–2033.

Carnevale N.T., Hines M.L. The NEURON Book. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 2006. 413 p.

Chalfie M., Sulston J.E., White J.G., Southgate E., Thomson J.N., Brenner S. The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans* // J. Neurosci. 1985. V. 5. P. 956–964.

Cohen N., Sanders T. Nematode locomotion: dissecting the neuronal-environmental loop // Curr. Opin. Neurobiol. 2014. V. 25. P. 99–106.

Faumont S., Rondeau G., Thiele T.R., Lawton K.J., McCormick K.E., Sottile M., Griesbeck O., Heckscher E., Roberts W.M., Doe C.Q., Lockery S.R. An image-free opto-mechanical system for creating virtual environments and imaging neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis elegans* // PLoS ONE. 2011. V. 6. No. 9. e24666.

Goodman M.B., Hall D.H., Avery L., Lockery S.R. Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons // Neuron. 1998. V. 20. No. 4. P. 763–772.

Johnston D., Wu S.M.S. Foundations of Cellular Neurophysiology. MIT Press, Cambridge, MA, 1995. 750 p.

Lockery S.R., Goodman M.B. The quest for action potentials in *C. elegans* neurons hits a plateau // Nat. Neurosci. 2009. V. 12. P. 377–378.

Lüersen K., Faust U., Gottschling D.-C., Döring F. Gait-specific adaptation of locomotor activity in response to dietary restriction in *Caenorhabditis elegans* // J. Exp. Biol. 2014. V. 217. P. 2480–2488.

Maguire S.M., Clark C.M., Nunnari J., Pirri J.K., Alkema M.J. The *C. elegans* touch response facilitates escape from predacious fungi // Curr. Biol. 2011. V. 21. No. 15. P. 1326–1330.

Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M., Tsien R.Y. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin // Nature. 1997. V. 388. P. 882–887.

Nickell W.T., Pun R.Y.K., Bargmann C.I., Kleene C.I. Single ionic channels of two *Caenorhabditis elegans* chemosensory neurons in native membrane // J. Membrane Biol. 2002. V. 189. P. 55–66.

O'Hagan R., Chalfie M., Goodman B. The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. No. 1. P. 43–50.

Piggott B.J., Liu J., Feng Z., Wescott S.A., Xu X.Z. The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans* // Cell. 2011. V. 147. No. 4. P. 922–933.

Rall W. Cable theory for dendritic neurons // Methods in Neuronal Modelling: From Synapses to Networks / Eds C. Koch, I. Segev. MIT press, 1989. P. 9–62.

Rankin C.H. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans* // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 622–630.

Rankin C.H. Invertebrate learning: what can't a worm learn? // Curr. Biol. 2004. V. 14. No. 15. R617–618.

Roehrig C.J. Computational model of a behavior in *C. elegans* and a resulting framework for modularizing dynamical neuronal structures: PhD thesis. The University of British Columbia, 1998. 140 p.

Schafer W.R. Ed. Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction (June 2, 2006), WormBook / The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.111.1, http://www.wormbook.org.

Shen X.N., Sznitman J., Krajacic P., Lamitina T., Arratia P.E. Undulatory locomotion of *Caenorhabditis elegans* on wet surfaces // Biophys J. 2012. V. 102. No. 12. P. 2772–2781.

Shipley F.B., Clark M.C., Alkema M.J., Leifer A.M. Simultaneous optogenetic manipulation and calcium imaging in freely moving *C. elegans* // Front. Neural Circuits. 2014. V. 8. Art. 28. P. 1–8.

Suzuki H., Kerr R., Bianchi L., Frøkjær-Jensen C., Slone D., Xue J., Gerstbrein B., Driscoll M., Schafer W.R. *In vivo* imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation // Neuron. 2003. V. 39. P. 1005–1017.

Varshney L.R., Chen B.L., Paniagua E., Hall D.H., Chklovskii D.B. Structural Properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network // PLoS Comput. Biol. 2011. V. 7. No. 2. e1001066.

White J.G., Southgate E., Thomson J.N., Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* // Phil. Trans. Roy. Soc. L. 1986. B 314. P. 1–340.

Wei A., Jegla T., Salkoff L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project // Neuropharmacology. 1996. V. 35. No. 7. P. 805–829.

SOME DETAILS OF SIGNAL PROPAGATION IN THE NERVOUS SYSTEM OF *C. ELEGANS*

A.Yu. Palyanov[1], A.S. Ratushnyak[2]

[1] A.P. Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: palyanov@iis.nsk.su;
[2] Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ratush@kti.nsc.ru

Summary

Among organisms most widely used for investigation of fundamental mechanisms of nervous system functioning, *Caenorhabditis elegans* is unique due to exceptionally small number of its neurons, 302. Over a period of 25 years it stays the only organism with known *connectome* – a description of its neurons and interneuronal connections. However, this information appeared to be insufficient for deciphering of mechanisms underlying the work of even such a small nervous system. Further years devoted to both experimental research and development of computational models. Consolidation of simulated nervous, sensory and muscular systems united with nematode body, or virtual *C. elegans*, is a big hope for solving this problem. Recent progress rather shed light on the real complexity of the problem than brought researchers closer to its solution. Here we perform an attempt to generalize, correlate and order a set of facts and data related to mechanisms of signals propagation in the *C. elegans* nervous system. As a result it was shown that electrotonical propagation of neural signal within distance of 1 mm or slightly more, which is common in *C. elegans* nervous system, is possible for some combinations of parameters (describing morphology and electrophysiology of this organism) within theoretically possible intervals. According to this, simulation of a fragment of *C. elegans* neural network based on real morphological and electrophysiological data presents to be quite reasonable. For example, it can be performed using NEURON software oriented to simulation of biological neural networks.

Key words: *C. elegans*, computational neuroscience, connectome, modeling, electrotonic signal propagation.

УДК 575.162:612.143

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *DRD4* С НЕКОТОРЫМИ ФАКТОРАМИ РИСКА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2014 г. **Н.С. Юдин[1, 2, 3], Т.М. Мишакова[1], Е.В. Игнатьева[1, 3], В.Н. Максимов[1, 2], В.В. Гафаров[2], С.К. Малютина[2], М.И. Воевода[1, 2, 3]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия;
[3] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 22 сентября 2014 г. Принята к публикации 5 ноября 2014 г.

Гены рецепторов к дофамину являются перспективными генами-кандидатами, мутации в которых могут способствовать развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Ген дофаминового рецептора D4 (*DRD4*) человека содержит полиморфный сайт с числом тандемных повторов размером 48 п.н. в экзоне 3 от 2 до 10. Целью работы был анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *DRD4* с показателями артериального давления и липидного профиля крови в популяционной выборке жителей г. Новосибирска (n = 676).

Для анализа показателей артериального давления сравнивали группу индивидов, имеющих в генотипе хотя бы один «длинный» (7 или 8 повторов) аллель (группа 7+) против всех остальных (группа 7–). Для анализа показателей липидного профиля крови сравнивали группу индивидов с наличием в генотипе хотя бы одного аллеля с 2 или 5 повторами (группа 2+5+) против всех остальных (группа 2–5–). Была выявлена ассоциация между наличием аллелей гена *DRD4* с 7 или 8 повторами и повышенным систолическим, а также диастолическим артериальным давлением у женщин. Ассоциации этих параметров у мужчин нами не выявлено. Также отсутствовала ассоциация между наличием аллелей с 7 или 8 повторами и пульсовым артериальным давлением у лиц обоего пола. Наличие хотя бы одного аллеля гена *DRD4* с 2 или 5 повторами было ассоциировано с пониженным уровнем холестерина ЛПВП у женщин, а также с пониженным уровнем общего холестерина у мужчин. Статистически достоверных ассоциаций между полиморфизмом гена *DRD4* и уровнями холестерина ЛПНП, холестерина ЛПВП и триглицеридов у мужчин нами не выявлено.

Ключевые слова: дофамин, рецептор, ген *DRD4*, полиморфизм, тандемный повтор, артериальное давление, липопротеины, пол, ассоциация, медицинская генетика.

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия, по общему признанию, считается одним из основных факторов риска для атеросклероза, инфаркта миокарда, инсульта и почечной недостаточности (Graham, 2014). Хотя, по-видимому, 30–50 % вариабельности артериального давления в популяции обусловлено генетическими факторами, идентификация генов, контролирующих артериальное давление, остается трудной задачей (Wang *et al.*, 2011). Известно, что редкие моногенные формы гипертензии связаны с нарушением транспорта натрия в почках (Louis-Dit-Picard *et al.*, 2012). Причиной многих случаев эссенциальной гипертонии, возможно, является

врожденное нарушение транспорта натрия в нефроне, который включает в себя клубочковую фильтрацию и реабсорбцию натрия в канальцах и собирательных трубках.

Дофамин является известным паракринным регулятором транспорта натрия в почках (Zeng *et al.*, 2007). Например, локально выделяющийся в почке дофамин вызывает увеличение экскреции натрия после солевой нагрузки у нормотензивных субъектов, и этот эффект дофамина снижается при эссенциальной гипертонии. Обнаружена ассоциация SNP полиморфизма A-48G в гене дофаминового рецептора *DRD1* с гипертензией у представителей нескольких этнических групп (Orun *et al.*, 2011; Cipolletta *et al.*, 2012). *TaqI* полиморфизм в гене дофаминового рецептора *DRD2* ассоциирован с гипертензией в китайской популяции (Fang *et al.*, 2005).

По-видимому, как D1, так и D2 рецепторы влияют на системное артериальное давление через локальные физиологические процессы в почке. Рецепторы D1 могут ингибировать активность Na-K-АТФазы в базолатеральной мембране и Na-H-антипорт в люминальной мембране канальцев, в то время как рецепторы D2, наоборот, могут активировать работу Na-K-АТФазы (Sen *et al.*, 2005). Таким образом, наследственный дефект либо в DRD1-опосредованном ингибировании, либо в DRD2-опосредованном стимулировании реабсорбции натрия в почке может способствовать возникновению гипертензии.

Дофаминовый рецептор D4 является членом семейства D2-подобных дофаминовых рецепторов. Известно, что мыши, нокаутированные по гену *DRD4,* имеют повышенную тревожность (Keck *et al.,* 2013) и меньшую продолжительность жизни (Grady *et al.*, 2013). Однако сведения о состоянии сердечно-сосудистой системы у этих мышей в литературе отсутствуют. Наиболее изученным полиморфным сайтом в гене *DRD4* человека является полиморфизм по числу тандемных повторов размером 48 п.н. каждый, локализованный в третьем экзоне гена (Wu *et al.*, 2012). Каждый повтор кодирует полипептид в 16 аминокислотных остатков в третьей внутриклеточной петле белка рецептора D4. Считается, что эта область белка отвечает за взаимодействие с G-белками и влияет на внутриклеточный уровень цАМФ (Nemoda *et al.*, 2011).

Число тандемных повторов в полиморфном сайте может варьировать от 2 до 10, однако в популяциях европеоидов чаще всего встречаются варианты с 4 и 7 повторами (Nikolaidis *et al.*, 2010). Присутствие в генотипе хотя бы одного «длинного» (7, 8 или 10 повторов) аллеля гена *DRD4* ассоциировано с синдромом дефицита внимания и гиперактивностью (Gold *et al.*, 2014), склонностью к алкоголизму (Maxwell *et al.*, 2013), а также с одной из черт личности – «поиском новизны» (Munafo *et al.,* 2008).

Что касается сердечно-сосудистых заболеваний, то у евроамериканцев наличие «длинных» повторов в гене *DRD4* ассоциировано с повышенным систолическим и диастолическим артериальным давлением (Sen *et al.*, 2005). Варианты гена *DRD4* с 2 и 5 повторами ассоциированы с повышенным уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) у мужчин и с пониженным уровнем ХС-ЛПВП у женщин в финской популяции (Elovainio *et al.*, 2005). Ранее нами были выявлены ассоциации полиморфизма гена *DRD4* с рядом психосоциальных факторов сердечно-сосудистых заболеваний у жителей г. Новосибирска (Gafarov *et al.*, 2013).

Существует тесная связь между процессами передачи сигнала в синапсах и метаболизмом липидов в организме. Нейроны сами по себе, без участия глиальных клеток, формируют лишь незначительное число синапсов. Сигнальным веществом, выделяющимся из клеток глии для инициации процесса синаптогенеза, является холестерин (Orth, Bellosta, 2012). Холестерин необходим для формирования синаптических пузырьков и кластеризации постсинаптических рецепторов (Dason *et al.*, 2014). Была выдвинута гипотеза, согласно которой понижение уровня холестерина в плазме крови может приводить к снижению содержания холестерина в мембранах клеток мозга, которое, в свою очередь, вызывает подавление активности серотонинергических нейронов (Ainiyet, Rybakowski, 2014). Также снижение уровня холестерина в плазме крови может приводить к повышению текучести клеточных мембран нейронов, что способствует повышению обратного захвата серотонина в синапсе и снижению его связывания рецепто-

рами на постсинаптической мембране (Pucadyil, Chattopadhyay, 2006). По-видимому, метаболизм липидов и дофамина в организме может контролироваться общими генетическими факторами. Так, на финской популяции показана связь между полиморфизмом различного числа повторов гена *DRD4* и рядом показателей липидного метаболизма (Elovainio *et al.*, 2005).

В доступной литературе нами не встречено работ, исследующих ассоциации полиморфизма различного числа тандемных повторов в гене *DRD4* с показателями артериального давления и липидного профиля крови в российских популяциях. Целью работы был анализ связи отдельных полиморфных вариантов гена *DRD4* с 3 показателями артериального давления и 4 показателями липидного профиля крови в популяционной выборке жителей г. Новосибирска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на материале, собранном в рамках программы ВОЗ MONItoring of Trends and Determinants in CArdiovascular Disease (MONICA) (Luepker, 2012). В рамках этой программы была собрана строго стандартизованная уникальная информация о динамике заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистых и других терапевтических заболеваний, а также их ведущих факторов риска в г. Новосибирске за период 1984–1994 гг. Случайная выборка была сформирована согласно требованиям протокола программы MONICA на основе избирательных списков с использованием таблицы случайных чисел. Отклик на приглашение участвовать в обследовании составлял 82,1 %. Были обследованы мужчины ($n = 419$) в возрасте 25–65 лет (средний возраст 46,3 ± 0,5 года) и женщины ($n = 257$) в возрасте 25–64 лет (средний возраст 43,1 ± 0,7 года). По данным анкетирования, 92,3 % выборки составляли лица русской национальности. Пациентов включали в исследование после подписания добровольного информированного согласия. Планируемое исследование было одобрено этическим комитетом НИИ терапии и профилактической медицины СО РАМН.

Измерение артериального давления проводилось одним врачом, предварительно прошедшим обучение и получившим соответствующий сертификат. У каждого пациента вручную были произведены два измерения с помощью стандартного ртутного манометра. В исследовании использовали средние значения. Пульсовым артериальным давлением считали разность между систолическим и диастолическим артериальным давлением.

Кровь для определения липидного профиля брали утром натощак из локтевой вены не ранее чем через 12 ч после приема пищи. Концентрации общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) определяли ферментативным методом с использованием стандартных наборов «Biosub CHOL», «Biosub TG» (Biocon, Германия) «HDL/LDL» (Herbos dijagnostik, Хорватия) на химическом анализаторе FP-901 (Labsystems Oy, Финляндия).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенолом. Генотипирование полиморфизма различного числа тандемных повторов гена *DRD4* проводили по модифицированной методике Нанко с соавт. (Nanko *et al.*, 1993). Фрагмент ДНК гена *DRD4* (идентификационный номер в GenBank L12398) размером 96–384 п.н. амплифицировали с использованием праймеров 5′-AGGTGGCACGTCGCGCCAAGCTGCA-3′ (позиции 668–692) и 5′-TCTGCGGTGGAGTCT GGGGTGGGAG-3′ (позиции 1129–1105). Реакционная смесь для амплификации содержала 0,5–1 мкг геномной ДНК, прямой и обратный праймеры в концентрации 0,4 мкМ каждый, dNTP в концентрации 0,1 мМ каждый, 1,5 мМ $MgCl_2$, 10 % диметилсульфоксид, 0,01 % Tween-20, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 75 mM ТрисHCl (pH 9,0) и 1,25 ед. Taq-полимеразы. Общий объем смеси составлял 25 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific Inc., США). Условия амплификации были следующими: 4 мин при 95 °С, затем 35 циклов по 1 мин при 95 °С, 1 мин при 65 °С и 1 мин при 72 °С. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 4 %-м полиакриламидном геле с окраской бромистым этидием. В качестве ДНК-маркера использовали маркер молекулярного веса ДНК

от 100 до 1000 п.н. с шагом 100 п.н. (Сибэнзим, Россия).

При статистическом анализе индивиды были разделены по генотипу на две группы в соответствии с ранее описанными в литературе ассоциациями. Для анализа показателей артериального давления сравнивали группу индивидов с наличием в генотипе хотя бы одного «длинного» (7 или 8 повторов) аллеля (группа 7+) против всех остальных (группа 7–) (Sen *et al.*, 2005). Для анализа показателей липидного профиля крови сравнивали группу индивидов с наличием в генотипе хотя бы одного аллеля с 2 или 5 повторами (группа 2+5+) против всех остальных (группа 2–5–) (Elovainio *et al.*, 2005).

На первом этапе проводили двухфакторный дисперсионный анализ. В качестве независимых факторов использовали генотип по гену *DRD4* (две группы сравнения) и пол (две группы сравнения), показатели артериального давления и липидного профиля крови считали зависимыми переменными. Поскольку влияние пола или взаимодействия пол × генотип оказалось достоверным для многих исследованных показателей, дальнейший анализ проводили раздельно для мужчин и женщин с помощью однофакторного ковариационного анализа. При ковариационном анализе генотип по гену *DRD4* (две группы сравнения) считали независимым фактором, показатели артериального давления и липидного профиля крови считали зависимыми переменными, возраст индивида был включен в анализ в качестве ковариаты. Достоверность попарных различий средних величин между группами оценивали с помощью post hoc теста Тьюки. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы определили генотипы полиморфизма различного числа повторов гена *DRD4* у 676 жителей г. Новосибирска, обследованных в рамках программы ВОЗ MONICA (табл. 1). Частоты аллелей, обнаруженные в нашем исследовании, хорошо согласуются с ранее обнаруженными частотами для лиц русской национальности (Боринская и др., 2004).

Дисперсионный анализ выявил достоверное влияние взаимодействия пол × генотип на систолическое ($F_{1,672} = 4{,}859$, $P = 0{,}028$) и диастолическое ($F_{1,672} = 4{,}458$, $P = 0{,}035$) артериальное давление. При ковариационном анализе мы обнаружили ассоциацию между наличием аллелей с 7 или 8 повторами гена *DRD4* и повышенным систолическим ($P = 0{,}005$), а также диастолическим ($P = 0{,}001$) артериальным давлением у женщин (табл. 2). Ассоциации этих параметров у мужчин нами не выявлено. Также не было ассоциации между присутствием «длинных» аллелей и пульсовым артериальным давлением у лиц обоего пола.

Статистически достоверное влияние пола было обнаружено для общего холестерина ($F_{1,662} = 486{,}25$, $P = 0{,}0001$) и холестерина ЛПВП ($F_{1,647} = 4{,}146$, $P = 0{,}042$). Влияние взаимодействия пол × генотип оказалось существенным для холестерина ЛПНП ($F_{1,639} = 4{,}859$, $P = 0{,}028$). Откорректированный по возрасту уровень общего холестерина у мужчин, имевших хотя бы один аллель с 2 или 5 повторами, оказался существенно ниже, чем этот показатель у мужчин-носителей других аллелей (табл. 3). Статистически достоверных ассоциаций между полиморфизмом гена *DRD4* и уровнями холестерина ЛПНП, холестерина ЛПВП и триглицеридов у мужчин нами не выявлено.

Таблица 1

Частоты аллелей полиморфизма различного числа повторов гена *DRD4* у лиц русской национальности

Аллель (число повторов)	Частота		
	г. Новосибирск* ($n = 676$)	Центральная Россия** ($n = 83$)	Волго-Уральский регион** ($n = 46$)
2	0,120	0,138	0,152
3	0,050	0,048	0,076
4	0,718	0,723	0,641
5	0,021	0,012	0,087
6	0,074	0,018	0
7	0,015	0,042	0,044
8	0,002	0,012	0
11	0	0,010	0

Примечание. * Собственные данные; ** по данным Боринской и др. (2004).

Таблица 2

Откорректированные по возрасту показатели артериального давления у мужчин и женщин с наличием в генотипе хотя бы одного аллеля гена *DRD4* с 7 или 8 повторами

Показатель	Среднее ± стандартная ошибка (*n*)		*P* для различий
	Группа 7–	Группа 7+	
Мужчины			
Систолическое АД, мм рт. ст.	135,11 ± 1,06 (403)	133,38 ± 5,32 (16)	0,748
Диастолическое АД, мм рт. ст.	86,48 ± 0,52 (403)	89,31 ± 2,97 (16)	0,349
Пульсовое АД, мм рт. ст.	48,64 ± 0,76 (403)	44,06 ± 3,80 (16)	0,238
Женщины			
Систолическое АД, мм рт. ст.	131,67 ± 1,22 (253)	159,50 ± 9,73 (4)	0,005
Диастолическое АД, мм рт. ст.	83,64 ± 0,68 (253)	101,25 ± 5,42 (4)	0,001
Пульсовое АД, мм рт. ст.	48,02 ± 0,84 (253)	58,25 ± 6,67 (4)	0,128

Таблица 3

Откорректированные по возрасту показатели липидов крови у мужчин и женщин с наличием в генотипе хотя бы одного аллеля гена *DRD4* с 2 или 5 повторами

Показатель	Среднее ± стандартная ошибка		*P* для различий
	Группа 2–5–	Группа 2+5+	
Мужчины			
ХС, мг/дл	208,58 ± 2,33 (316)	198,81 ± 4,16 (99)	0,041
ХС-ЛПНП, мг/дл	131,88 ± 2,25 (303)	124,06 ± 3,96 (98)	0,086
ХС-ЛПВП, мг/дл	54,27 ± 0,85 (307)	51,57 ± 1,52 (96)	0,120
ТГ, мг/дл	120,83 ± 3,87 (288)	111,58 ± 6,70 (96)	0,232
Женщины			
ХС, мг/дл	99,75 ± 3,58 (203)	103,56 ± 7,37 (48)	0,642
ХС-ЛПНП, мг/дл	117,10 ± 2,71 (195)	127,07 ± 5,51 (47)	0,104
ХС-ЛПВП, мг/дл	57,88 ± 0,88 (200)	53,65 ± 1,80 (48)	0,035
ТГ, мг/дл	102,49 ± 3,73 (184)	107,65 ± 7,72 (43)	0,548

У женщин носители хотя бы одного аллеля с 2 или 5 повторами имели пониженный уровень холестерина ЛПВП ($P = 0,035$) по сравнению с остальной частью выборки. Ассоциаций полиморфизма гена *DRD4* с другими показателями липидного профиля крови у женщин нами не выявлено.

Нами не выявлено ассоциаций между присутствием в геноме хотя бы одного аллеля гена *DRD4* с 2 или 5 повторами и показателями артериального давления как у мужчин, так и у женщин. Также в нашем исследовании у лиц обоего пола отсутствовали ассоциации между показателями липидного профиля крови и наличием аллелей гена *DRD4* с 7 или 8 повторами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы определили генотипы у 676 жителей г. Новосибирска, обследованных в рамках программы ВОЗ MONICA (табл. 1). Частоты аллелей полиморфизма различного числа повторов гена *DRD4*, обнаруженные в нашем исследовании преимущественно у русского населения г. Новосибирска, хорошо согласуются с ранее обнаруженными частотами для русских Цент-

ральной России и Волго-Уральского региона (Боринская и др., 2004). Как и в других популяциях русских, наиболее распространенным аллелем в нашей популяции оказался аллель с 4 повторами (72 %), второй по частоте – аллель с 2 повторами (12 %). Незначительные различия по частотам аллелей с другим числом повторов могут быть связаны с генетическими особенностями русского населения в разных регионах России, присутствием в выборках незначительного числа представителей других этнических групп и потомков от смешанных браков, а также с различным размером выборок.

Нами была выявлена ассоциация между наличием «длинных» аллелей (7 или 8 повторов) гена *DRD4* и повышенным систолическим, а также диастолическим артериальным давлением у женщин (табл. 2). Поскольку в нашем исследовании группа женщин-носителей «длинных» аллелей состояла всего из 4 человек, данный вывод носит предварительный характер и, безусловно, нуждается в подтверждении. Однако он полностью соответствует данным, полученным ранее для женщин-евроамериканок (Sen *et al.*, 2005). Противоречивые результаты в отношении мужчин могут быть связаны как с генетическими особенностями этих этнических групп, так и с различным влиянием неизвестных факторов внешней среды.

Механизм, опосредующий ассоциацию между полиморфизмом различного числа повторов гена *DRD4* и высоким артериальным давлением, в настоящее время неясен. Известно, что воздействие нейролептика клозапина, обладающего относительной селективностью к дофаминовым рецепторам D4, вызывает снижение артериального давления (Rotella *et al.*, 2014). Имеется также несколько работ по исследованию физиологических эффектов локальной активации рецепторов D4 в почке. Так, в кортикальных собирательных трубках рецепторы D4 противодействуют эффектам рецепторов к вазопрессину (V2) и альдостерону, снижая, таким образом, реабсорбцию воды и натрия (Staruschenko, 2012). Реабсорбция натрия в почке также регулируется через взаимодействие рецептора D4 и рецептора к ангиотензину II 1-го типа (Tayebati *et al.*, 2011).

Экспрессия мРНК рецептора D4, помимо проксимальных и дистальных канальцев нефрона, обнаружена в пресинаптических окончаниях почечных нервов, которые густо иннервируют гломерулярные капиллярные клубочки, а также адвентициальную оболочку междолевых и междольковых артерий, афферентных и эфферентных артериол (Ricci *et al.*, 2002). Экспрессия мРНК рецептора D4 в юкстагломерулярных клетках свидетельствует о его возможной роли в регуляции секреции ренина, хотя уровень ренина в крови у мышей, нокаутированных по гену *DRD4*, оставался в пределах нормы (Zeng *et al*., 2008).

Нами была выявлена достоверная ассоциация между наличием хотя бы одного аллеля гена *DRD4* с 2 или 5 повторами и пониженным уровнем холестерина ЛПВП у женщин, что соответствует аналогичным результатам, полученным на женской части популяционной выборки в Финляндии (Elovainio *et al*., 2005). Таким образом, наши данные подтверждают вывод, сделанный ранее финскими авторами, о том, что для женщин варианты гена *DRD4* с 2 и 5 повторами являются факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. При исследовании мужской части выборки нами обнаружено, что носители хотя бы одного аллеля с 2 или 5 повторами имеют более низкий уровень общего холестерина, чем этот же показатель у мужчин-носителей других аллелей. Этот результат хотя и не воспроизводит в точности данные, полученные при исследовании мужской части населения Финляндии (Elovainio *et al*., 2005), однако также свидетельствует в пользу того, что у мужчин аллели с 2 и 5 повторами являются протективными в отношении сердечно-сосудистых заболеваний.

Механизм, посредством которого аллели гена *DRD4* с 2 и 5 повторами могут оказывать свой эффект на уровень общего холестерина либо его фракции, неизвестен. По данным базы данных Bgee, ген *DRD4* экспрессируется в печени человека (Bgee, 2014), что указывает на то, что активация рецепторов D4 под действием дофамина может запускать пути сигнальной трансдукции, модулирующие уровни экспрессии генов, экспрессирующихся в гепатоцитах, в частности аполипопротеинов либо ферментов биосинтеза холестерина. Аполипопротеины, входящие в состав «протективных» частиц липопротеинов – ЛПВП, кодируются генами *APOA1*, *APOA2*, *APOA54*, *APOD*, *APOE* и др.

(Camont *et al*., 2011). ЛПНП, определяющие уровень «вредного» холестерина, включают белки, кодируемые генами *APOB*, *LPA* и др. (Diffenderfer, Schaefer, 2014). Изменение экспрессии одного или нескольких генов, кодирующих аполипопротеины, может повлиять как на уровень общего холестерина, так и на уровень холестерина ЛПВП.

В пользу гипотезы о возможном участии рецепторов D4 в регуляции экспрессии генов, контролирующих уровень холестерина, говорит ингибирование под действием дофамина активности одного из ключевых ферментов пути биосинтеза холестерина – HMGCoA-редуктазы (O'Meara *et al.*, 1992). Ряд исследований также подтверждает наличие зависимости между активностью дофаминергической системы (уровнем дофамина либо активностью дофаминовых рецепторов) и уровнем общего холестерина в крови (Polymeropoulos *et al.*, 2009; Brunerova *et al.*, 2013) либо холестерином ЛПНП (dos Santos Silva *et al.*, 2011). Выявленные в нашем исследовании различия в эффектах аллелей гена *DRD4* у мужчин и женщин могут быть связаны с тем, что экспрессия некоторых аполипоротеинов регулируется половыми гормонами, в частности эстрадиолом (Lamon-Fava *et al.*, 1999). Регуляция половыми гормонами может интерферировать с сигнальными путями, активируемыми дофамином, приводя к различной реакции на уровне экспрессии генов у мужчин и женщин.

Таким образом, нами впервые в российской популяции показана ассоциация «длинных» полиморфных вариантов гена дофаминового рецептора D4 с 7 и 8 повторами с повышенным систолическим и диастолическим АД у женщин. Нами также выявлена ассоциация между наличием хотя бы одного аллеля гена *DRD4* с 2 или 5 повторами и пониженным уровнем холестерина ЛПВП у женщин, а также пониженным уровнем общего холестерина у мужчин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана бюджетным проектом VI.58.1.1., РФФИ (научные проекты № 13-04-00968 и №13-04-01955), Интеграционным проектом СО РАН № 87 и бюджетным проектом VI.61.1.2 в части компьютерного анализа баз данных.

ЛИТЕРАТУРА

Боринская С.А., Кожекбаева Ж.М., Горбунова Е.В. и др. Исследование полиморфизма гена DRD4 в популяциях России и сопредельных стран // Генетика. 2004. Т. 40. № 6. С. 835–840.

Borinskaya S.A., Kozhekbaeva Zh.M., Gorbunova E.V. *et al*. Analysis of the DRD4 gene polymorphism in populations of Russia and Neighboring countries // Russ. J. Genetics. 2004. V. 40. No. 6. P. 679–683. (In Russian).

Ainiyet B., Rybakowski J.K. Suicidal behavior in schizophrenia may be related to low lipid levels // Med. Sci. Monit. 2014. V. 20. P. 1486–1490.

Bgee. 2014. available at http://bgee.unil.ch/bgee/bgee

Brunerova L., Potockova J., Horacek J. *et al.* Central dopaminergic activity influences metabolic parameters in healthy men // Neuroendocrinology. 2013. V. 97. No. 2. P. 132–138.

Camont L., Chapman M.J., Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease // Trends Mol. Med. 2011. V. 17. No. 10. P. 594–603.

Cipolletta E., Ciccarelli M., Izzo R. *et al.* A polymorphism within the promoter of the dopamine receptor D1 (DRD1 -48A/G) associates with impaired kidney function in white hypertensive patients // Transl. Med. UniSa. 2012. V. 2. P. 10–19.

Dason J.S., Smith A.J., Marin L., Charlton M.P. Cholesterol and F-actin are required for clustering of recycling synaptic vesicle proteins in the presynaptic plasma membrane // J. Physiol. 2014. V. 592. No. 4. P. 621–633.

Diffenderfer M.R., Schaefer E.J. The composition and metabolism of large and small LDL // Curr. Opin. Lipidol. 2014. V. 25. No. 3. P. 221–226.

dos Santos Silva C.M., Barbosa F.R., Lima G.A. *et al.* BMI and metabolic profile in patients with prolactinoma before and after treatment with dopamine agonists // Obesity. 2011. V. 19. No. 4. P. 800–805.

Elovainio M., Puttonen S., Heponiemi T. *et al.* Relationship between DRD4 polymorphism and lipid metabolism: what is the role of novelty seeking? // Neuropsychobiology. 2005. V. 51. No. 1. P. 53–58.

Fang Y.J., Thomas G.N., Xu Z.L. *et al.* An affected pedigree member analysis of linkage between the dopamine D2 receptor gene TaqI polymorphism and obesity and hypertension // Int. J. Cardiol. 2005. V. 102. No. 1. P. 111–116.

Gafarov V.V., Gromova E.A., Voevoda M.I. *et al*. Epidemiological, genetic features of personal anxiety as a risk factor for stroke (WHO «MONICA-psychosocial») // Cerebrovasc. Dis. 2013. V. 35. Suppl. 3. P. 428.

Gold M.S., Blum K., Oscar-Berman M., Braverman E.R. Low dopamine function in attention deficit/hyperactivity disorder: should genotyping signify early diagnosis in children? // Postgrad. Med. 2014. V. 126. No. 1. P. 153–177.

Grady D.L., Thanos P.K., Corrada M.M. *et al.* DRD4 genotype predicts longevity in mouse and human // J. Neurosci. 2013. V. 33. No. 1. P. 286–291.

Graham G. Population-based approaches to understanding disparities in cardiovascular disease risk in the United States // Int. J. Gen. Med. 2014. V. 7. P. 393–400.

Keck T.M., Suchland K.L., Jimenez C.C. *et al.* Dopamine D4

receptor deficiency in mice alters behavioral responses to anxiogenic stimuli and the psychostimulant methylphenidate // Pharmacol. Biochem. Behav. 2013. V. 103. No. 4. P. 831–841.

Lamon-Fava S., Ordovas J.M., Schaefer E.J. Estrogen increases apolipoprotein (apo) A-I secretion in hep G2 cells by modulating transcription of the apo A-I gene promoter // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999. V. 19. No. 12. P. 2960–2965.

Louis-Dit-Picard H., Barc J., Trujillano D. *et al.* KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron // Nat. Genet. 2012. V. 44. No. 4. P. 456–460.

Luepker R.V. WHO MONICA Project: What Have We Learned and Where to Go from Here? // Pub. Health Rev. 2012. V. 33. No. 2. P. 373–396.

Maxwell A. Are some individuals diagnosed with ADHD prone to alcohol abuse? Consideration of two possible mediating factors for this susceptibility // J. Atten. Disord. 2013. V. 17. No. 2. P. 98–101.

Munafo M.R., Yalcin B., Willis-Owen S.A., Flint J. Association of the dopamine D4 receptor (DRD4) gene and approach-related personality traits: meta-analysis and new data // Biol. Psychiatry. 2008. V. 63. No. 2. P. 197–206.

Nanko S., Hattori M., Ikeda K. *et al.* Dopamine D4 receptor polymorphism and schizophrenia // Lancet. 1993. V. 341. No. 8846. P. 689–690.

Nemoda Z.1, Szekely A., Sasvari-Szekely M. Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood // Neurosci. Biobehav. Rev. 2011. V. 35. No. 8. P. 1665–1686.

Nikolaidis A., Gray J.R. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis // Soc. Cogn. Affect. Neurosci. 2010. V. 5. No. 2/3. P. 188–193.

O'Meara N.M., Devery R.A., Owens D. *et al.* Alterations in cellular cholesterol metabolism following administration of 6-hydroxydopamine to rabbits // Br. J. Pharmacol. 1992. V. 105. No. 2. P. 495–499.

Orth M., Bellosta S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders // Cholesterol. 2012. V. 2012. P. 292598.

Orun O., Nacar C., Cabadak H. *et al.* Investigation of the association between dopamine D1 receptor gene polymorphisms and essential hypertension in a group of Turkish subjects // Clin. Exp. Hypertens. 2011. V. 33. No. 6. P. 418–421.

Polymeropoulos M.H., Licamele L., Volpi S. *et al.* Common effect of antipsychotics on the biosynthesis and regulation of fatty acids and cholesterol supports a key role of lipid homeostasis in schizophrenia // Schizophr. Res. 2009. V. 108. No. 1–3. P. 134–142.

Pucadyil T.J., Chattopadhyay A. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors // Prog. Lipid Res. 2006. V. 45. No. 4. P. 295–333.

Ricci A., Marchal-Victorion S., Bronzetti E. *et al.* Dopamine D4 receptor expression in rat kidney: evidence for pre- and postjunctional localization // J. Histochem. Cytochem. 2002. V. 50. No. 8. P. 1091–1096.

Rotella J.A., Zarei F., Frauman A.G., Greene S.L. Refractory hypotension treated with vasopressin after intentional clozapine overdose // Eur. J. Emerg. Med. 2014. V. 21. No. 4. P. 319–320.

Sen S., Nesse R., Sheng L. *et al.* Association between a dopamine-4 receptor polymorphism and blood pressure // Am. J. Hypertens. 2005. V. 18. No. 9. P. 1206–1210.

Staruschenko A. Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct // Compar. Physiol. 2012. V. 2. No. 2. P. 1541–1584.

Tayebati S.K., Lokhandwala M.F., Amenta F. Dopamine and vascular dynamics control: present status and future perspectives // Curr. Neurovasc. Res. 2011. V. 8. No. 3. P. 246–257.

Wang X., Ding X., Su S. *et al.* Genetic influence on blood pressure measured in the office, under laboratory stress and during real life // Hypertens. Res. 2011. V. 34. No. 2. P. 239–244.

Wu J., Xiao H., Sun H. *et al.* Role of dopamine receptors in ADHD: a systematic meta-analysis // Mol. Neurobiol. 2012. V. 45. No. 3. P. 605–620.

Zeng C., Zhang M., Asico L.D. *et al.* The dopaminergic system in hypertension // Clin. Sci. 2007. V. 112. No. 12. P. 583–597.

Zeng C., Armando I., Luo Y. *et al.* Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2008. V. 294. No. 2. P. H551–H569.

ASSOCIATION OF DOPAMINE RECEPTOR D4 (*DRD4*) GENE POLYMORPHISM WITH CARDIOVASCULAR DISEASE RISK FACTORS

N.S. Yudin[1, 2, 3], T.M. Mishakova[1], E.V. Ignatieva, V.N. Maksimov[1, 2], V.V. Gafarov[2], S.K. Malyutina[2], M.I. Voevoda[1, 2, 3]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: yudin@bionet.nsc.ru;
[2] Institute of Internal and Preventive Medicine SB RAMS, Novosibirsk, Russia;
[3] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Dopamine receptor genes are known to be candidate genes for cardiovascular diseases. The human D4 receptor gene (*DRD4*) contains a polymorphic number (2–10 copies) of tandem 48-bp repeats in exon 3. The aim of the study was to analyze the association of the *DRD4* gene polymorphism with cardiovascular disease risk factors in the Russian population: blood pressure (BP), the levels of high-density (HDL) and low-density (LDL) lipoprotein cholesterol, and triglycerides. We genotyped 257 female and 425 male subjects of Slavic ethnicity at the *DRD4* repeat polymorphism site. The subjects were divided either into 7+ (those having the allele of 7–8 repeats) and 7– (2–6 repeats) groups or into 2+ 5+ (2 or 5 repeats) and 2–5– (3, 4, 6, 7, or 8 repeats) groups. We found associations between the 7+ allele and elevated systolic and diastolic BP in women but not in men. Neither sex showed associations between the long variants of the *DRD4* gene and pulse blood pressure. The carriership of the 2– or 5– allele *DRD4* polymorphism was associated with low HDL cholesterol levels in women and low total cholesterol levels in men. *DRD4* polymorphism exerted no significant effects on LDL, HDL, or triglyceride levels in men.

Key words: dopamine, receptor, *DRD4* gene, polymorphism, tandem repeat, blood pressure, lipoprotein, sex, association, medical genetics.

УДК 159.9:159.923

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ТРЕВОЖНОСТИ С ПОЛИМОРФНЫМИ ВАРИАНТАМИ ГЕНА СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА У РУССКИХ И ТУВИНЦЕВ

© 2014 г. **А.Н. Савостьянов[1, 5, 6], В.С. Науменко[2], Н.А. Синякова[2], М.Н. Львова[2], Е.А. Левин[4], М.С. Залешин[5], У.Н. Кавай-оол[3], В.А. Мордвинов[2], Н.А. Колчанов[2], Л.И. Афтанас[1]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия, e-mail: alexander.savostyanov@gmail.com;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
[3] Тувинский государственный университет, Кызыл, Республика Тува;
[4] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия;
[5] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия;
[6] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 14 сентября 2014 г. Принята к публикации 11 ноября 2014 г.

В работе исследуется связь уровня личностной тревожности с полиморфными вариантами гена, кодирующего транспортер серотонина (5-HTT) у 57 русских жителей Сибири и 62 тувинцев. Полиморфные варианты гена 5-HTT определялись при помощи аллель-специфичной ПЦР с использованием ДНК, выделенной из крови испытуемых, в качестве матрицы. Уровень эксплицитной тревожности устанавливался при помощи опросника Спилбергера–Ханина, имплицитной – с помощью ассоциативного теста. Дополнительно у каждого испытуемого определялись показатели агрессивности, импульсивности, систем активации и торможения поведения (BAS и BIS). S-аллель гена 5-HTT достоверно чаще встречался в группе тувинцев, а L-аллель – у русских. У носителей генотипа LL уровни имплицитной и эксплицитной тревожности были ниже, чем у носителей генотипа SS, а гетерозиготы LS показали промежуточные значения тревожности. Факторы пола и этнической принадлежности были связаны с уровнем эксплицитной, но не имплицитной тревожности. Тувинские мужчины с генотипом SS показали низкий уровень эксплицитной тревожности, тогда как русские мужчины с этим генотипом показали высокий уровень тревожности. У женщин с генотипом SS межгрупповые различия отсутствовали. Также выявлена взаимосвязь полиморфных вариантов гена 5-HTT с показателями BAS и склонностью к вербальной агрессии. Данные могут быть интерпретированы как показатель различий в направленности тревоги в разных культурах. Гипотетически, генетически высокотревожные тувинские мужчины боятся проявлять страх, потому что проявление страха осуждается в их социальном окружении.

Ключевые слова: личностная тревожность, полиморфные варианты гена серотонинового транспортера, межэтнические различия.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование биологических основ индивидуальных различий в поведении людей представляет собой одну из наиболее перспективных областей современной психологии (Eysenck, 1990). Интерес к ней вызван как медицинской, так и социальной актуальностью темы. Медицинская актуальность обусловлена тем, что вероятность развития целого ряда неврологических, психиатрических и психосоматических заболеваний, а также особенности их протекания в существенной степени связаны с психологическими характеристиками индивидов (Miller, Lynam, 2003; Boerebach *et al*., 2014). Поэтому поиск биологических характеристик, связанных с поведением людей, приобретает большое значение для разработки персонализированных систем оценки риска заболеваемости и методик эффективной терапии. В настоящее время существует несколько различных подходов к оценке личностных свойств. Наиболее распространенный – использование опросников (Eysenck *et al*., 2000). Такой метод оценки может быть обозначен как «эксплицитный», поскольку испытуемый дает сознательные ответы на задаваемые ему вопросы. Другой метод – «имплицитное» тестирование (Teige *et al*., 2004; Egloff, Schmukle, 2002; Schnabel *et al*., 2006), при этом оценивают неконтролируемые поведенческие реакции, такие как скорость моторных ответов при появлении слов или словосочетаний, связанных с личностными качествами.

Среди биологических характеристик, имеющих отношение к личностным свойствам, следует отметить молекулярно-генетические показатели, связанные с особенностями биохимической организации головного мозга и эндокринной системы, и эндофенотипические физиологические параметры, связанные с активностью различных органов и систем (Gardini *et al*., 2009). Большой интерес представляют работы, направленные на изучение роли ключевых генов нейротрансмиттерных систем в механизмах регуляции различных видов поведения (Ebstein, 2006). Согласно одной из гипотез, генетически обусловленные индивидуальные различия в активности нейромедиаторных систем могут быть связаны с личностными особенностями (Cloninger *et al*., 1996). Среди большого количества нейротрансмиттеров медиатор мозга серотонин (5-HT) вызывает особый интерес в связи с вовлечением в регуляцию множества физиологических функций и различных видов поведения. Многочисленными работами было показано, что нарушение работы серотониновой системы мозга может приводить к развитию таких видов психопатологии, как чрезмерная агрессия (Popova, 2006), депрессия (Lesch, 1997) и склонность к суициду (Arango *et al*., 2003).

Одним из личностных свойств человека является тревожность, которую можно определить как склонность к восприятию степени опасности окружающего мира. Высокотревожный человек воспринимает мир как потенциально опасный, несущий угрозу для его физического здоровья, социального статуса или психологического комфорта. Низкая тревожность проявляется как склонность к игнорированию потенциальных угроз. Интерес к тревожности в современной психологии вызван ее взаимосвязью с рядом психических и психосоматических расстройств, а также значительной ролью личностной тревожности в регуляции поведения здоровых людей. В модели Г. Айзенка тревожность рассматривается как один из субфакторов нейротизма, т. е. общей эмоциональной неустойчивости личности (Eysenck, 1990, 1991). Майкл Айзенк интерпретирует тревожность как свойство, снижающее эффективность системы произвольного внимания и увеличивающее чувствительность непроизвольного внимания к внешним стимулам, особенно связанным с какими-либо опасностями (Eysenck *et al*., 2007). При этом люди с повышенной тревожностью не обязательно менее успешны в решении задач. Высокотревожные люди способны повысить качество решения поведенческих задачах за счет усиления произвольного контроля над вниманием. Однако они вынуждены затрачивать на решение задач больше усилий, чем низкотревожные.

К настоящему времени проделана большая работа по выявлению биологических коррелятов тревожности. Установлена взаимосвязь между уровнем тревожности и особенностями мозговой активности, оцененными с помощью показателей ЭЭГ (Aftanas, Pavlov, 2005; Knyazev *et al*., 2008). Одним из наиболее активно изучаемых генетических маркеров широкого спектра психических расстройств, и тревожных

расстройств в частности, является серотониновый транспортер (5-HTT). Серотониновый транспортер осуществляет регуляцию силы и продолжительности действия серотонина на специфические рецепторы посредством обратного захвата нейротрансмиттера из синаптической щели (Blakely *et al*., 1994; Lesch, 1997). 5-HTT человека кодируется геном (*SLC6A4*), локализованным на 17-й хромосоме (Gelernter *et al*., 1995). У человека и обезьян промотор гена 5-HTT содержит расположенные в –1000 п.н. от сайта инициации транскрипции вариабельные повторы элементов длиной 22 п.н. (5-HTTLPR полиморфизм). Длинный аллель (L) состоит из 16, а короткий (S) из 14 повторов (Murphy *et al*., 2004). Было показано, что S-аллель связан со сниженной экспрессией гена в культуре клеток (Lesch *et al*., 1996) и с более высокой активностью миндалевидного тела в ответ на эмоциональные стимулы (Hariri *et al*., 2005; Dannlowski *et al*., 2008). Во многих работах показана связь полиморфизма 5-HTTLPR с тревожностью (Lesch *et al*., 1996; Greenberg *et al*., 2000), депрессией и биполярным расстройством (Collier *et al*., 1996; Gonda, Bagdy, 2006; Gonda, 2008; Karg *et al*., 2011), чувствительностью к антидепрессантам (Durham *et al*., 2004; Porcelli *et al*., 2012), риском депрессии и суицидом (Veenstra-VanderWeele *et al*., 2000; Kato, 2007).

Однако, несмотря на достаточно большое количество исследований, связь серотонинового транспортера с личностной тревожностью у здоровых людей, а также в механизмах адаптации к внешним условиям до сих пор остается невыясненной. Например, проведенный мета-анализ (Sen *et al*., 2004) показывает, что хотя значительная часть исследователей находят такую взаимосвязь, в других исследованиях ее не обнаруживают. В другом мета-анализе утверждается, что связь между транспортерами серотонина и уровнем тревожности либо отсутствует, либо очень слабая (Schinka *et al*., 2004). В нашем исследовании мы выдвигаем гипотезу о том, что взаимосвязь между генетически предопределенными особенностями транспортеров серотонина и уровнем личностной тревожности может существенно зависеть от условий внешней среды. Адаптация человека к определенному комплексу условий может модулировать поведенческий эффект серотониновой системы, что служит причиной в расхождении ранее опубликованных экспериментальных данных.

Кроме того, до сих пор остается предметом дискуссии отношение между тревожностью и таким личностным свойством, как агрессивность, а также их взаимосвязь с условиями внешней среды (Scarpa, Raine, 1997; Hatfield, Dula, 2014). Большинство исследователей приходит к выводу, что хотя тревожность и агрессивность являются базовыми биологическими свойствами личности, их проявления в существенной степени зависят от социальных условий жизни человека. Например, было показано, что связь между агрессивностью и тревожностью у подростков модерируется фактором пола (Слободская и др., 2008). При сравнении различных этнокультурных групп людей также обнаруживаются существенные различия как в проявлении личностных свойств, так и в их взаимодействии между собой (Iwata, Higuchi, 2000; McCrae *et al*., 2000). Существуют данные о том, что частота встречаемости различных генотипов в разных популяциях неодинакова; предполагают, что одни и те же молекулярно-генетические маркеры тревожности и агрессивности могут иметь существенно различный эффект в разных социальных группах (Balestri *et al*., 2014). Кроме того, этот эффект может поразному проявляться у мужчин и женщин.

Таким образом, на основе анализа литературных данных можно сделать вывод о том, что роль транспортеров серотонина в формировании уровня личностной тревожности остается к настоящему времени не до конца определенной. В частности, не известно, как взаимодействуют генетические и средовые факторы при формировании устойчивого индивидуального уровня тревожности в различных социо-культурных условиях. Также неясно, имеются ли различия в роли серотониновых транспортеров при формировании тревожности у мужчин и женщин, и если это так, то зависят ли эти различия от социальных факторов? К настоящему времени неизвестно, как генотипы, связанные с транспортерами серотонина, соотносятся с различными уровнями тревожности и агрессивности.

В нашем исследовании мы сосредоточились на исследовании взаимосвязи между полиморфными вариантами гена серотонинового транс-

портера и уровнем личностной тревожности у людей, относящихся к двум различным этническим группам: здоровых русскоговорящих жителей большого города Сибири, имеющих или получающих высшее образование, и сопоставимых по возрасту и состоянию здоровья двуязычных тувинцев, проживающих в столице Республики Тува г. Кызыле и обучающихся или работающих в университете.

Цель нашего исследования состояла в сравнении роли серотониновых транспортеров в формировании уровня личностной тревожности у русских и тувинцев.

Можно сформулировать следующие гипотезы:

1. Аллельный полиморфизм транспортеров серотонина ассоциирован с уровнем личностной тревожности.

2. Существуют различия в связи полиморфизма аллелей транспортера серотонина с уровнем тревожности у русских и тувинцев.

3. Взаимосвязи между полиморфизмом аллелей 5-HTT и тревожностью у лиц разного пола неодинаковы в разных культурах.

4. Существуют генетические особенности взаимосвязи между тревожностью и агрессивностью, которые модулируются социальными факторами.

ИСПЫТУЕМЫЕ И ПРОЦЕДУРЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследование было проведено у 57 испытуемых из г. Новосибирска (27 мужчин, 30 женщин, средний возраст 21,8 ± 2,6 года; здесь и далее показатели представлены в виде «групповое среднее ± стандартное отклонение среднего»), по преимуществу студентов различных вузов, и у 62 тувинцев из г. Кызыла, Республики Тува (32 мужчины, 32 женщины, средний возраст 20,9 ± 2,5 года), студентов или сотрудников Тувинского государственного университета.

Перед проведением обследования все испытуемые давали письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с этическими требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследования был утвержден на заседании локального этического комитета ИЦиГ СО РАН.

У всех испытуемых были взяты пробы крови (объемом 30 мл) для последующего выделения ДНК и оценки частот полиморфных вариантов 5-HTT гена.

Все испытуемые заполняли комплект психологических опросников, который включал русскую версию опросника Спилбергера на личностную и ситуативную тревожность (перевод и адаптация: Ханин, 1976), переведенный на русский язык опросник Грея–Уилсона на определение уровня BAS (behavioral activation system, система активации поведения) и BIS (behavioral inhibition system, система торможения поведения) (Slobodskaya *et al*., 2001), русскую версию теста Басса–Перри на определение уровня агрессивности (Ениколопов, Цибульский, 2007).

Кроме того, все испытуемые проходили тестирование при помощи комплекта ассоциативных имплицитных тестов (Egloff, Schmukle, 2002), русская версия которых была разработана Г.Г. Князевым (Knyazev *et al*., 2008). При имплицитном тестировании на экране компьютера появлялись сочетания прилагательных и местоимений, которые относили одно из тестируемых личностных свойств (отдельно тревожность, агрессивность или импульсивность) либо к самому испытуемому (например, сочетание «я тревожный»), либо к другим людям («они тревожные»). Испытуемый должен был реагировать на появление словосочетаний нажатием на одну из двух кнопок в соответствии с типом словосочетания. Уровень имплицитной тревожности, агрессивности или импульсивности определялся как коэффициент, зависящий от разницы в скорости реакций на словосочетания, описывающие один и тот же признак, но относящиеся или к самому испытуемому, или к другим людям.

Все тестовые задания как при эксплицитном, так и при имплицитном тестировании предъявлялись только на русском языке в связи с отсутствием валидизированных тестов на тувинском языке и хорошим знанием русского языка у испытуемых-тувинцев.

Геномная ДНК была выделена при помощи набора для выделения ДНК из проб крови («Биосилика», Россия). Частоты короткого (S) и длинного (L) аллелей гена, кодирующего транспортер серотонина, были определены

при помощи аллель-специфичной ПЦР с использованием 5′-ggcgttgccgctctgaattgc-3′ или 5′-gagggactgagctggacaacccac-3′ праймеров (Lesch *et al*., 1996) и геномной ДНК испытуемых в качестве матрицы. Продукты ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 3 %-м агарозном геле.

Частоту полиморфных аллелей и генотипов в двух группах испытуемых сравнивали при помощи критерия χ^2.

Для оценки взаимосвязи между личностными свойствами вычислялись пирсоновские парные двухсторонние корреляции без учета факторов этнической принадлежности, пола или генотипа.

Затем для определения роли факторов генотипа, этнической принадлежности, пола и их взаимодействия для каждого личностного свойства использовалась одномерная общая линейная модель (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами обнаружены достоверные различия в частотах полиморфных аллелей гена серотонинового транспортера в группах испытуемых из Новосибирска и Кызыла. Частота L-аллеля была 61 %-й в новосибирской группе и 30 %-й в тувинской группе, тогда как частота S-аллеля была 39 %-й в новосибирской группе и 70 %-й в тувинской группе (имелись две степени свободы, граничное значение для двух степеней свободы – больше 5,99; между группами $\chi^2 = 20{,}9$). Всего в новосибирской группе было 23 носителя генотипа LL, 24 – LS и 10 – SS. В тувинской группе было 7 человек с генотипом LL, 23 – с LS, и 32 – с генотипом SS.

Корреляции между показателями различных психологических тестов приведены в таблице.

Одномерная общая линейная модель (ANOVA) с факторами «этнической принадлежности» (новосибирская или тувинская группа), пола (мужской или женский) и «генотипа» (генотипы LL, LS и SS) была использована для показателей имплицитных тревожности, агрессивности и импульсивности, определенных при помощи ассоциативных тестов. Достоверное значение главного эффекта фактора генотипа было выявлено для показателя имплицитной тревожности, $F(2; 107) = 3{,}13$, $p = 0{,}048$ (см. рис. 1, а). Значения имплицитной тревожности были максимальны у людей с генотипом SS (–0,1 ± 0,06), при генотипе LS уровень тревожности был ниже (–0,2 ± 0,04) и самый низкий уровень тревожности был найден у людей с генотипом LL (–0,3 ± 0,06). Метод контрастов выявил, что люди с генотипами LL и SS достоверно ($p = 0{,}014$) различались по уровню имплицитной тревожности, тогда как люди с генотипами LS достоверно не отличались от двух других групп ($p > 0{,}1$). Главные эффекты факторов пола ($p > 0{,}6$) и этнической принадлежности ($p > 0{,}1$) для имплицитной тревожности были не достоверны, а взаимодействие факторов этнической принадлежности и генотипа было маргинальным $F(2, 107) = 2{,}57$, $p = 0{,}081$. Средний уровень тревожности был ниже в тувинской группе, чем в новосибирской, однако различия не достигли достоверных значений. Для имплицитных агрессивности и импульсивности все рассмотренные эффекты и их взаимодействия были недостоверными.

Одномерная общая линейная модель с теми же факторами была использована и для показателей эксплицитной тревожности, определяемых при помощи опросника Спилбергера–Ханина. Так же, как и для имплицитной, для эксплицитной тревожности был выявлен достоверный главный эффект генотипа $F(2; 107) = 5{,}00$, $p = 0{,}008$ (см. рис. 1, б). Значения эксплицитной тревожности были максимальны у людей с генотипом SS (29,3 ± 1,98), при генотипе LS уровень тревожности был ниже (22,9 ± 1,37) и самый низкий уровень тревожности был найден у людей с генотипом LL (22,4 ± 2,15). Метод контрастов выявил, что люди с генотипами SS достоверно ($p = 0{,}020$) различались от двух других групп по уровню эксплицитной тревожности, тогда как люди с генотипами LL и LS достоверно не отличались между собой ($p > 0{,}8$). Таким образом, главный эффект генотипа был однотипным для имплицитной и эксплицитной тревожности. Однако для эксплицитной тревожности были обнаружены достоверный главный эффект пола $F(1, 107) = 6{,}73$, $p = 0{,}011$ (см. рис. 2, а) и взаимодействия факторов пола и этнической принадлежности $F(1, 107) = 4{,}68$, $p = 0{,}033$ (см. рис. 3, а), факторов генотипа и этнической принадлежности $F(2, 107) = 4{,}26$, $p = 0{,}017$,

Таблица

Парные пирсоновские двусторонние корреляции между показателями различных психологических тестов

Личностные свойства	BAS	BIS	Шкала гнева	Физическая агрессия	Враждебность	Вербальная агрессия	Эксплицитная личностная тревожность	Имплицитная тревожность	Имплицитная агрессивность	Имплицитная импульсивность
BAS. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	1 119	0,18 0,052 119	**0,22*** **0,020** **116**	**0,26**** **0,005** **116**	0,11 0,227 116	–0,04 0,661 116	**0,23*** **0,014** **119**	–0,01 0,989 119	**–0,19*** **0,042** **119**	–0,044 0,636 119
BIS. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	0,18 0,052 119	1 119	**0,40**** **0,000** **116**	0,10 0,300 116	**0,21*** **0,025** **116**	–0,09 0,333 116	**0,50**** **0,000** **119**	0,06 0,551 119	0,05 0,562 119	0,06 0,521 119
Шкала гнева. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	**0,22*** **0,020** **116**	**0,40**** **0,000** **116**	1 116	**0,25**** **0,007** **116**	**0,48**** **0,000** **116**	**0,33**** **0,000** **116**	**0,44**** **0,000** **116**	–0,04 0,648 116	–0,06 0,499 116	0,07 0,429 116
Физическая агрессия. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	**0,26**** **0,005** **116**	0,10 0,300 116	**0,25**** **0,007** **116**	1 116	**0,42**** **0,000** **116**	**0,23*** **0,015** **116**	0,10 0,28 116	0,00 0,999 116	0,03 0,77 116	–0,18 0,05 116
Враждебность. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	0,11 0,23 116	**0,21*** **0,025** **116**	**0,48**** **0,000** **116**	**0,42**** **0,000** **116**	1 116	**0,30**** **0,001** **116**	**0,36**** **0,000** **116**	–0,09 0,345 116	0,04 0,685 116	–0,05 0,602 116
Вербальная агрессия. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	–0,04 0,661 116	–0,09 0,333 116	**0,33**** **0,000** **116**	**0,23*** **0,015** **116**	**0,30**** **0,001** **116**	1 116	-0,02 0,843 116	**–0,18*** **0,048** **116**	0,01 0,915 116	–0,10 0,912 116
Эксплицитная личностная тревожность. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	0,23* 0,014 119	**0,50**** **0,000** **119**	**0,44**** **0,000** **116**	0,10 0,276 116	**0,36**** **0,000** **116**	–0,02 0,843 116	1 119	0,08 0,363 119	0,08 0,366 119	0,01 0,912 119
Имплицитная тревожность. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	–0,01 0,989 119	0,06 0,551 119	–0,04 0,648 116	0,00 0,999 116	–0,09 0,345 116	**–0,18*** **0,048** **116**	0,08 0,363 119	1 119	**0,30**** **0,001** **119**	**0,26**** **0,004** **119**
Имплицитная агрессивность. Корреляции Пирсона Знч. (2-сторон) N	**–0,19*** **0,042** **119**	0,05 0,562 119	–0,06 0,499 116	0,03 0,77 116	0,04 0,685 116	0,01 0,915 116	0,08 0,366 119	**0,30**** **0,001** **119**	1 119	0,04 0,703 119

* Корреляция значима на уровне 0,05 (двусторонняя). ** Корреляция значима на уровне 0,01 (двусторонняя).

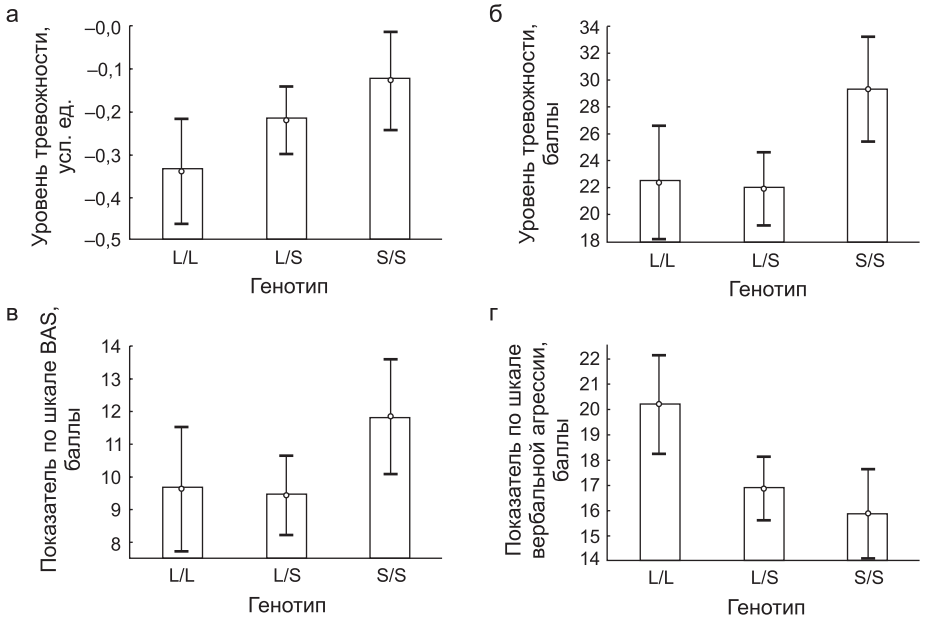


Рис. 1. Влияние фактора генотипа на уровень личностной тревожности, склонность к вербальной агрессии и активность BAS.

На графиках показана связь между генотипом испытуемых и уровнем личностной тревожности, измеренным имплицитным (а) и эксплицитным (б) методами; активностью системы активации поведения (в) и склонностью к вербальной агрессии (г). Вертикальными полосами отмечены 95 %-е доверительные интервалы.

Fig. 1. The influence of the genotype factor on the personal anxiety level, propensity to verbal aggression and the activity of BAS.

The relationships between personal genotype and the level of personal anxiety were measured by (a) implicit and (b) explicit methods; c – the activity of the behavioral activation system; d – the propensity to verbal aggression. Vertical lines mark 95 % confidence intervals.

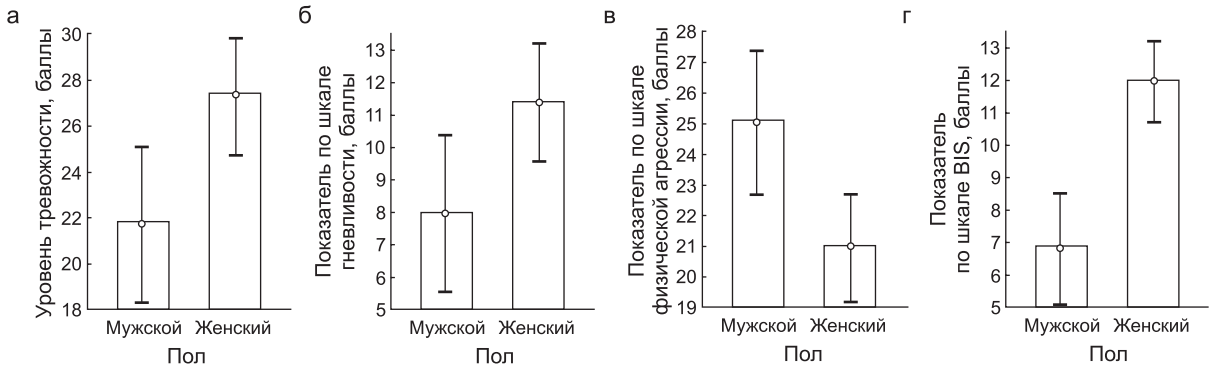


Рис. 2. Влияние фактора пола на уровень личностной тревожности, склонность к гневу и физической агрессии и активность BIS.

На графиках показана связь между полом испытуемых и уровнем личностной тревожности, измеренным эксплицитным методом (а); склонностью к гневу (б) и физической агрессии (в) и активностью системы торможения поведения (г). Вертикальными полосами отмечены 95 %-е доверительные интервалы.

Fig. 2. The influence of the gender factor on the level of personal anxiety, the propensity to anger, physical aggression, and the activity of the behavioral inhibition system.

Associations of gender with (a) the level of personal anxiety measured by explicit method; (b) the propensity to anger; (c) the propensity to physical aggression, and (d) BIS activity. Vertical lines mark 95 % confidence intervals.

факторов пола и генотипа F(2, 107) = 2,85, p = 0,023, отсутствовавшие для имплицитной тревожности. При сравнении мужчин и женщин в полной выборке было показано, что тревожность у женщин (27,3 ± 1,27) выше, чем у мужчин (21,7 ± 1,27). Однако при разделении выборок по этническому критерию различия между мужчинами и женщинами в новосибирской выборке отсутствовали (мужчины: 25,9 ± 2,48; женщины: 26,9 ± 1,69; $p > 0,9$), тогда как достоверные гендерные различия были найдены в тувинской выборке (мужчины: 17,6 ± 2,43; женщины: 27,8 ± 1,89; $p < 0,0001$). Также были найдены маргинальные значения главного эффекта этнической принадлежности F(1, 107) = 2,97, p = 0,088 и взаимодействия факторов пола, генотипа и этнической принадлежности F(2, 107) = 2,85, p = 0,062.

Поскольку факторы этнической принадлежности и генотипа достоверно взаимодействовали с фактором пола, был проведен анализ их влияния на уровень эксплицитной тревожности независимо для мужчин и женщин. В группе мужчин были найдены достоверные главные эффекты факторов этнической принадлежности F(1, 53) = 7,29, p = 0,009; генотипа F(2, 53) = 5,48, p = 0,007 и их взаимодействия F(2, 53) = 3,28, p = 0,045 (см. рис. 3, б). У новосибирских мужчин уровень эксплицитной тревожности (25,9 ± 2,21) был выше, чем у тувинских мужчин (17,6 ± 2,17). Носители разных генотипов в полной выборке мужчин достоверно различались по уровню тревожности. Значения эксплицитной тревожности были максимальны у мужчин с генотипом SS (29,3 ± 3,08), мужчины с генотипом LS показали меньший уровень тревожности (20,9 ± 1,58) и самый низкий уровень тревожности был найден у мужчин с генотипом LL (15,0 ± 3,10). Метод контрастов выявил достоверные ($p < 0,05$) различия между всеми тремя генотипически различными группами мужчин. При этом сравнение между новосибирской и тувинской выборками для носителей разных генотипов показало, что уровень эксплицитной тревожности достоверно различается только у мужчин с генотипом SS (новосибирская группа: 39,0 ± 5,78; тувинская группа: 19,6 ± 2,11; $p < 0,0001$), тогда как мужчины-носители генотипов LL и LS не показали межэтнических различий.

В группе женщин эффект этнической принадлежности был недостоверен ($p > 0,74$), главный эффект генотипа был маргинален F(2, 54) = 2,63, p = 0,081, а взаимодействие эффектов этнической принадлежности на гено-

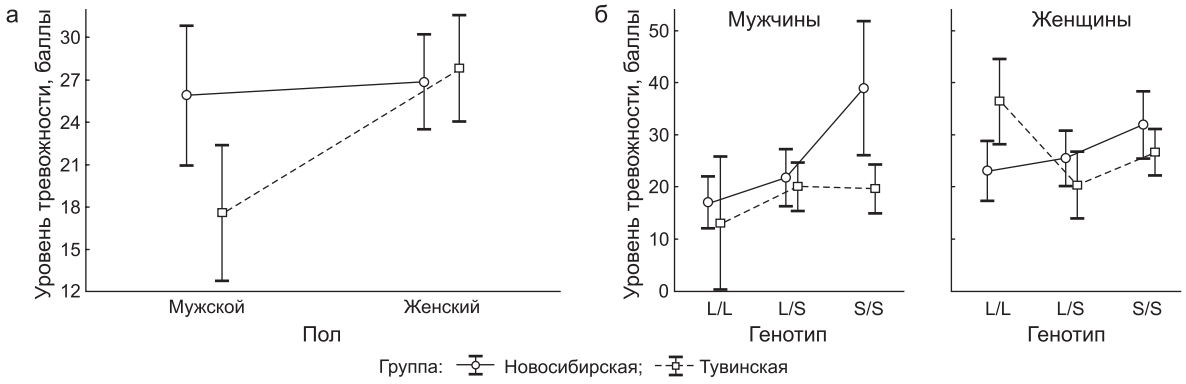


Рис. 3. Взаимодействие факторов пола, группы и генотипа в их влиянии на уровень личностной тревожности испытуемых.

На графиках показано взаимодействие факторов группы и пола (а) и группы, пола и генотипа (б) в их влиянии на уровень личностной тревожности, измеренный эксплицитным методом. Сплошной лин ией на обоих графиках обозначена новосибирская группа, пунктирной – тувинская. Вертикальными полосами отмечены 95 %-е доверительные интервалы.

Fig. 3. The interaction of gender, group, and genotype factors in their influence on the personal anxiety level.

The plots show the interaction of factors (a) group and gender and (b) group, gender and genotype in their influence on personal anxiety level measured by explicit method. The Novosibirsk group is marked by a solid line, the Tuvinian group, by a dashed line. Vertical lines mark 95 % confidence intervals.

тип было достоверно $F(2, 54) = 4{,}29$, $p = 0{,}019$ (см. рис. 3, б). Достоверные межэтнические различия по уровню эксплицитной тревожности были найдены только между женщинами с генотипом LL ($p = 0{,}023$). Новосибирские женщины с таким генотипом были менее тревожны (23,1 ± 3,18) по сравнению с тувинскими женщинами (26,6 ± 2,44). Женщины с генотипами LS и SS не показали межэтнических различий по уровню тревожности.

При разбиении групп по критерию генотипа у носителей генотипа LL были выявлены достоверные гендерные различия $F(1, 26) = 11{,}14$, $p = 0{,}003$, но не было выявлено межэтнических различий. У женщин с таким генотипом (29,7 ± 2,58) тревожность была выше, чем у мужчин с таким же генотипом (15,0 ± 3,58). У носителей генотипа SS были выявлены межэтнические $F(1, 38) = 10{,}1$, $p = 0{,}003$, но не гендерные различия. У людей из новосибирской группы (35,5 ± 3,54) тревожность была выше, чем у тувинцев (23,13 ± 1,59). Носители генотипа LS не показали ни гендерных, ни межэтнических различий, ни их взаимодействия.

Одномерная общая линейная модель с факторами «этнической принадлежности», пола и «генотипа» была использована для показателей эксплицитных индексов BAS и BIS. Для показателей BAS выявлен достоверный эффект фактора этнической принадлежности $F(1, 107) = 12{,}9$, $p < 0{,}0001$. Этот показатель у представителей новосибирской группы был значительно выше (12.0 ± 0,67), чем у представителей тувинской группы (8,6 ± 0,68). Также был выявлен маргинальный эффект фактора генотипа $F(2, 107) = 2{,}68$, $p = 0{,}073$ (см. рис. 1, в). Носители генотипа SS показали более высокие значения BAS по сравнению с носителями генотипов LS и LL, но эти различия не достигли уровня достоверности. Для показателей BIS выявлены достоверный главный эффект фактора пола $F(1, 107) = 22{,}79$, $p < 0{,}0001$ (см. рис. 2, г) и маргинальное взаимодействие между факторами пола и генотипа $F(2, 107) = 1{,}15$, $p = 0{,}061$. Женщины показали более высокие индексы BIS (12,0 ± 0,64) по сравнению с мужчинами (6,8 ± 0,87), что было сильнее выражено в группе носителей генотипа LL.

Такая же статистическая модель была использована для различных показателей эксплицитной агрессивности, выявляемых при помощи опросника Басса–Перри. Достоверные значения главного эффекта фактора пола были выявлены для показателей шкалы гнева $F(1, 104) = 5{,}10$, $p = 0{,}026$ (см. рис. 2, б) и склонности к физической агрессии $F(1, 104) = 7{,}59$, $p < 0{,}007$ (см. рис. 2, в). Мужчины по сравнению с женщинами показали более высокую склонность к физической агрессии (25,0 ± 1,19 vs. 21,0 ± 0,89), но меньшую склонность к проявлению гнева (17,5 ± 1,00 vs. 20,3 ± 0,75). Факторы генотипа и этнической принадлежности для этих шкал агрессивности были недостоверны. Показатели по шкале враждебности не дали никаких достоверных эффектов пола, генотипа или этнической принадлежности или их взаимодействий. Для показателя склонности к вербальной агрессии был выявлен достоверный главный эффект генотипа $F(1, 104) = 5{,}89$, $p = 0{,}004$ (см. рис. 1, г). Склонность к проявлению вербальной агрессии была выше у носителей генотипа LL (20,2 ± 0,98) по сравнению с носителями генотипов LS (16,9 ± 0,63) и SS (15,9 ± 0,89). Метод контрастов показал, что носители генотипа LL отличаются одновременно и от носителей LS, и от носителей SS генотипов ($p = 0{,}002$), тогда как люди с генотипами LS и SS по этому показателю между собой не различаются ($p > 0{,}37$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Частота генотипа SS была достоверно выше в тувинской группе, чем в группе испытуемых из Новосибирска. Этот факт соответствует хорошо известным данным о том, что вероятность встречаемости аллеля S- значительно выше в регионах восточной Азии, тогда как аллель L- чаще встречается у населения Европы (Kunugi *et al*., 1997; Noskova *et al*., 2008). Наши результаты показали, что по частоте встречаемости полиморфных аллелей транспортера серотонина русские соответствуют западным европейцам, а тувинцы – жителям азиатских стран, что является тривиальным фактом.

Главный эффект генотипа был статистически достоверен для показателей личностной тревожности, определенных как при имплицитном, так и при эксплицитном тестировании, и для показателя склонности к вербальной агрессии.

Как упоминалось в обсуждении, часть исследователей обнаруживает взаимосвязь между серотониновыми транспортерами и тревожностью (Sen *et al*., 2004), а другие исследователи преимущественно не находят такой взаимосвязи (Schinka *et al*., 2004). Соответственно наши данные поддерживают те исследования, которые устанавливают взаимосвязь между полиморфизмом 5-HTT аллелей и личностной тревожностью.

Однако нами также выявлены сложные многофакторные зависимости эффектов 5-HTT генотипа от пола, этнической принадлежности и способа тестирования тревожности. При имплицитном тестировании уровня тревожности эффекты пола и этнической принадлежности, а также их взаимодействие оказались недостоверными. При эксплицитном тестировании, напротив, выявились сложные взаимоотношения между всеми этими параметрами, генотипом и тревожностью. В целом тревожность была выше для женщин, чем для мужчин, что соответствует ранее известным данным (Egloff, Schmukle, 2004). Однако гендерные различия в уровне тревожности зависели от этнической принадлежности. В новосибирской группе женщины лишь незначительно отличались от мужчин по уровню тревожности, тогда как у тувинцев мужчины имели значительно меньший уровень эксплицитной тревожности, чем женщины.

Нами обнаружено, что эффект генотипа на уровень тревожности сильно различался у мужчин и женщин из разных этнических групп. Такие различия могут быть объяснены через сравнение «традиционного» и «модернистского» культурных стереотипов. В традиционной культуре проявление страха и тревоги у мужчин оценивается обществом негативно, считается позорным и наказывается, тогда как в модернистской западной культуре к таким проявлениям относятся более лояльно. Поэтому тувинские мужчины с генотипом SS, который у русских обоего пола и у тувинских женщин ассоциирован с максимальной тревожностью, показали наименьший уровень эксплицитной тревожности. Такой эффект не наблюдался при имплицитном, подсознательном тестировании уровня тревоги. Фактически такие мужчины продемонстрировали «тревогу показаться тревожными». Можно допустить, что ранее упомянутые расхождения в интерпретации роли серотониновых транспортеров в формировании уровня личностной тревожности у здоровых испытуемых связаны с тем, что разные исследователи подбирали выборки без учета их ценностно-культурных особенностей. При разных сочетаниях «традиционалистов» и «модернистов» в исследуемых выборках могут получиться любые варианты зависимости между транспортерами серотонина и уровнем тревожности.

По различным показателям агрессивности не было обнаружено каких-либо значимых межэтнических различий. Таким образом, социальные проблемы, наблюдаемые в Туве, такие как высокий показатель травматизма и преступности (Россия, 2013), не могут быть непосредственно объяснены высоким уровнем агрессивности тувинцев. Вероятнее всего, объяснение этих проблем может относиться к области контроля над поведением. Генетический эффект был высокодостоверен только для шкалы вербальной агрессии. Высокая вербальная агрессия была свойственна для группы людей (генотип LL), у которых наблюдалась наименьшая личностная тревожность. Можно предположить, что взаимодействие факторов тревожности и агрессивности будет зависеть от аллельного полиморфизма серотониновых транспортеров и по-разному проявляться у людей с разным генотипом. Кроме того, выявилась статистическая тенденция к наличию взаимосвязи между полиморфными вариантами серотонинового транспортера и общим уровнем BAS (систем активации поведения). Также была выявлена достоверная корреляция между уровнем тревожности и BAS. Нам не удалось найти в литературе прямых исследований связи между 5-HTT и уровнем BAS, а также между генотипом и вербальной агрессивностью. Можно гипотетически допустить, что взаимодействие факторов тревожности, агрессивности и BAS в регуляции поведения зависит от генетических особенностей испытуемых, различающихся по транспортерам серотонина. В настоящее время эти взаимосвязи остаются неясными и требуют более детальных исследований.

В целом поведенческий эффект полиморфных вариантов гена серотонинового транспорте-

ра может быть объяснен на основе теории контроля внимания (Eysenck *et al*., 2007). Согласно этой теории, существуют индивидуальные различия между здоровыми людьми в способности направлять внимание к определенным объектам внешнего мира или к собственным переживаниям. В литературе имеются данные, что носители генотипа LL обладают лучшими способностями к контролю внимания, чем носители генотипа SS (Geurts *et al*., 2013). По нашим данным, носители генотипа LL больше предпочитают реагировать на конфликтные ситуации вербально, но при этом они стремятся к поощрению меньше, чем носители SS. Носители LL показали меньшую склонность к физической агрессии, чем носители SS, хотя эти различия были статистически незначимы. Можно гипотетически предположить, что носители LL лучше контролируют свое поведение в конфликтных ситуациях и предпочитают разрешать их за счет вербальной, а не физической агрессии. Влияние генотипа на уровень тревожности модулируется гендерными ролями, принятыми в разных социумах. Тувинские женщины с генотипом LL демонстрируют повышенный уровень тревожности при эксплицитном, но не имплицитном тестировании, тувинские мужчины с генотипом SS, наоборот, подавляют внешние симптомы тревоги, а русские носители генотипа LL имеют наименьшую степень тревожности вне зависимости от пола. Таким образом, проявление генетически определенной общей способности к самоконтролю поведения меняется в зависимости от того, какое поведение поощряется либо осуждается в определенной человеческой культуре.

В заключение можно сделать выводы, что роль полиморфизма аллелей транспортеров серотонина в формировании уровня личностной тревожности в существенной степени модулируется дополнительными факторами, к которым, в частности, относится пол и социокультурная принадлежность. Можно также допустить сложные многофакторные взаимодействия между генетическими эффектами на уровень тревожности и другими личностными свойствами, такими как различные формы проявления агрессивности, склонность к получению награды или к избеганию наказаний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке проекта партнерских фундаментальных исследований СО РАН (проект № 87). Компьютерный анализ и интерпретация данных частично выполнены при поддержке бюджетного проекта VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

Ениколопов С.Н., Цибульский Н.П. Психометрический анализ русскоязычной версии опросника диагностики агрессии А. Басса и М. Перри // Психол. журнал. 2007. № 1(28). С. 115–125.
Enikolopov S.N., Cybulsky N.P. Psychometric analysis of the Russian version of questionnaire for diagnostic of aggression by A. Buss and M. Perry // Psikhologicheskii Zhurnal. 2007. No. 1(28). P. 115–125. (In Russian).

Россия 2013. Статистический справочник. М.: Росстат, 2013. 62 с.
Russia 2013. Statistical manual. Moscow: Rosstat, 2013. 62 p. (In Russian).

Слободская Е.Р., Бочаров А.В., Рябиченко Т.И. Взаимодействие агрессивного поведения и тревожности в процессе приспособления подростков: роль фактора пола // Сиб. психол. журнал. 2008. № 29. С. 32–36.
Sloboskaya E.R., Bocharov A.V., Ryabichenko T.I. Interaction of aggressive behavior and anxiety in the process of adaptation of teenagers: role of gender factor // Sibirskii Psikhologicheskii Zhurnal. 2008. No. 29. P. 32–36. (In Russian).

Ханин Ю.Л. Краткое руководство к шкале реактивной и личностной тревожности Ч.Д. Спилбергера. Л.: ЛНИИФК, 1976. 18 с.
Khanin Yu.L. Quick guide to C.D. Spielberger's scale of reactive and personal anxiety. Leningrad: LNIIFK, 1976. 18 p. (In Russian).

Aftanas L.I., Pavlov S.V. Trait anxiety impact on posterior activation asymmetries at rest and during evoked negative emotions: EEG investigation // Int. J. Psychophysiol. 2005. V. 55. No. 1. P. 85–94.

Arango V., Huang Y.Y., Underwood M.D., Mann J.J. Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior // J. Psychiatr. Res. 2003. V. 37. P. 375–386.

Balestri M., Calati R., Serretti A., De Ronchi D. Genetic modulation of personality traits: a systematic review of the literature // Int. Clin. Psychopharmacol. 2014. V. 29. No. 1. P. 1–15.

Blakely R.D., De Felice L.J., Hartzell H.C. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters // J. Exp. Biol. 1994. V. 196. P. 263–281.

Boerebach B.C., Scheepers R.A., van der Leeuw R.M., Heineman M.J., Arah O.A., Lombarts K.M. The impact of clinicians' personality and their interpersonal behaviors on the quality of patient care: a systematic review // Int. J. Qual. Health. Care. 2014. V. 26. No. 4. P. 426–481.

Cloninger C.R., Adolfsson R., Svrakic N.M. Mapping genes for human personality // Nat. Genet. 1996. V. 12. No. 1. P. 3–4.

Collier D.A., Stober G., Li T., Heils A., Catalano M., Di Bella D., Arranz M.J., Murray R.M., Vallada H.P., Bengel D., Muller C.R., Roberts G.W., Smeraldi E., Kirov G., Sham P., Lesch K.P. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders // Mol. Psychiatry. 1996. V. 1. P. 453–460.

Dannlowski U., Ohrmann P., Bauer J., Deckert J., Hohoff C., Kugel H., Arolt V., Heindel W., Kersting A., Baune B.T., Suslow T. 5-HTTLPR biases amygdala activity in response to masked facial expressions in major depression // Neuropsychopharmacology. 2008. V. 33. P. 418–424.

Durham L.K., Webb S.M., Milos P.M., Clary C.M., Seymour A.B. The serotonin transporter polymorphism, 5HTTLPR, is associated with a faster response time to sertraline in an elderly population with major depressive disorder // Psychopharmacology. 2004. V. 174. P. 525–529.

Ebstein R.P. The molecular genetic architecture of human personality: beyond self-report questionnaires // Mol. Psychiatry. 2006. V. 11. No. 5. P. 427–445.

Egloff B., Schmukle S.C. Predictive validity of an implicit association test for assessing anxiety // J. Pers. Soc. Psychol. 2002. V. 83. No. 6. P. 1441–1455.

Egloff B., Schmukle S.C. Gender differences in implicit and explicit anxiety measures // Pers. Individ. Differ. 2004. V. 36. No. 8. P. 1807–1815.

Eysenck H. Biological dimensions of personality // Handbook of Personality: Theory and Research / Ed. L.A. Pervin. N.Y.: Guilford, 1990. P. 244–276.

Eysenck H. Dimensions of personality: 16, 5 or 3? Criteria for a taxonomic paradigm // Pers. Individ. Differ. 1991. V. 12. No. 8. P. 773–790.

Eysenck M.W., Derakshan N., Santos R., Calvo M.G. Anxiety and cognitive performance: attentional control theory // Emotion. 2007. V. 7. No. 2. P. 336–356.

Eysenck H.J., Wilson G.D., Jackson C.J. Manual of the Eysenck Personality Profiler. Guildford: Psi-Press, 2000. 56 p.

Gardini S., Cloninger C.R., Venneri A. Individual differences in personality traits reflect structural variance in specific brain regions // Brain Res. Bull. 2009. V. 79. No. 5. P. 265–270.

Gelernter J., Pakstis A.J., Kidd K.K. Linkage mapping of serotonin transporter protein gene SLC6A4 on chromosome 17 // Hum. Genet. 1995. V. 95. P. 677–680.

Geurts D.E., Huys Q.J., den Ouden H.E., Cools R. Serotonin and aversive Pavlovian control of instrumental behavior in humans // J. Neurosci. 2013. V. 33. No. 48. P. 18932–18939.

Gonda X. The serotonin transporter gene and personality: association of the 5-HTTLPR s allele, anxiety, depression and affective temperaments // Hung. Med. J. 2008. V. 2. No. 4. P. 639–645.

Gonda X., Bagdy G. Relationship between serotonin transporter gene 5HTTLPR polymorphism and the symptoms of neuroticism in a healthy population // Psychiatr. Hung. 2006. V. 21. No. 5. P. 379–385.

Greenberg B.D., Li Q., Lucas F.R., Hu S., Sirota L.A., Benjamin J., Lesch K.P., Hamer D., Murphy D.L. Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample // Am. J. Med. Genet. 2000. V. 96. P. 202–216.

Hariri A.R., Drabant E.M., Munoz K.E., Kolachana B.S., Mattay V.S., Egan M.F., Weinberger D.R. A susceptibility gene for affective disorders and the response of the human amygdala // Arch. Gen. Psychiatry. 2005. V. 62. P. 146–152.

Hatfield J., Dula C.S. Impulsivity and physical aggression: examining the moderating role of anxiety // Am. J. Psychol. 2014. V. 127. No. 2. P. 233–243.

Iwata N., Higuchi H.R. Responses of Japanese and American university students to the STAI items that assess the presence or absence of anxiety // J. Per. Assess. 2000. V. 74. No. 1. P. 48–62.

Karg K., Burmeister M., Shedden K., Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation // Arch. Gen. Psychiatry. 2011. V. 68. P. 444–454.

Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder and depression // Psychiatry Clin. Neurosci. 2007. V. 61. P. 3–19.

Knyazev G.G., Bocharov A.V., Levin E.A., Savostyanov A.N., Slobodskoj-Plusnin J.Y. Anxiety and oscillatory responses to emotional facial expressions // Brain Res. 2008. V. 1227. P. 174–188.

Kunugi H., Hattori M., Kato T., Tatsumi M., Sakai T., Sasaki T., Hirose T., Nanko S. Serotonin transporter gene polymorphisms: ethnic difference and possible association with bipolar affective disorder // Mol. Psychiatry. 1997. V. 2. No. 6. P. 457–462.

Lesch K.P. Molecular biology, pharmacology, and genetics of the serotonin transporter: psychobiological and clinical implications // Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS / Eds H.G. Baumgarten, M. Gothert. N.Y.: Springer, 1997. P. 671–705.

Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Müller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region // Science. 1996. V. 274. No. 5292. P. 1527–1531.

McCrae R.R., Costa P.T. Jr., Ostendorf F., Angleitner A., Hrebícková M., Avia M.D., Sanz J., Sánchez-Bernardos M.L., Kusdil M.E., Woodfield R., Saunders P.R., Smith P.B. Nature over nurture: temperament, personality, and life span development // J. Pers. Soc. Psychol. 2000. V. 78. No. 1. P. 173–186.

Miller J.D., Lynam D.R. Psychopathy and the Five-factor model of personality: a replication and extension // J. Pers. Assess. 2003. V. 81. No. 2. P. 168–178.

Murphy D.L., Lerner A., Rudnick G., Lesch K.P. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics // Mol. Interv. 2004. V. 4. P. 109–123.

Noskova T., Pivac N., Nedic G., Kazantseva A., Gaysina D., Faskhutdinova G., Gareeva A., Khalilova Z., Khusnutdinova E., Kovacic D.K., Kovacic Z., Jokic M., Seler D.M. Ethnic differences in the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) in several European populations // Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2008. V. 32. No. 7. P. 1735–1739.

Popova N.K. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system // Bioessays. 2006. V. 28. P. 495–503.

Porcelli S., Fabbri C., Serretti A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy // Eur. Neuropsychopharmacol. 2012. V. 22. P. 239–258.

Scarpa A., Raine A. Psychophysiology of anger and violent behavior // Psychiatr. Clin. North Am. 1997. V. 20. No. 2. P. 375–394.

Schinka J.A., Busch R.M., Robichaux-Keene N. A meta-analysis of the association between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and trait anxiety // Mol. Psychiatry. 2004. V. 9. No. 2. P. 197–202.

Schnabel K., Banse R., Asendorpf J.B. Assessment of implicit personality self-concept using the implicit association test (IAT): concurrent assessment of anxiousness and angriness // Brit. J. Soc. Psychol. 2006. V. 45. No. 2. P. 373–396.

Sen S., Burmeister M., Ghosh D. Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits // Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr Genet. 2004. V. 127B. No. 1. P. 85–89.

Slobodskaya H.R., Safronova M.V., Knyazev G.G., Wilson G.D. Reactions of Russian adolescents to reward and punishment: a cross-cultural study of the Gray–Wilson Personality Questionnaire // Personality and Individual Differences. 2001. V. 1. No. 7. P. 1211–1224.

Teige S., Schnabel K., Banse R., Asendorpf J.B. Assessment of multiple implicit self-concept dimensions using the extrinsic affective Simon task (EAST) // Europ. J. Pers. 2004. V. 18. No. 6. P. 495–520.

Veenstra-VanderWeele J., Anderson G.M., Cook E.H., Jr. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions // Eur. J. Pharmacol. 2000. V. 410. P. 165–181.

ASSOCIATION OF ANXIETY LEVEL WITH POLYMORPHIC VARIANTS OF THE SEROTONIN TRANSPORTER GENE IN RUSSIANS AND TUVINIANS

A.N. Savostyanov[1, 5, 6], V.S. Naumenko[2], N.A. Sinyakova[2], M.N. L'vova[2], E.A. Levin[4], M.S. Zaleshin[5], U.N. Kavay-ool[3], V.A. Mordvinov[2], N.A. Kolchanov[2], L.I. Aftanas[1]

[1] State Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine SB RAMS, Novosibirsk, Russia, e-mail: alexander.savostyanov@gmail.com;
[2] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
[3] Tuvan State University, Kyzyl, Tyva Republic, Russia;
[4] Academician E.N. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk, Russia;
[5] National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia;
[6] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The association of the anxiety level trait with polymorphic variants of the serotonin transporter (5-HTT) gene was studied in 57 Russians and 62 Tuvinians. Polymorphic variants of the 5-HTT gene were identified by allele-specific PCR with DNA extracted from the blood of the subjects. The level of explicit anxiety was measured by the Spielberger–Khanin test, and implicit anxiety, by the associative implicit test. Additionally, the indices of aggressiveness, impulsiveness, behavioral activation and behavioral inhibition systems (BAS and BIS) were measured in each subject. The frequency of occurrence of the S-allele of the 5-HTT gene in the Tuvinians was significantly higher, whereas the L-allele was found more often in the Russians. The people with the LL genotype had lower levels of both explicit and implicit anxiety, whereas heterozygotic subjects showed intermediate anxiety levels. The factors of gender and ethnical group had not effect on implicit anxiety, but showed associations with explicit anxiety. The Tuvinian men with the SS genotype showed the lowest level of explicit anxiety, whereas the Russian men with same genotype had the highest anxiety level. Inter-group differences in anxiety level were not detected in women with the SS genotype. Also, associations of polymorphic variants of 5-HTT genes with indices of BAS and verbal aggressiveness were revealed. Our results can be interpreted as indices of differences in the direction of anxiety in different cultures. Presumably, genetically highly anxious Tuvinian men are afraid to show fear because manifestation of fear is condemned in their social environment.

Key words: trait anxiety, polymorphic variants of the serotonin transporter gene, ethnic differences.

УДК 159.9:159.94:159.923

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА АЛЛЕЛЕЙ СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА НА ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОЗГОВОЙ ГЕМОДИНАМИКИ У ЛЮДЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАРАДИГМЫ «СТОП-СИГНАЛ»

© 2014 г. **Е.Д. Петровский[1, 3], А.Н. Савостьянов[2, 3, 5, 6], А.А. Савелов[1], В.С. Науменко[3], Н.А. Синякова[3], Е.А. Левин[4], С.С. Таможников[2], А.А. Тулупов[1, 5], В.А. Мордвинов[3], Н.А. Колчанов[3], Л.И. Афтанас[2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: alexander.savostyanov@gmail.com;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия;
[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
[4] Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия;
[5] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия;
[6] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск, Россия

Поступила в редакцию 27 октября 2014 г. Принята к публикации 11 ноября 2014 г.

В работе исследуется влияние полиморфных вариаций гена, кодирующего транспортер серотонина (5-HTT), на индивидуальные особенности мозговой гемодинамики, выявляемые при помощи фМРТ в условиях выполнения заданий экспериментальной парадигмы «Стоп-сигнал». Полиморфные варианты гена 5-HTT определялись при помощи аллель-специфичной ПЦР с использованием ДНК, выделенной из крови испытуемых, в качестве матрицы. Всего обследовано 24 испытуемых (8 человек с генотипом LL, 8 – с генотипом LS и 8 – с генотипом SS). В эксперименте испытуемые либо нажимали на кнопку после появления целевого стимула (условие Go), либо подавляли уже подготовленное движение (условие Stop). Связанные с генотипом различия наблюдались в гемодинамических ответах, регистрируемых в областях клина (затылочная доля коры головного мозга), а также медиальной лобной и нижней лобной извилин (лобные доли коры головного мозга). Носители генотипа SS показали достоверно больший контраст между фМРТ ответами в условиях Go и Stop по сравнению с носителями генотипов LL и LS, что может быть интерпретировано как показатель большей выраженности у них активационных процессов и сниженной способности к подавлению неадекватных движений. Гипотетически, люди с генотипом SS имеют преимущество перед людьми с генотипами LL и LS в условиях принятия решения при нехватке времени, однако они хуже справляются с ситуациями, требующими подавления неадекватных поведенческих ответов.

Ключевые слова: фМРТ, полиморфные варианты гена серотонинового транспортера, исполнительный контроль над поведением, «Стоп-сигнал» парадигма.

ВВЕДЕНИЕ

Способность произвольно управлять вниманием, направленным на объекты внешнего мира, и реализовывать сложные действия в соответствии с мотивациями и объективными обстоятельствами получила название «исполнительного контроля над поведением» (Ramautar *et al*., 2006). Исполнительный контроль над поведением может быть представлен как результат взаимодействия двух базовых процессов – активации и торможения движений (Verbruggen, Logan, 2008, 2009). Соответственно, выделяются активационный контроль, связанный с выполнением целенаправленного движения для удовлетворения ведущей мотивации, и тормозный контроль, направленный на подавление движений, если они стали неадекватными сложившейся ситуации.

Исследовательский интерес к пониманию роли различных факторов в организации взаимодействия между активационными и тормозными процессами в головном мозге вызван тем, что нарушение такого взаимодействия является симптомом многочисленных неврологических или психиатрических патологий, таких как болезнь Паркинсона (Beste *et al*., 2009), детская гиперактивность (Alderson *et al*., 2007), посттравматические или постоперационные расстройства поведения (Dyachkov *et al*., 2012), импульсивный синдром, тревожно-депрессивные расстройства или алкогольные психозы (Li *et al*., 2009). При этом развитие патологии может быть связано с нарушением способности либо к выполнению целенаправленного движения, либо в механизмах подавления неадекватных моторных ответов. Исследования активационно-тормозного баланса при регуляции поведения, проводимые на здоровых испытуемых, могут выявить факторы риска, способствующие возникновению одного из таких нарушений при патологии. Кроме того, индивидуальные особенности в соотношении таких процессов могут служить основой для прогнозирования рисков суицидов, алкогольной зависимости и социально опасного поведения (Hom *et al*., 2003).

Экспериментальным методом, позволяющим изучать динамику взаимоотношений между разными субпроцессами, входящими в исполнительный контроль над поведением, является парадигма «Стоп-сигнал» (ССП) (Lappin, Erikson, 1966). ССП включает в себя два накладывающихся друг на друга задания: 1) необходимость быстро и точно выполнять движение после появления одного из нескольких целевых стимулов и 2) необходимость подавить уже начатое или подготавливаемое движение после появления запрещающего сигнала (запрещающие сигналы при этом появляются только в части проб). Согласно модели «конских скачек» (Band *et al*., 2003), в обоих условиях ССП возникает конкуренция между активационными и тормозными процессами за ресурсы мозга. В случае победы активационных процессов человек выполняет движение, а при победе тормозных процессов движение не совершается.

ССП широко использовалась в большом количестве исследований, проведенных на основе анализа поведенческих результатов, таких как скорость реакции или количество неверных решений (Alderson *et al*., 2007). Также ССП применялась в исследованиях с использованием техники функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ), согласно которым активация и торможение движений связаны одновременно с затылочно-теменными и лобными отделами коры головного мозга (Ridderinkhof *et al*., 2004; Ramautar *et al*., 2006). При помощи анализа электроэнцефалограммы (ЭЭГ), регистрируемой в условиях ССП, было выявлено, что подавление движения связано с увеличением мощности медленно-волновой (преимущественно дельта) осцилляторной активности мозга, тогда как активация движений сильнее отражена в снижении мощности более высокочастотной (альфа и бета) активности (Knyazev *et al*., 2008; Savostyanov *et al*., 2009; Tsai *et al*., 2014). Однако также были выявлены процессы, такие как направленное внимание или перцепция стимулов, которые вовлекаются как в активационные, так и в тормозные процессы.

ССП широко применяется для обследований как здоровых испытуемых, так и клинических пациентов (Dimoska *et al*., 2006; Alderson *et al*., 2007). В частности, было показано, что мозговая активность в условиях ССП различается у людей с высокой и низкой личностной тревожностью (Savostyanov *et al*., 2009). Однако до настоящего времени не было проведено исследований, устанавливающих взаимосвязь между

генетическими особенностями испытуемых и индивидуальными отличиями в паттернах их мозговой активности в условиях ССП.

Одним из наиболее активно изучаемых генетических маркеров, определяющих индивидуальные различия в контроле над поведением, является серотониновый транспортер (5-HTT), который регулирует силу и продолжительность действия серотонина на специфические рецепторы (Blakely *et al*., 1994; Lesch, 1997). Серотониновый транспортер человека кодируется геном (*SLC6A4*), локализованным на 17-й хромосоме (Gelernter *et al*., 1995). У человека промотор гена 5-HTT содержит расположенные в –1000 п.н. от сайта инициации транскрипции вариабельные повторы элементов длиной 22 п.н. (5-HTTLPR полиморфизм). Длинный аллель (L) состоит из 16, а короткий (S) из 14 повторов (Murphy *et al*., 2004). Хорошо исследована связь полиморфизма 5-HTTLPR с тревожностью (Lesch *et al*., 1996; Greenberg *et al*., 2000), депрессией и биполярным расстройством (Collier *et al*., 1996; Gonda, Bagdy, 2006; Gonda, 2008; Karg *et al*., 2011), чувствительностью к антидепрессантам (Durham *et al*., 2004; Porcelli *et al*., 2012), риском депрессии и суицидом (Veenstra-VanderWeele *et al*., 2000; Kato, 2007). Можно предположить, что здоровые люди, различающиеся по генотипу серотонинового транспортера, будут также различаться по своим способностям к контролю над поведением в условиях ССП, что будет отражено на показателях их мозговой активности.

Целью настоящей работы является сравнение паттернов мозговой гемодинамики, регистрируемых при помощи фМРТ, у людей с различными полиморфными вариантами гена серотонинового транспортера.

ИСПЫТУЕМЫЕ И ПРОЦЕДУРА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МРТ ИССЛЕДОВАНИЯ

фМРТ исследование было проведено на 1,5 Тл магнитно-резонансном томографе Achieva Nova Dual (Philips, Нидерланды) в Международном томографическом центре СО РАН. В эксперименте участвовало 24 человека (10 мужчин, 14 женщин, средний возраст 23,5 ± 2,1 года). Все участники были студентами или выпускниками Новосибирского государственного университета. Испытуемые были отобраны из большой группы людей, у которых предварительно была взята проба крови (объемом 30 мл) для последующего выделения ДНК и оценки индивидуальных полиморфных вариантов 5-HTT гена. Геномная ДНК была выделена при помощи набора для выделения ДНК из проб крови (Биосилика, Россия). Частоты короткого (S) и длинного (L) аллелей гена, кодирующего транспортер серотонина, были определены при помощи аллель-специфичной ПЦР с использованием 5′-ggcgttgccgctctgaattgc-3′ или 5′-gagggactgagctggacaacccac-3′ праймеров (Lesch *et al*., 1996) и геномной ДНК испытуемых в качестве матрицы. Продукты ПЦР разделяли при помощи электрофореза в 3 %-м агарозном геле.

Для участия в МРТ обследовании было приглашено 8 человек с генотипом LL (4 мужчины и 4 женщины), 8 человек с генотипом LS (4 мужчины и 4 женщины) и 8 человек с генотипом SS (2 мужчины и 6 женщин). Перед проведением обследования все испытуемые давали письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с этическими требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

Экспериментальная парадигма «Стоп-сигнал» была оформлена в виде компьютерной игры, в ходе которой участники должны были имитировать стрельбу по мишеням. На экране монитора испытуемым в случайном порядке предъявлялись два визуальных стимула («олень» или «танк»), которые было необходимо «поразить выстрелом». Им предлагалось нажимать на кнопку левой рукой после появления оленя (что соответствовало выстрелу из арбалета) или правой рукой после появления танка (что соответствовало выстрелу из противотанкового ружья). Время презентации целевого сигнала на экране монитора было ограничено 2 000 мс. Испытуемый был инструктирован нажимать на кнопку как можно быстрее, до того как стимул исчезнет с экрана. Временные интервалы между целевыми стимулами случайно варьировались в промежутке от 4 до 10 с (в среднем 7 с). В примерно 23 % случаев после появления целевого стимула был представлен стоп-сигнал (красный квадрат с надписью «Stop» в середине целевого стимула), который означал необходимость прервать движение. Первые 30 предъявлений целевого стимула

не сопровождались появлением стоп-сигнала у всех испытуемых. Для этих проб компьютер автоматически вычислял среднее время реакции испытуемого на стимул. Затем стоп-сигналы подавались с вероятностью 35 % и задержкой в 10, 20, 70 и 80 % от среднего времени реакции. Большинство испытуемых успевало подавить движение после коротколатентных стоп-сигналов и не успевало остановиться после длиннолатентных стоп-сигналов. Если испытуемый правильно нажимал на кнопку после появления целевого стимула, ему прибавлялись игровые очки, что отмечалось на специальном счетчике. Если испытуемый пропускал нажатие, неправильно выбирал оружие или давил на кнопку после стоп-сигнала, его счет понижался.

Презентация стимулов и запись точного времени реакции испытуемых в ходе исследования велись при помощи программы Hunt, реализованной в программной среде Inquisit 4 (Millisecond Software). В ходе эксперимента в начале каждой сессии были получены анатомические изображения высокого разрешения с помощью T1-взвешенной Turbo Field Echo (TFE) последовательности (матрица 256×256, 64 среза, размер воксела 1×1×2 мм); для получения фМРТ изображений использовалась Echo planar imaging (EPI) последовательность (матрица 64×64, 35 срезов, размер воксела 4×4×4 мм, время повторения TR = 3500 мс, время эха TE = 50 мс) с подавлением сигнала от жировой ткани по методике SPIR, 200 трехмерных кадров общей длительностью 700 с. Для регистрации сигналов использовались 6 головных элементов нейроваскулярной приемной катушки NV-16.

Обработка было выполнена в программном пакете Statistical parametric mapping (SPM8) (Friston *et al.*, 2007), исполняемом в среде Matlab (Mathworks Inc.). Использованы стандартные значения параметров, если не указано иначе.

Было скорректировано взаимное расположение кадров для устранения последствий непроизвольных движений головой участников эксперимента, после чего изображения были приведены к стандартному координатному пространству (MNI, Montreal Neurological Institute) с изотропным разрешением 2 мм и сглажены пространственным фильтром с гауссовым ядром с шириной на полувысоте 8 мм. После этого к данным был применен фильтр высоких частот с периодом отсечения 128 с.

Исследовательская парадигма «Стоп-сигнал» включала стимулы двух типов: «Go» и «Stop». Стимул «Go» начинался демонстрацией изображения и заканчивался либо реакцией испытуемого (нажатием на кнопку), либо окончанием показа изображения после истечения лимита времени (2 с). На индивидуальном уровне обработки события каждого из типов моделировались сверткой стандартной функции гемодинамического ответа и прямоугольной функции, соответствующей временным интервалам событий. В дизайн эксперимента в качестве регрессоров были также включены параметры коррекции движения головой (3 параметра смещения и 3 – вращения) для устранения эффектов, коррелировавших с движением. Для каждого испытуемого исследовался контраст Go > Stop, характеризующий различие в активации областей мозга в ходе событий этих двух типов.

Индивидуальные результаты были объединены в групповой анализ второго уровня в предположении модели случайных эффектов. Были исследованы групповые результаты для каждого из генотипов по отдельности с использованием одновыборочного t-критерия, а также было проведено сравнение групп с использованием двухвыборочного t-критерия для независимых выборок. Принимались различия, полученные на уровне значимости $p < 0{,}005$ без поправки на множественные сравнения.

Визуализация полученных результатов проводилась с использованием утилиты xjview8 (Cui, Li, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МРТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты фМРТ исследования эксперимента на основе стоп-сигнал парадигмы приведены на рис. 1 и 2. Проиллюстрированы области достоверно положительного эффекта для дифференциального контраста Go > Stop в групповых сравнениях SS > LS и SS > LL соответственно. Достоверного отрицательного эффекта при таком сравнении обнаружено не было. Достоверных различий в активации мозга между группами LS и LL также не наблюдалось.

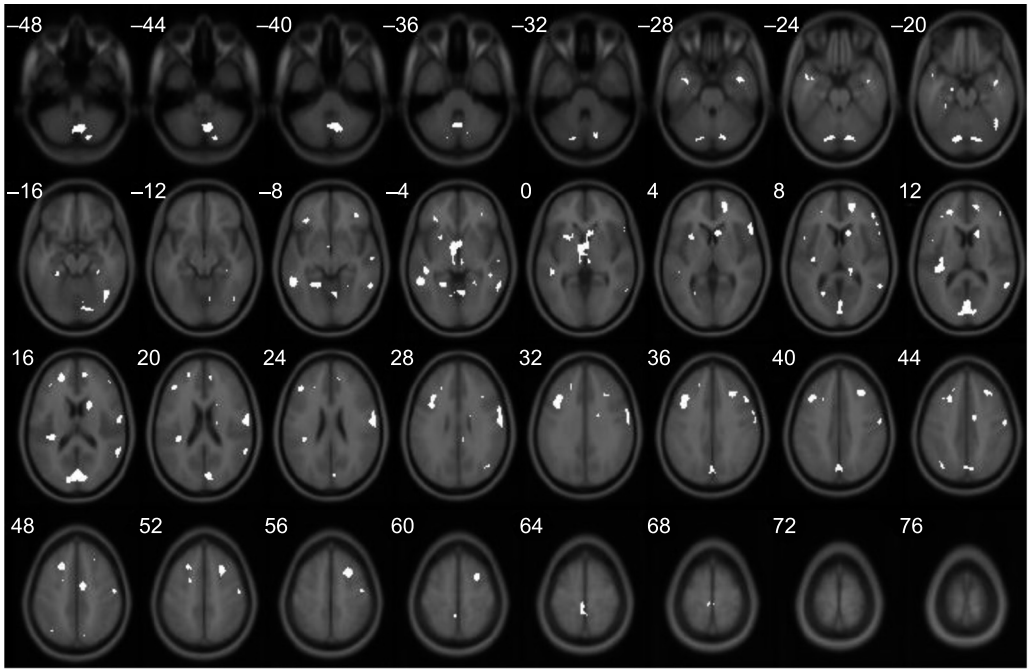


Рис. 1. Области достоверного положительного эффекта для контраста Go > Stop группового сравнения SS > LS.

Fig. 1. Regions of significant positive effects for the Go > Stop contrast in the inter-group comparison SS > LS.

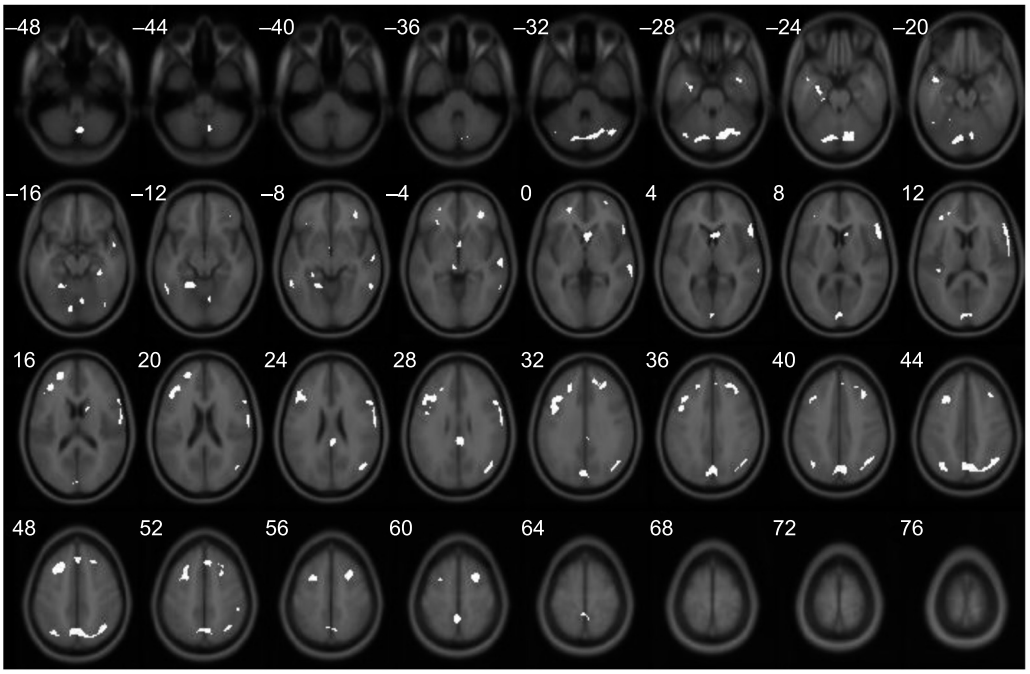


Рис. 2. Области достоверного положительного эффекта для контраста Go > Stop группового сравнения SS > LL.

Fig. 2. Regions of significant positive effects for the Go > Stop contrast in the inter-group comparison SS > LL.

Можно наблюдать достоверное отличие в активации мозга у носителей генотипа SS от активации мозга у людей двух других генотипов. Основные различия сосредоточены в областях клина и предклинья (cuneus, precuneus, теменно-затылочная доля коры головного мозга, поля Бродмана 7, 17, 18), а также лобных медиальной и нижней извилин (middle frontal gyrus, inferior frontal gyrus, лобная доля коры головного мозга, поля Бродмана 9, 10, 11, 46, 47). Положительное различие в дифференциальном контрасте Go > Stop говорит о более ярко выраженном отличии реакций на события типов Go и Stop у носителей генотипа SS, чем у носителей двух других генотипов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из литературных данных известно, что люди с генотипом SS более склонны к проявлению высокой тревожности, отличаются повышенным риском развития депрессии, склонностью к суициду и девиантному поведению (Lesch *et al*., 1996; Lesch, 1997; Gonda, Bagdy, 2006; Gonda, 2008). По нашим предварительным данным, полученным при помощи сравнения данных психометрии и ЭЭГ (Savostyanov *et al*., 2014), носителям генотипа SS по сравнению с носителями LL и LS генотипов свойственны более высокая личностная тревожность и менее выраженные мозговые реакции, связанные с произвольной концентрацией внимания. В то же время люди с генотипом SS показали большую амплитуду ЭЭГ реакций, связанную с быстрой, непроизвольной оценкой стимулов и принятием решений в условиях нехватки времени.

В этом исследовании мы показали, что разница в гемодинамических ответах между условиями Go и Stop сильнее выражена для носителей генотипа SS, чем для носителей LL и LS. Локализация различий между условиями у людей с разным генотипом соответствует тем областям коры (т. е. лобным и затылочно-теменным областям), которые, согласно литературным данным, вовлечены в исполнительный контроль над поведением (Ridderinkhof *et al*., 2004; Ramautar *et al*., 2006; Tsai *et al*., 2014). Эти различия могут быть предварительно интерпретированы как показатель больших способностей к активации поведения и сниженных способностей к торможению поведения у носителей генотипа SS.

Можно предположить, что генотип SS дает преимущества при выживании в условиях, требующих быстрого, необдуманного реагирования на ситуацию, и не требующих сложного контроля над социальным поведением. Наоборот, носители генотипа LL должны получать преимущества в условиях, когда время принятия решения менее критично для выживания, но большое значение имеет правильность выбора, что требует тщательного обдумывания решений и подавления неадекватного поведения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение фМРТ ответов в активационном и тормозящем условиях парадигмы «Стоп-сигнал» выявило достоверные различия в мозговой гемодинамике у носителей различных аллелей транспортера серотонина. Люди с генотипом SS показали больший контраст в гемодинамических ответах между активационным и тормозящим условиями по сравнению с носителями генотипов LL и LS. Различия в гемодинамике между носителями разных генотипов были обнаружены в областях лобной коры и клина (затылочно-париетальной коры), что соответствует локализации корковых зон, связанных с исполнительным контролем над поведением. Результаты исследования позволяют гипотетически предположить, что носители генотипа SS лучше адаптированы к условиям среды, требующим быстрых импульсивных действий, но хуже адаптированы к условиям, в которых требуется совершать хорошо обдуманный выбор из нескольких вариантов поведения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке проекта партнерских фундаментальных исследований СО РАН (проект № 87). Е.Д. Петровский, А.А. Савелов и А.А. Тулупов выражают благодарность за финансовую поддержку Российскому научному фонду (проект № 14-35-00020) в части разработки процедур сканирования и обработки фМРТ изображений. А.Н. Савостьянов, В.С. Науменко и Н.А. Синякова выражают благодарность за финансовую поддержку

Российскому научному фонду (проект гранта № 14-15-00202) в части разработки процедур выделения и анализа ДНК. Участие Н.А. Колчанова было поддержано бюджетным проектом VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

Alderson R.M., Rapport M.D., Kofler M.J. Attentional-deficit/hyperactivity disorder and behavioral inhibition: a meta-analytic review of the stop-signal paradigm // J. Abnorm. Child Psychol. 2007. V. 35. P. 745–758.

Band G.P.H., Molen van der M.W., Logan G.D. Horse-race model simulations of the stop-signal procedure // Acta Psychologica. 2003. V. 112. P. 105–142.

Blakely R.D., De Felice L.J., Hartzell H.C. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters // J. Exp. Biol. 1994. V. 196. P. 263–281.

Beste C., Dziobek I., Hielscher H., Willemssen R., Falkenstein M. Effects of stimulus-response compatibility on inhibitory processes in Parkinson's disease // Eur. J. Neurosci. 2009. V. 29. No. 4. P. 855–860.

Collier D.A., Stober G., Li T., Heils A., Catalano M., Di Bella D., Arranz M.J., Murray R.M., Vallada H.P., Bengel D., Muller C.R., Roberts G.W., Smeraldi E., Kirov G., Sham P., Lesch K.P. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders // Mol. Psychiatry. 1996. V. 1. P. 453–460.

Cui X., Li J. xjView – a viewing program for SPM. 2007. available at http://people.hnl.bcm.tmc.edu/cuixu/xjView/.

Dimoska A., Johnstone S.J., Barry R.J. The auditory-evoked N2 and P3 components in the stop-signal task: indices of inhibition, response-conflict or error-detection? // Brain and Cognition. 2006. V. 62. No. 2. P. 98–112.

Dyachkov D.V., Savostyanov A.N., Baykalov A.A., Krutko A.V., Levin E.A. The EEG dynamic in Stop-signal paradigm in the patients with the vertebrogenic pain syndrome // A poster presented at 18th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping, Beijing, China, 2012.

Durham L.K., Webb S.M., Milos P.M., Clary C.M., Seymour A.B. The serotonin transporter polymorphism, 5HTTLPR, is associated with a faster response time to sertraline in an elderly population with major depressive disorder // Psychopharmacology. 2004. V. 174. P. 525–529.

Friston K., Ashburner J., Kiebel S. *et al*. Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images. Acad. Press, 2007.

Hom N.R., Dolan M., Elliott R., Deakin J.F.W., Woodruff P.W.R. Response inhibition and impulsivity: an tMRI study // Neuropsychologia. 2003. V. 41. P. 1959–1966.

Gelernter J., Pakstis A.J., Kidd K.K. Linkage mapping of serotonin transporter protein gene SLC6A4 on chromosome 17 // Human Genet. 1995. V. 95. P. 677–680.

Greenberg B.D., Li Q., Lucas F.R., Hu S., Sirota L.A., Benjamin J., Lesch K.P., Hamer D., Murphy D.L. Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample // Am. J. Med. Genet. 2000. V. 96. P. 202–216.

Gonda X. The serotonin transporter gene and personality: association of the 5-HTTLPR s allele, anxiety, depression and affective temperaments // Hung. Med. J. 2008. V. 2. No. 4. P. 639–645.

Gonda X., Bagdy G. Relationship between serotonin transporter gene 5HTTLPR polymorphism and the symptoms of neuroticism in a healthy population // Psychiatr. Hung. 2006. V. 21. No. 5. P. 379–385.

Karg K., Burmeister M., Shedden K., Sen S. The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation // Arch. Gen. Psychiatry. 2011. V. 68. P. 444–454.

Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder and depression // Psychiatry Clin. Neurosci. 2007. V. 61. P. 3–19.

Knyazev G.G., Levin E.A., Savostyanov A.N. Impulsivity, anxiety, and differences in evoked and induced brain oscillations // Int. J. Psychophysiol. 2008. V. 68. No. 3. P. 242–254.

Lappin, J.S., Erikson C.W. Use of a delayed signal to stop a visual reaction-time response // J. Exp. Psychol. 1996. V. 72. No. 6. P. 805–811.

Lesch K.P. Molecular biology, pharmacology, and genetics of the serotonin transporter: psychobiological and clinical implications // Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS / Eds H.G. Baumgarten, M. Gothert. N.Y.: Springer, 1997. P. 671–705.

Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Müller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region // Science. 1996. V. 274. No. 5292. P. 1527–1531.

Li C.S., Luo X., Yan P., Bergquist K., Sinha R. Altered impulse control in alcohol dependence: neural measures of stop signal performance // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2009. V. 33. P. 1–11.

Murphy D.L., Lerner A., Rudnick G., Lesch K.P. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics // Mol. Interv. 2004. V. 4. P. 109–123.

Porcelli S., Fabbri C., Serretti A. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy // Eur. Neuropsychopharmacol. 2012. V. 22. P. 239–258.

Ramautar J.R., Slagter H.A., Kok A., Ridderinkhof K.R. Probability effects in the stop signal paradigm: the insula and the significance of failed inhibition // Brain Res. 2006. V. 1105. P. 143–154.

Ridderinkhof K.R., Ullsperger M., Crone E.A., Nieuwenhuis S. The role of the medial frontal cortex in cognitive control // Science. 2004. V. 306. P. 443–447.

Savostyanov A.N., Levin E.A., Snyakova N.A., Tamozhnikov M.S., Kavai-ool U.N., Naumenko V.S. Relationships of serotonin transporter allele polymorphism with EEG correlates of trait anxiety and impulsiveness in Russians and Tuvinians // Intern. Forum of European NeuroSciences. Milan, Italy, 2014. Abstr. Number: FENS-0607; Poster Board Number: C139.

Savostyanov A.N., Tsai A.C., Liou M., Levin E.A., Lee J.D., Yurganov A.V., Knyazev G.G. EEG-correlates of trait anxiety in the stop-signal paradigm // Neurosci Lett. 2009. V. 449. No. 2. P. 112–116.

Tsai A., Jung T-P., Chien V., Savostyanov A.N., Makeig S. Cortical surface alignment in multi-subject spatiotemporal independent EEG source imaging // NeuroImage. 2014. V. 87. No. 297–310.

Veenstra-VanderWeele J., Anderson G.M., Cook E.H., Jr. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions // Eur. J. Pharmacol. 2000. V. 410. P. 165–181.

Verbruggen, F., Logan, G.D. Response inhibition in the stop-signal paradigm // Trends Cogn. Sci. 2008. V. 12. P. 418–424.

Verbruggen, F., Logan G.D. Automaticity of cognitive control: goal priming in response inhibition paradigms // J. Exp. Psycho. Learn. Mem. Cogn. 2009. V. 35. P. 1381–1388.

EFFECTS OF SEROTONIN TRANSPORTER ALLELE POLYMORPHISM IN HUMANS ON THE INDIVIDUAL CHARACTERISTICS OF CEREBRAL HEMODYNAMICS IN THE STOP-SIGNAL PARADIGM

E.D. Petrovskiy[1, 3], A.N. Savostyanov[2, 3, 5, 6], A.A. Savelov[1], V.S. Naumenko[3], N.A. Sinyakova[3], E.A. Levin[4], S.S. Tamozhnikov[2], A.A. Tulupov[1, 5], V.A. Mordvinov[3], N.A. Kolchanov[3], L.I. Aftanas[2]

[1] International Tomographic Center SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: alexander.savostyanov@gmail.com;
[2] State Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine SB RAMS, Novosibirsk, Russia;
[3] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
[4] Academician E.N. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk, Russia;
[5] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
[6] National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

Summary

The paper explores the influence of polymorphic variations of the serotonin transporter (5-HTT) gene on the individual characteristics of cerebral hemodynamics, revealed by fMRI during the Stop-signal task execution. Polymorphic variants of 5-HTT gene were identified by allele-specific PCR using DNA extracted from the blood of subjects. A total of 24 subjects were examined (8 subjects with the LL genotype, 8 subjects with the LS genotype and 8 subjects with the SS genotype). While executing the task, the subjects had to press a button after the appearance of the target stimulus (Go condition), or to suppress the already prepared reaction if the target stimulus was followed by a stop signal (Stop condition). Genotype-associated differences were observed in hemodynamic responses in the regions of the cuneus (occipital lobe) and the medial and inferior frontal gyri (frontal lobe of the brain). The subjects with the SS genotype showed significantly greater differences between fMRI responses under Go and Stop conditions compared to the subjects with the genotypes LL and LS. This fact may be interpreted as an indication of more pronounced activation processes and reduced ability to suppress inadequate movements in the former group. Presumably, persons with the SS genotype are superior to LL or LS persons in the conditions of decision making at a lack of time; however, they are inferior in situations demanding suppression of inadequate behavioural responses.

Key words: fMRI, polymorphic variants of the serotonin transporter gene, executive control of behaviour, stop-signal paradigm.

УДК 004.94:573.22

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ СОЦИАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ И ДИНАМИКИ ПОВЕДЕНИЯ

© 2014 г. **С.А. Лашин[1, 2], Е.А. Мамонтова[2], Ю.Г. Матушкин[1, 2], Н.А. Колчанов[1, 2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: lashin@bionet.nsc.ru;
[2] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15 октября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

В настоящее время в открытой печати опубликовано большое количество работ (более 10 000), посвященных использованию средств математического и компьютерного моделирования в исследовании социальных и биологических систем. В ИЦиГ СО РАН ведется разработка программных средств для анализа распространения идей и мнений в социальных системах с учетом не только социальных, но и биологических (генетических, психологических, физиологических) факторов. Учет большего числа факторов в подобных моделях позволит проводить более полный анализ социальных процессов, выдавать более точный прогноз и рекомендовать более точную стратегию управления процессами. Для подобных задач часто используется агентно-ориентированное моделирование. В данной работе рассматривается простая модель, введенная Bonabeau (2002), в которой феномены возникают за счет двух стратегий поведения у агентов. На ее основе была сконструирована социально-биологическая модель (расширение модели Bonabeau), в которой агенты обладают большим числом характеристик, что позволяет варьировать социальные и биологические подмодели в рамках одного программного средства. Большее число возможных правил поведения (неудовлетворенность, враждебность, скорость) отдельного агента многократно увеличивает многообразие результирующей динамики системы. Введение параметра неудовлетворенности позволяет сравнивать оценку собственной успешности для различных групп агентов (может интерпретироваться как самооценка). Модель может быть доработана посредством добавления в нее механизмов передачи идей и мнений, что позволит моделировать распространение идей внутри популяции (в то же время моделировать распространение болезней, слухов, любой информации); реализацией неоднородного распределения параметров внутри популяции (например, скорости, враждебности – в настоящее время это общий параметр для всех агентов популяции); рассмотрением различных топологий социальной сети. Но уже сейчас модель «агрессор–защитник» способна воспроизвести возникновение большого числа социальных и биологических явлений.

Ключевые слова: социальные системы, агентное моделирование, параллельное программирование, модель «агрессор–защитник».

ВВЕДЕНИЕ

Последние несколько лет ознаменовались ростом интереса к системным подходам в области социальной эпидемиологии (El-Sayed *et al*., 2012). Основными инструментами исследований в этой области являются анализ социальных сетей и агентно-ориентированное моделирование (АО модели или АОМ). Анализ социальных сетей позволяет ответить на вопросы о связи между топологией сети и скоростью распространения (и угасания) в ней инфор-

мации различного рода, тогда как АО модели позволяют во многих случаях провести прямое имитационное моделирование популяции с возможностью явного задания правил генерации и обработки информации агентами. Хотя сетевой анализ подходит для исследования механизмов «социального заражения» (Social Epidemiology, 2000), для его проведения требуется наличие большого объема экспериментальных данных (что на практике встречается достаточно редко), это может ограничивать применение данных методов на практике. В этой ситуации использование АО моделей для оценки факторов, влияющих на распространение идей, оказывается наиболее естественным решением, особенно при рассмотрении факторов, относящихся к разным уровням биологической/социальной организации сообщества или его отдельных индивидуумов (El-Sayed *et al*., 2012). В данной работе рассматривается простая модель, введенная Bonabeau (2000), в которой феномены возникают за счет двух стратегий поведения у агентов. Была поставлена задача – сконструировать на ее основе социально-биологическую модель, в которой агенты обладают большим числом характеристик, что позволяет варьировать социальные и биологические подмодели в рамках одного программного средства.

КРАТКИЙ ОБЗОР ПРОБЛЕМЫ

Агентно-ориентированные методы моделирования

Традиционно агентно-ориентированные системы моделирования (т. е. системы, моделирующие частицы как отдельные объекты, например методы Монте-Карло, клеточные автоматы, нейронные сети…) считаются альтернативой описания динамики системы при помощи дифференциальных уравнений. Сложность дифференциальных уравнений, описывающих систему, возрастает экспоненциально с увеличением сложности поведения отдельного агента.

Агентно-ориентированные модели не только решают данную проблему, но имеют еще ряд преимуществ. Во-первых, такие модели позволяют рассматривать процесс возникновения феномена, в то время как модели, основанные на дифференциальных уравнениях, имеют дело с итоговым состоянием системы, оперируют преимущественно усредненными значениями параметров. Во-вторых, агентно-ориентированные модели являются гибкими и настраиваемыми: гетерогенная топология сети взаимодействий, наличие у агентов памяти, обучение и адаптация дают непредсказуемые эффекты, которые невозможно отследить в рамках модели, основанной на дифференциальных уравнениях, в то же время данные настройки легко реализуемы в рамках агентно-ориентированных моделей.

Наконец, агентные модели рассматривают систему на различных уровнях детализации (отдельный агент, группа агентов, вся популяция) и позволяют настраивать индивидуальные стратегии и получать результаты для каждого из таких уровней (Bonabeau, 2002).

Изначально агентно-ориентированные модели применялись для описания процессов молекулярной динамики (Metropolis *et al*., 1953; Alder, Wainwright, 1957, 1959), затем для описания движения взаимодействующих «разумных» агентов (под взаимодействием здесь понимаются обмен сообщениями и изменение внутреннего состояния агентов) (McCarthy, 1959; Minsky, 1961; Hewitt, 1970), приобрели популярность в биологии популяций (Matsuda *et al*., 1992). В настоящее время этот подход применяется повсеместно для моделирования: динамики мнений, распространения культуры, динамики языков, поведения толпы, финансовых потоков, движения транспорта, различных физических процессов (Castellano *et al*., 2009).

Математическое моделирование социально-биологических явлений

Возникновение принципиально новых социальных явлений (таких как Интернет), а также возможности использования больших баз данных послужили толчком к применению численного анализа в социологии, в том числе с использованием математических моделей, заимствованных из физики. Общим для таких моделей является то, что они могут быть использованы для исследования возникновения порядка в изначально неупорядоченной системе. Под порядком понимается консенсус, согласие, однородность (например, принятие общего решения, формирование иерархии, общего языка

или культуры), под беспорядком – фрагментация или несогласие; ключевыми моментами формирования общего мнения, культуры или языка являются взаимодействие агентов и их стремление становиться похожими друг на друга.

Перечислим некоторые известные модели социальной динамики, использующие идеи физики и агентное моделирование: модель избирателя (Clifford, Sudbury, 1973; Holley, Liggett, 1975), приобретшая известность как пример неравновесного стохастического процесса, аналитически разрешимого для любой размерности; модель с правилом большинства (Galam, 2002), реализующая принцип социальной инерции, согласно которому люди неохотно принимают изменения, если их не поддерживает явное большинство; модели социального влияния (Latané, 1981; Nowak *et al*., 1990; Lewenstein *et al*., 1992), рассматривающие зависимость силы взаимодействия от расстояния (как пространственного, так и расстояния в абстрактном пространстве мнений); модель Sznajd (Sznajd-Weron, Sznajd, 2000), изначально предназначенная для описания распространения мнений, однако повторяющая динамику модели избирателя; модель Deffuant (Deffuant *et al*., 2000) и модель Hegselmann – Krause (Hegselmann, Krause, 2002), имеющие дело с непрерывными мнениями, т. е. мнениями с диапазоном возможных вариантов, описываемых в модели вещественными числами; модель Axelrod (Axelrod, 1997), базирующаяся на двух базовых механизмах культурной ассимиляции: стремлении агентов становиться более похожими друг на друга и тенденции схожих агентов чаще взаимодействовать друг с другом.

В методологии АОМ система моделируется в виде набора автономных объектов, каждый из которых принимает решение самостоятельно. Данные объекты называются агентами. Каждый агент независимо от других оценивает ситуацию и затем изменяет свое состояние («принимает решение») на основе некоторого набора правил. Агентные модели можно рассчитывать необходимое число раз, что позволяет значительно шире оценивать статистические характеристики моделируемых процессов, по сравнению с классическими математическими моделями. Даже в моделях, в которых поведение агентов задается с помощью простейших правил, возможно появление сложной динамики поведения системы. Естественно, более сложные модели, в которых агенты могут эволюционировать, приобретая новые свойства или избавляясь от старых свойств, а также изменяя свое поведение, зачастую порождают еще более сложные паттерны поведения.

Модель «агрессор–защитник»

Модель «агрессор–защитник» предложена в работе Bonabeau (2002). Она представляет собой агентно-ориентированную модель динамики сообщества, члены которого (агенты, игроки) двигаются согласно определенным правилам. В частности, выделяются стратегии движения «трусов» и «защитников». В первом случае агент A (трус) стремится «спрятаться» от агента B (агрессора) за агента C (защитника). Во втором случае агент A сам выступает в роли «защитника» или «миротворца», стремясь занять положение между агентами B и C. Данная модель является классическим примером модели, показывающей эмержентную природу социальных процессов: 1) простые правила индивидуального поведения могут привести к неожиданным результатам на уровне системы/сообщества; 2) небольшие изменения правил могут повлечь за собой значительные изменения поведения системы.

Нами была воспроизведена и существенно расширена модель «агрессор–защитник» Bonabeau (2002). Были предложены две альтернативные стратегии движения как для «трусов», так и для «защитников». Был введен параметр «враждебности» – минимальное расстояние, на которое сближаются игроки (при нулевой враждебности они могут совпадать покоординатно, при враждебности, равной 2r, где r (radius) – радиус круга, символизирующего игрока, агенты будут обходить друг друга, не пересекаясь). Было введено понятие скорости агента. Кроме того, реализована возможность задания любых параметров модели случайными величинами из заданного распределения (в настоящее время используется бета-распределение).

Расширенная модель «агрессор–защитник»

Модель Bonabeau была расширена за счет усложнения поведения отдельных агентов, а

также введения параметров, относящихся к популяции в целом. Во-первых, помимо двух режимов (трус/защитник) для каждого агента в доработанной модели возможен выбор стратегии движения: по нормали или по медиане/антимедиане.

Пусть A и B – выбранная пара агентов для игрока X. Под движением по нормали понимается следующий алгоритм: осуществляется проверка, соответствует ли движение по нормали к прямой AB выбранному режиму (попадает ли желаемая координата между A и B в режиме защитника, «спрячется» ли игрок X′ за игрока B (в режиме труса)). Если не соответствует, игрок пытается спрятаться за агента B на минимальном допустимом расстоянии от него (в режиме труса) или занять позицию ровно посередине между A и B (в режиме защитника). Если игрок X на рис. 1 является трусом с приоритетным движением по нормали, то точка X′ на прямой AB не удовлетворяет желаниям труса спрятаться от агрессора, и игрок направится «за спину» агента B. Если же предположить, что X – защитник, то точка X′ удовлетворяет его требованиям.

Под **движением по медиане** понимается следующее: игрок стремится занять позицию ровно посередине между A и B (режим защитника) или позицию, симметричную агрессору A относительно защитника B (режим труса). Последний тип движения назовем движением по **антимедиане** (см. рис. 2).

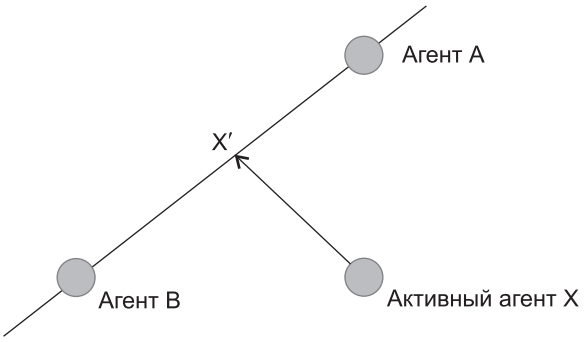


Рис. 1. Возможная схема расположения тройки агентов.

Fig. 1. Example of location diagram for the three agents.

Пусть $X(t)$ – радиус-вектор активного агента в момент времени t; $A(t)$, $B(t)$ – радиус-векторы агрессора и защитника/защищаемого соответственно. Тогда в зависимости от пары режим–стратегия движение агента описывается формулами (1)–(9).

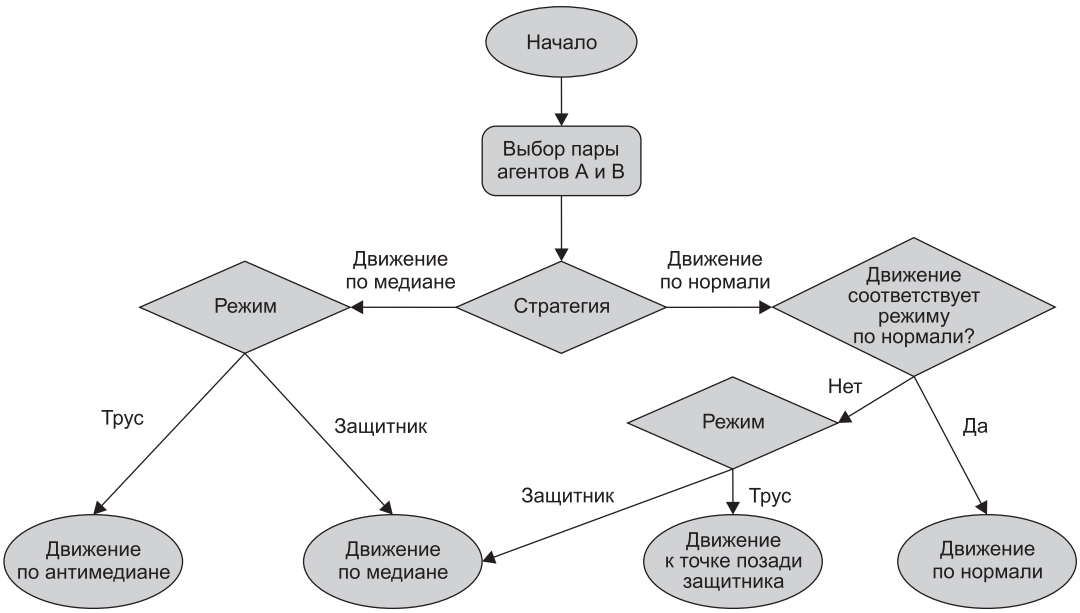


Рис. 2. Блок-схема принятия решения о направлении движения, осуществляемого агентом на каждой итерации.

Fig. 2. Decision rules flow-chart for agents movement direction.

PM (protector-along-median): агент стремится занять место ровно посередине между агрессором и защищаемым агентом, двигаясь, тем самым, по медиане в треугольнике ABX:

$$\overrightarrow{PM}(t) = \vec{X}(t) + \min(speed, |\vec{A}(t)/2 + \vec{B}(t)/2|) \times normalize\,(\vec{A}(t)/2 + \vec{B}(t)/2); \quad (1)$$

$$\vec{X}(t+1) = \overrightarrow{PM}(t). \quad (2)$$

PN (protector-along-normal): агент проверяет, соответствует ли движение к прямой AB по кратчайшему пути (т. е. по нормали) режиму защитника; если нет – движется по медиане.

$$\overrightarrow{PN}(t) = \vec{X}(t) + \min(speed, normal\,(\vec{B}(t) - \vec{A}(t))) \times normalize\,(normal\,(\vec{B}(t) - \vec{A}(t))); \quad (3)$$

$$\vec{X}(t+1) = \begin{cases} \overrightarrow{PN}(t), \text{ если } |\vec{B}(t) - \vec{A}(t)| = \\ = \max(|\vec{B}(t) - \vec{A}(t)|, |\overrightarrow{PN}(t) - \vec{A}(t)|, |\overrightarrow{PN}(t+1) - \vec{A}(t)|; \\ \overrightarrow{PM}\,(t) \text{ иначе} \end{cases} \quad (4)$$

CM (coward-along-median): агент стремится занять позицию, симметричную агрессору, относительно позиции защитника (движется по антимедиане).

$$\overrightarrow{CM}(t) = \vec{X}(t) + \min\{speed, |2\vec{B}(t) - \vec{A}(t)|\} \times normalize\,(2\vec{B}(t) - \vec{A}(t)); \quad (5)$$

$$\vec{X}(t+1) = \overrightarrow{CM}(t). \quad (6)$$

CN (along-normal coward): агент проверяет, соответствует ли движение к прямой AB по кратчайшему пути (т. е. по нормали) режиму труса; если нет – движется по антимедиане.

$$\overrightarrow{CN}(t) = \vec{X}(t) + \min(speed, |normal\,(\vec{B}(t) - \vec{A}(t))|) \times normalize\,(normal(\vec{B}(t) - \vec{A}(t))); \quad (7)$$

$$\overrightarrow{hide}(t) = \vec{B}(t) + enmity \times normalize\,(\vec{B}(t) - \vec{A}(t)) \quad (8)$$

$$\vec{X}(t+1) = \begin{cases} ANP(t), \text{ если } |\overrightarrow{CN}(t) - \vec{A}(t)| = \\ = \max\{|\overrightarrow{CN}(t) - \vec{A}(t)|, |\overrightarrow{CN}(t) - \vec{B}(t)|, |\vec{B}(t) - \vec{A}(t)|\}; \\ \vec{X}(t) + \min\{\text{speed}, |\overrightarrow{hide}(\text{t})|\} \times \text{normalize}\,(\overrightarrow{hide}(\text{t})) \text{ иначе}, \end{cases} \quad (9)$$

где *speed* – скорость агента, *normalize* – оператор нормализации вектора, *normal* – оператор взятия нормали (с учетом направления вектора), *enmity* – «враждебность».

Следующие новые параметры – скорость и враждебность – уже были использованы в формулах (1)–(9). Под **враждебностью** понимается минимальное допустимое расстояние между двумя агентами (при нулевой враждебности они могут совпадать покоординатно, при враждебности, равной 2r, где r – радиус окрестности, занятой игроком, агенты будут обходить друг друга, не пересекаясь); под скоростью понимается расстояние, на которое может сдвинуться агент за единицу времени.

Также для модели был введен выходной параметр – **неудовлетворенность** как мера относительной отдаленности от желаемых координат. Неудовлетворенность агента под номером *i* рассчитывается по формуле (10):

$$discontentment_i = distance_i / maxDistance, \quad (10)$$

где *distance* – расстояние до желаемых координат, *maxDistance* – максимальное расстояние среди агентов заданной окрестности.

Неудовлетворенность агента имеет два способа подсчета: максимальное значение *maxDistance* считается по всем агентам игры (такой тип расчета неудовлетворенности будем называть **абсолютным**) или максимальное значение *maxDistance* считается внутри окрестности заданного радиуса (такой тип расчета неудовлетворенности будем называть **относительным**). В таком случае радиус окрестности является дополнительным параметром модели.

Средняя неудовлетворенность рассчитывается как среднее по неудовлетворенностям всех агентов:

$$discontentment_{av} = (\sum_{1}^{n} discontentment_i)/n. \quad (11)$$

Наконец, модель допускает настройку периодичности сцены. В случае периодических граничных условий полагаем, что квадрат сцены окружен 4 аналогичными сценами с идентичным расположением, состоянием и поведением агентов на них (с той же конфигурацией попу-

ляции); если агент покидает основную сцену, допустим, через левый ее край, аналогичный агент приходит на сцену через правый, тем самым конфигурация популяции сохраняется и имитируется бесконечность системы. В противном случае границы предполагаются непроницаемыми для агентов.

ОСНОВНЫЕ РЕЖИМЫ ДИНАМИКИ МОДЕЛИ «АГРЕССОР–ЗАЩИТНИК»

Добавление большого числа параметров модели сделало ее гораздо более сложной и гибкой. Рассмотрим поведение системы при варьировании основных параметров: стратегии движения, враждебности, соотношения агентов-трусов и защитников. Заметим, что при движении по медиане и нулевой враждебности расширенная и исходная модели совпадают, движение агентов модели Bonabeau и модели «агрессор–защитник» идентично.

При движении по медиане/антимедиане популяция в целом характеризуется большей неудовлетворенностью на начальной стадии по сравнению с движением по нормали, однако проявляет большую приспосабливаемость и выходит на стационар с меньшим значением неудовлетворенности. При движении по нормали значение выходного параметра мало изменяется как внутри групп, так и в целом для популяции. На рис. 3 изображено сравнение поведения системы при движении по нормали и по медиане для популяции с равным соотношением трусов и защитников.

Введение параметра враждебности не внесло особой изменчивости для популяций, в которых все агенты движутся по нормали (ср. рис. 4, 5).

Однако для популяций, в которой агенты движутся по медиане, возникает особенность. При малом числе трусов в популяции (не более 5 %) неудовлетворенность при нулевой враждебности достигает порядка 0,95 (рис. 6), в то время как при ненулевой враждебности достигается устойчивый стационар со значением около 0,56 (рис. 7).

Такие численные результаты объясняются следующим образом: при нулевой враждебности агенты популяции стягиваются в единую точку, тем самым каждый агент достигает своих желаемых координат. Но, так как расстояние до желаемых координат всех агентов оказывается равным нулю и среднему значению внутри окрестности (которое также равно нулю), и так как неудовлетворенность стремится иметь значения выше среднего, то неудовлетворенность каждого агента оказывается максимальной, а значит, максимальна и средняя неудовлетворенность по всей популяции. В случае ненулевой враждебности защитники стягиваются в плотный узел, система приходит в неподвижность, немногочисленные трусы занимают желаемую

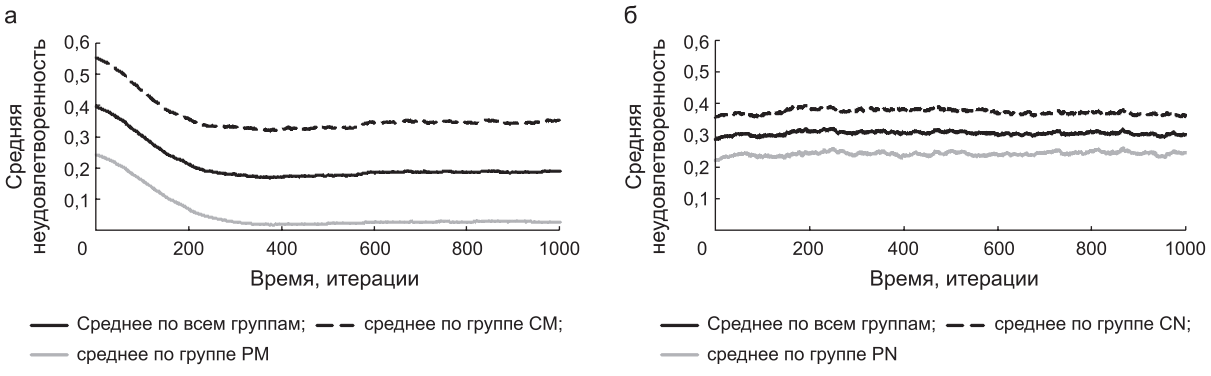


Рис. 3. Динамика модели для движения по медиане (а) и по нормали (б).

Популяция размера 100, соотношение трусов и защитников 1 : 1, *radius* = 3, *enmity* = 0, *speed* = 1. Усреднение на 100 моделей. По оси X – время (число итераций), по оси Y – неудовлетворенность (средняя, если для сообщества).

Fig. 3. Model dynamics (a) movement along median; (b) movement along normal.

Population size is 100, cowards/defenders ratio is 1 : 1, *radius* = 3, *enmity* = 0, *speed* = 1. Average dynamics for 100 models. X-direction – time (iterations), Y-direction – discontent (average for entire community).

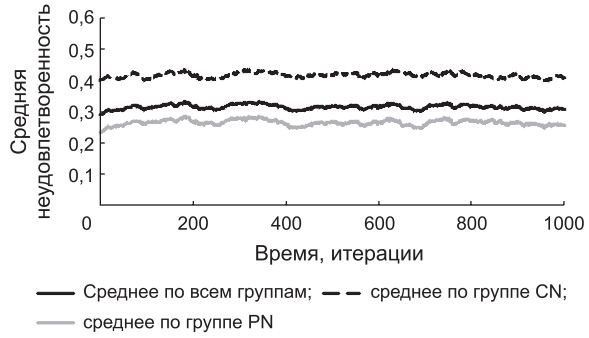


Рис. 4. Динамика модели для движения по нормали для *enmity* = 0.

Популяция размера 100, соотношение трусов и защитников 1 : 2, *radius* = 3, *speed* = 1. Усреднение на 100 моделей. По оси X – время (число итераций), по оси Y – неудовлетворенность (средняя, если для сообщества).

Fig. 4. Model dynamics, movement along normal, *enmity* = 0.

Population size is 100, cowards/defenders ratio is 1 : 2, *radius* = 3, *speed* = 1. Average dynamics for 100 models. X-direction – time (iterations), Y-direction – discontent (average for entire community).

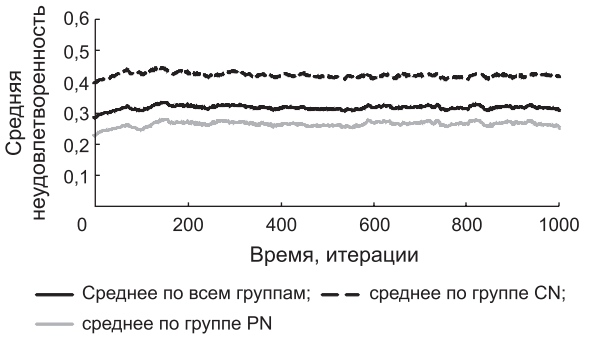


Рис. 5. Динамика модели для движения по нормали для *enmity* = 3.

Популяция размера 100, соотношение трусов и защитников 1 : 2, *radius* = 3, *speed* = 1. Усреднение на 100 моделей. По оси X – время (число итераций), по оси Y – неудовлетворенность (средняя, если для сообщества).

Fig. 5. Model dynamics, movement along normal, *enmity* = 3.

Population size is 100, cowards/defenders ratio is 1 : 2, *radius* = 3, *speed* = 1. Average dynamics for 100 models. X-direction – time (iterations), Y-direction – discontent (average for entire community).

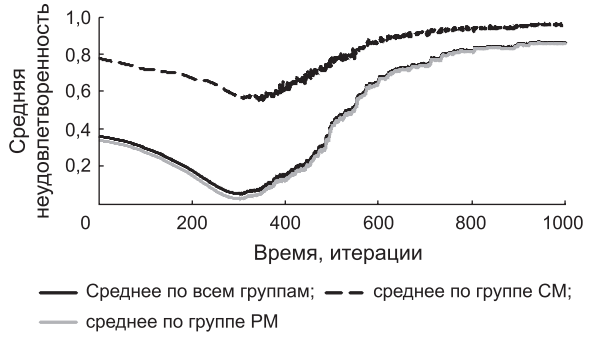


Рис. 6. Динамика модели для движения по медиане для *enmity* = 0.

Размер популяции 100, соотношение трусов и защитников 5 : 95, *radius* = 3, *speed* = 1. Усреднение на 100 моделей. По оси X – время (число итераций), по оси Y – неудовлетворенность (средняя, если для сообщества).

Fig. 6. Model dynamics, movement along median, *enmity* = 0.

Population size is 100, cowards/defenders ratio is 5 : 95, *radius* = 3, *speed* = 1. Average dynamics for 100 models. X-direction – time (iterations), Y-direction – discontent (average for entire community).

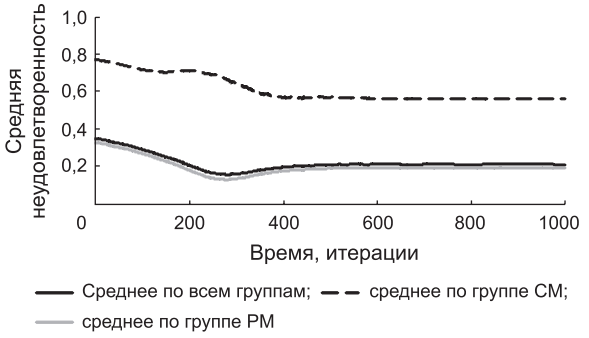


Рис. 7. Динамика модели для движения по медиане для *enmity* = 3.

Размер популяции 100, соотношение трусов и защитников 5 : 95, *radius* = 3, *speed* = 1. Усреднение на 100 моделей. По оси X – время (число итераций), по оси Y – неудовлетворенность (средняя, если для сообщества).

Fig. 7. Model dynamics, movement along median, *enmity* = 3.

Population size is 100, cowards/defenders ratio is 5 : 95, *radius* = 3, *speed* = 1. Average dynamics for 100 models. X-direction – time (iterations), Y-direction – discontent (average for entire community).

позицию вне узла; однако достичь желаемых координат для всех агентов невозможно в силу враждебности.

Наконец, заметим, что неудовлетворенность для группы агентов-трусов всегда оказывается значительно выше, чем для агентов-защитников, независимо от выбора прочих параметров. В то же время увеличение доли трусов в популяции ведет к уменьшению средней неудовлетворенности (рис. 8).

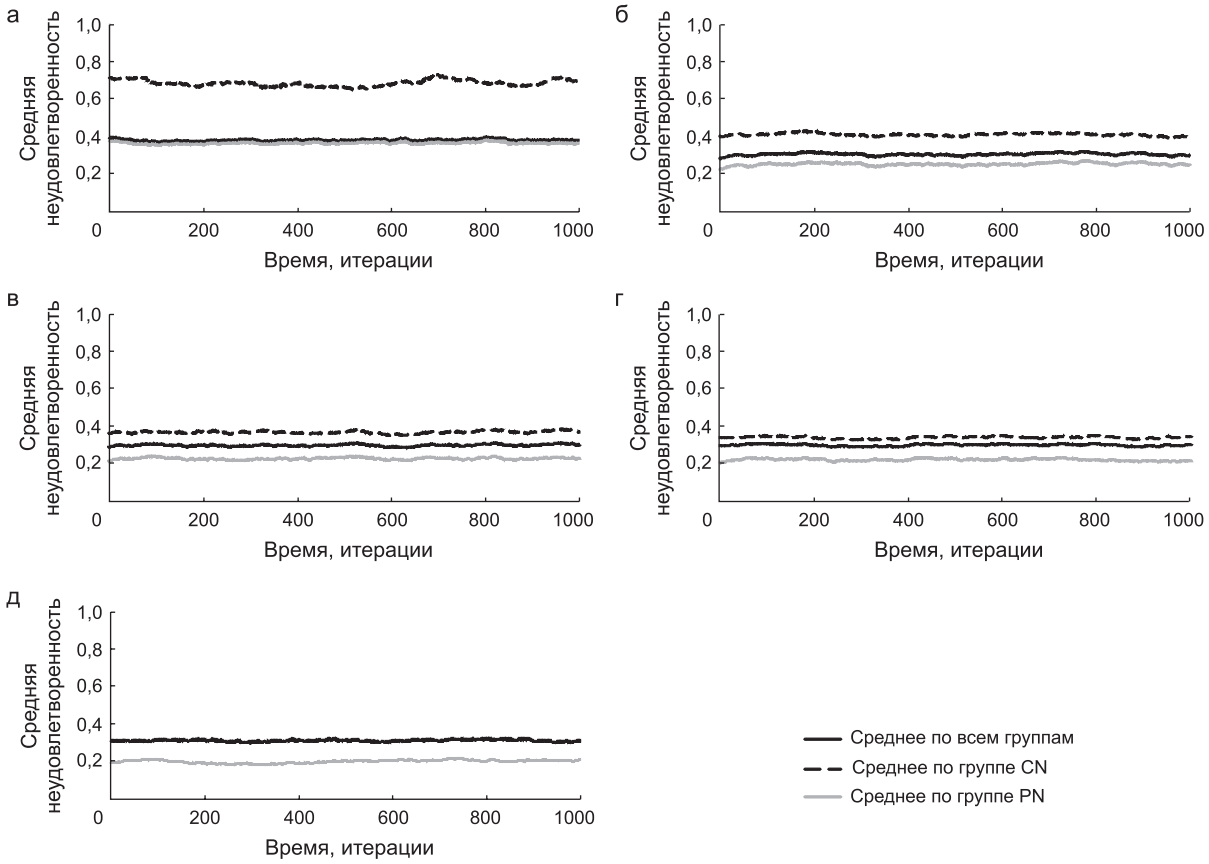


Рис. 8. Динамика модели для движения по нормали при различном соотношении трусов и защитников: а – 5 : 95; б – 1 : 2; в – 1 : 1; г – 2 : 1; д – 95 : 5.

Размер популяции 100, *radius* = 3, *enmity* = 6, *speed* = 1. Усреднение на 100 моделей. По оси X – время (число итераций), по оси Y – неудовлетворенность (средняя, если для сообщества).

Fig. 8. Model dynamics, movement along normal.

Cowards/defenders ratio varies: a – 5 : 95; b – 1 : 2; c – 1 : 1; d – 2 : 1; e – 95 : 5. Population size is 100, *radius* = 3, *enmity* = 6, *speed* = 1. Average dynamics for 100 models. X-direction – time (iterations), Y-direction – discontent (average for entire community).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы было разработано расширение модели Bonabeau, являющееся более полным инструментом для моделирования социальных и биологических явлений. Также сделан ряд новых наблюдений:

– динамика модели зависит от выбора движения по медиане /по нормали следующим образом: в первом случае популяция в целом характеризуется большей неудовлетворенностью на начальной стадии по сравнению с движением по нормали, однако проявляет большую приспосабливаемость и выходит на стационар с меньшим значением неудовлетворенности; во втором случае значение выходного параметра мало изменяется как внутри групп, так и в целом для популяции;

– введение параметра враждебности породило особенность для популяции с движением по медиане и малым числом трусов в ней (~ 5 %): величина неудовлетворенности выходит на стационар со значением 1;

– неудовлетворенность трусов всегда выше неудовлетворенности защитников, однако увеличение доли трусов в популяции ведет к уменьшению данной величины.

Модель может быть доработана посредством добавления в нее механизмов передачи идей и мнений, что позволит моделировать распространение идей внутри популяции (в то же время моделировать распространение болезней,

слухов, любой информации); реализацией неоднородного распределения параметров внутри популяции (например, скорости, враждебности – в настоящее время это общий параметр для всех агентов популяции); рассмотрением различных топологий социальной сети. Но уже сейчас модель «агрессор–защитник» способна воспроизвести возникновение большого числа социальных и биологических явлений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была поддержана грантом РФФИ № 12-07-00671 и проектом VI.61.1.2.

ЛИТЕРАТУРА

Alder B.J., Wainwright T.E. Phase Transition for a Hard Sphere System // J. Chem. Phys. 1957. V. 27. No. 5. P. 1208–1209.

Alder B.J., Wainwright T.E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method // J. Chem. Phys. 1959. V. 31. No. 2. P. 459–466.

Axelrod R. The dissemination of culture a model with local convergence and global polarization // J. Conflict Resolution. 1997. V. 41. No. 2. P. 203–226.

Binney J.J., Dowrick N.J., Fisher A.J., Newman M. The theory of critical phenomena: an introduction to the renormalization group. Oxford Univ. Press, 1992. P. 476.

Bonabeau E. Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. Suppl. 3. P. 7280–7287.

Bray A.J. Theory of phase-ordering kinetics //Adv. Physics. 1994. V. 43. No. 3. P. 357–459.

Castellano C., Fortunato S., Loreto V. Statistical physics of social dynamics // Rev. Modern Phys. 2009. V. 81. No 2. P. 591–646.

Clifford P., Sudbury A. A model for spatial conflict // Biometrika. 1973. V. 60. No. 3. P. 581–588.

Deffuant G., Neau D., Amblard F., Weisbuch G. Mixing beliefs among interacting agents // Adv. Complex Syst. 2000. V. 3. No. 01n04. P. 87–98.

Galam S. The September 11 attack: A percolation of individual passive support // Eur. Phys. J. B-Condensed Matter Complex Syst. 2002. V. 26. No. 3. P. 269–272.

Hewitt C. PLANNER: a language for manipulating models and proving theorems in a robot (Doctoral thesis, dspace.mit.edu). 1970.

Hegselmann R., Krause U. Opinion dynamics and bounded confidence models, analysis, and simulation // J. Artificial Soc. Social Simulation. 2002. V. 5. No. 3.

Holley R.A., Liggett T.M. Ergodic theorems for weakly interacting infinite systems and the voter model // Ann. Probability. 1975. V. 3. No. 4. P. 643–663.

Landau D.P., Binder K. A guide to Monte Carlo simulations in statistical physics. Cambridge Univ. Press, 2009. P. 384.

Latané B. The psychology of social impact // Amer. Psychologist. 1981. V. 36. No. 4. P. 343–356.

Lewenstein M., Nowak A., Latané B. Statistical mechanics of social impact // Phys. Rev. A. 1992. V. 45. No. 2. P. 763–776.

Matsuda H., Ogita N., Sasaki A., Sato K. Statistical mechanics of population: the lattice lotka-volterra model // Progr. Theor. Phys. 1992. V. 88. No. 6. P. 1035–1049.

McCarthy J. Programs with common sense // Proc. Teddington Conf. on the Mechanization of Thought Processes reprinted in Formalizing Common Sense. 1959. 2nd ed. Ablex, Norwood, NJ, 1990.

Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. Equation of state calculations by fast computing machines // J. Chem. Phys. 1953. V. 21. No. 6. P. 1087–1092.

Minsky M. Steps toward Artificial Intelligence // Proc. of the IRE. 1961. V. 49. No. 1. P. 8–30.

Nowak A., Szamrej J., Latané B. From private attitude to public opinion: A dynamic theory of social impact // Psychol. Rev. 1990. V. 97. No. 3. P. 362–376.

Sznajd-Weron K., Sznajd J. Opinion evolution in closed community // Intern. J. Modern Phys. C. 2000. V. 11. No. 6. P. 1157–1165.

MECHANISMS OF THE FORMATION AND PROPAGATION OF SOCIOBIOLOGICAL INTERACTIONS: A COMPUTER SIMULATION STUDY

S.A. Lashin[1, 2], E.A. Mamontova[2], Yu.G. Matushkin[1, 2], N.A. Kolchanov[1, 2]

[1] Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: lashin@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Many scientific studies (more than 10 000) have been dedicated to the mathematical modeling and simulations of biological systems at all levels of their organization. At the Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, software tools are being developed for the analysis of the propagation of ideas/opinions in social systems with regard to not only social but also biological (genetic, physiological, and psychological) factors. The consideration of more factors in these models allows better analysis of social processes, more precise predictions, and smarter strategies for process control. Agent-based modeling is the approach widely used for these tasks. In the present study, the simple model introduced by Bonabeau (2002) is considered and expanded. In the original model, complex dynamics arises on the base of two different strategies of agents' behavior. The expanded sociobiological model describes more sophisticated agents with additional characteristics. It allows us to combine social and biological submodels within a common software tool. As the number of agent's features (dissatisfaction, enmity, and mobility) increases, the dynamic variability of the model increases manifold. The addition of the dissatisfaction parameter enables an agent to compare its success with other agents, which may be interpreted as self-esteem. The model can be further improved by addition of various mechanisms of idea and opinion transmission, which will allow modeling the spread of ideas within populations (and, in addition, the spread of diseases, rumors, and any other information), modeling a non-uniform distribution of parameters within population, and considering different topologies of social networks. Nevertheless, even now the «agressor–protector» model can reproduce many social and biological phenomena.

Key words: social system, agent-based model, parallel programming, «agressor-defender» model.

К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВЛАДИМИРА АЛЕКСАНДРОВИЧА СТРУННИКОВА

© 2014 г. **В.А. Соколов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: sokolov@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 1 августа 2014 г. Принята к публикации 30 октября 2014 г.

15 июля 2014 г. исполнилось 100 лет со дня рождения широко известного в мире, выдающегося советского и российского генетика, кавалера Ордена Славы, Героя Социалистического Труда Владимира Александровича Струнникова.

Он родился 15 июля 1914 г. в Тамбове в семье священника. Относительно даты его рождения обнаружилось нечто мистическое, что приведено из статьи одного из классиков учения о гетерозисе Джорджа Шелла и автора самого этого термина: «In proof of this intended coverage I will quote from my invitation lecture delivered at Gottingen, Germany, in mid-July, 1914, in which the word “heterosis” was first proposed, and from a paper written at the same period, on “Duplicate genes for capsule form in Bursa bursa-pastoris,” through which latter medium the word “heterosis” came to the attention of other geneticists; the Gottingen lecture was delivered less than three week before the outbreak of World War I, and its publication was delayed for eight years, finally appearing in print in 1922» (Shull, 1948. P. 441).

Читатель может понять, что термин «гетерозис» и Владимир Александрович родились одновременно! Основные моменты жизни Владимира Александровича прекрасно описаны им в книге «Шелковый путь» (Струнников, 2004). Рискну предположить, что он умышленно дал книге такое название, поскольку его жизненный путь был достаточно тернистым. Возможно, он хотел подчеркнуть, что все главное в его жизни связано с наукой и объектом, которым занимался со студенческой скамьи и до конца своих дней – тутовым шелкопрядом. Выражаясь современным языком, можно сказать, что он являлся одним из создателей генетической биотехнологии этого важного хозяйственного объекта. В первой половине XX века шелк был стратегическим сырьем – из него изготовляли парашюты. На основе разработанных им методов и при его участии были созданы полтора десятка районированных производственных пород и гибридов. Предложенный им метод массового получения самцов широко используется в шелководстве Узбекистана и Китая, что увеличивает рентабельность на 20 %. Но наиболее значительное научное достижение Владимира Александровича связано с формулировкой гипотезы о компенсационном комплексе генов как генетическом механизме гибридной силы. Именно в этой связи я и услышал о нем как ученом от академика Д.К. Беляева в 1976 г.

В начале 1970-х годов работы по механизмам гетерозиса велись в мире достаточно активно. При этом можно было выделить два аспекта исследований. На генетическом уровне проверялись классические гипотезы Иста, Шелла и Джонса, (East, 1908; Shull, 1912; Jones, 1917) с использованием изозимной техники и, кроме того, у растений были очень популярны физиологические направления исследований в связи с фотосинтезом и общей энергетикой метаболизма (Hageman *et al*., 1967). Модель, которую использовали в лаборатории гетерозиса ИЦиГ под руководством В.К. Шумного, стабильно и

в разных условиях демонстрировала гетерозисный эффект в F_1. Эти гибриды получали при скрещивании исходной сортолинейной формы гороха Торсдаг с полученными от него хлорофильными мутантами (Соколов, 1989). Поскольку одна из гибридных комбинаций F_1 в зависимости от условий выращивания проявляла продуктивность на 15–40 % выше относительно лучшего из родителей, мы предположили, что у него идет более активный анаболизм, требующий соответствующего энергетического обеспечения. Для подтверждения этой гипотезы по интенсивности метаболизма сравнивали нормального по содержанию хлорофилла родителя, гетерозисный гибрид F_1 и гибриды первого поколения, не проявляющие эффекта гибридной мощности. Последние получали от скрещивания других хлорофильных мутантов этого сорта. Оказалось, что у гетерозисных гибридов ключевые ферменты, входящие в последовательные метаболические пути, проявляют большую активность, чем у родительских форм и негетерозисных гибридов.

Эти результаты и были содержанием моего доклада на отчетной сессии ИЦиГ СО АН в 1976 г. По скупым замечаниям я понял, что директору Института академику Д.К. Беляеву отчет не понравился, так как он не приветствовал уклонения от генетического содержания исследований. При этом он настойчиво попросил познакомиться с работой В.А. Струнникова, где были показаны генетические механизмы, приводящие к проявлению гетерозиса при гибридизации нормы с некоторыми мутантами у шелкопряда (Струнников, 1974, 1976). Я не очень серьезно отнесся к этому замечанию, поскольку много исследований, выполнявшихся на растениях за рубежом, шли как раз в направлении поиска физиолого-биохимических маркеров этого явления (Hageman *et al*., 1967).

Наша первая относительно короткая встреча произошла в зале Президиума ВАСХНИЛ в Харитоньевском переулке в 1982 г. Помню, получив программу совещания по наследственным резервам продукционного процесса у животных, я обратил внимание на доклад В.А. Струнникова по генетическим аспектам гетерозиса и решил рассказать ему о наших работах на горохе. Поскольку ранее я никогда его не встречал, спросил у В.К. Шумного, как он выглядит? Владимир

Константинович попытался описать его, а потом сказал, что он похож на академика Анатолия Ивановича Мальцева, что оказалось в высшей степени точной характеристикой внешности. К сожалению, Владимир Александрович прибыл незадолго до начала своего доклада, и при этой встрече мы с ним переговорили очень кратко. Но, будучи человеком вежливым и внимательным, он через некоторое время прислал мне свою статью из «Вестника сельскохозяйственной науки» (Струнников, 1983). Прежде всего, было приятно почитать очень добрую подпись четким, ровным и отработанным почерком. (Только позже я узнал, что Владимир Александрович значительное время был армейским писарем, и, возможно, здесь кроется исток его каллиграфии.)

Частная генетика любого сельскохозяйственного объекта необычайно интересна и трудна одновременно. Интересна, поскольку связана с изучением реальных хозяйственных видов, а трудна по причине малой плотности генетических карт, а иногда и с полным их отсутствием.

Правда, в настоящее время ситуация меняется радикально, и секвенированные геномы становятся доступными в сети, что позволяет очень быстро получать необходимую информацию.

Научное творчество Владимира Александровича обширно, и мы не сможем коснуться всех аспектов его работ с тутовым шелкопрядом. Проблема поддержания приемлемо продуктивных инбредных линий была решена, и далее перешли к решению задачи стабильного получения гетерозисных гибридов. Из сотен семей выбирали лучшую по гибридной мощности. Материнскую форму клонировали путем апомейотического партеногенеза, а отца – с помощью мейотического партеногенеза и андрогенеза. Генотипы матери и отца полностью воспроизводились у потомков. В результате получаемые гибриды F_1 от скрещивания массово размножаемых клонов родителей точно повторяли исходную семью.

Главное препятствие в использовании гетерозиса – отсутствие четких представлений о его генетических механизмах. В 1960-х годах Владимир Александрович занялся поисками возможности получения гибридных самцов с увеличенной продуктивностью шелка. В частности, он проводил работу с линией шелкопряда, несущей ген *white 4* (w_4). В гомозиготе мутация давала светлую окраску яиц и непигментированный покров гусениц, что было удобно для маркировки пола у гибридов F_1. Вместе с тем эта линия (A_1) имела очень низкую жизнеспособность, поэтому решили усилить это признак путем отбора. Одновременно с этой работой чисто случайно проводили селекцию на комбинационную способность другой генетически такой же линии A_2, не содержавшей полулетальный ген w_4. Обе эти линии при скрещивании с одной и той же неродственной им породой (B) давали гетерозисное потомство. Удивительным в этом опыте оказалось то, что неселектированная специально на комбинационную способность линия с геном w_4 давала больший гетерозис, чем селектированная линия! Подчеркнем еще раз – спонтанный отбор на генотипическом провокационном фоне мутации w_4 оказался более эффективным, чем специально проводимый на комбинационную способность. Получив столь неожиданные результаты, Владимир Александрович с коллегами провели специальные сравнения в пяти опытах, поставленных разными исследователями в отличающихся условиях. Гибрид от неселектированной специально линии (A_1) оказался в среднем по пяти опытам на 15 % продуктивнее гибрида, происходящего от сравниваемой линии (A_2) при $p \geq 0{,}001$. Анализ родословной линии A_1 показал непрерывный рост жизнеспособности ее гусениц в ряду 9 поколений отбора.

В 1970 году линия A_1 была скрещена с породой шелкопряда, имевшей дикий генотип по гену w_4 (*W/W*). Жизнеспособность полученного гетерозиготного по гену *W* гибрида была около 96 % в выкормках 1971 г. В 1972 г. было получено F_2, жизнеспособность выщепившихся рецессивов (*w/w*) была на уровне первоначально полученной мутантной линии. Отсюда напрашивался вывод, что возрастание жизнеспособности мутантов в ряду поколений связано с изменением генотипической среды при отборе, а не с изменением эффекта гена *w.* Анализ этих результатов привел Владимира Александровича к формулировке новой гипотезы генетических причин гетерозиса. Он предположил, что у полулетальных мутантов, к которым относилась и рецессивная мутация *white*, выживают только те носители, которые несут гены, компенсирующие негативный эффект поврежденного гена. Длительный отбор на жизнеспособность в таких линиях приводит к формированию компенсационного комплекса генов (ККГ). При гибридизации с нормой в F_1 негативный эффект мутации будет компенсирован экспрессией нормального аллеля. В свою очередь, ККГ проявит свое действие в форме мощного развития гибридов. Владимир Александрович писал об этом: «Избыточное количество благоприятных генов, неуравновешенное полулеталью, вызовет вспышку жизнедеятельности, что и приведет к повышенной стойкости и более мощному развитию признаков или, одним словом, к гетерозису» (Струнников, 1983. С. 36). Сам же он подчеркивал, что предлагаемая гипотеза не противоречит классическим – доминирования и сверхдоминирования. Она их дополняет, объясняя, почему необходим длительный процесс гомозиготизации (самоопыления) исходных для гетерозисной технологии линий. Более того, его гипотеза позволяет активно и целенаправленно вести процесс создания исходного материала

для гибридной селекции, особенно у растений. Так В.Д. Наволоцкий, используя его подход, создал целую серию сортов у ячменя (Наволоцкий, 1989). Здесь хотелось бы напомнить, как после всех перипетий, связанных с преследованием генетиков, Владимир Александрович советовал вести исследования на стыке практики и генетики.

Развивая идею В.А. Струнникова, нам удалось показать, что гетерозис, наблюдаемый у потомков от скрещивания некоторых мутантов с исходной формой, также связан с эффектом компенсационного комплекса генов (Соколов, 1990а, б). Позже, в рамках выполнения гранта РФФИ, мы выявили две группы сцепления, с которыми сцеплены главные гены, входящие в комплекс, но привязать их к конкретным хромосомам не смогли (Тараканова, Соколов, Не опубл.). Дело в том, что в этот момент случился казус – у гороха генетически тестировалось 8 групп сцепления при наличии 7 хромосом. Мы добросовестно написали о проблеме интерпретации наших результатов, что привело к потере гранта. У чиновников нет сомнений, и интерпретация всегда однозначна, а результаты только положительны! Здесь необходимо подчеркнуть, что в МГУ аналогичная работа на горохе велась Сергеем Александровичем Гостимским. Он с коллегами также показал наличие высокой комбинационной способности у некоторых хлорофильных мутантов при скрещивании с исходной формой (Гостимский и др., 1987).

Фотографию в наше сообщение нам прислала дочь Владимира Александровича – Лариса Владимировна, за что мы искренне ей благодарны. Нам думается, что это очень хорошая иллюстрация живого ума замечательного ученого – истинного друга парадоксов.

ЛИТЕРАТУРА

Гостимский С.А., Хартина Г.А., Багрова А.М. Селекция гороха на высокую комбинационую способность на фоне полулетального рецессивного гена хлорофильной недостаточности // Докл. АН СССР. 1987. Т. 294. № 5. С. 1228–1232.

Gostimskii S.A., Khartina G.A., Bagrova A.M. Breeding of pea for high combinational potential against the background of the semilethal recessive gene for chlorophyll deficiency // Dokl. AN SSSR. 1987. V. 294. No. 5. P. 1228–1232. (In Russian).

Наволоцкий В.Д. Селекция ярового ячменя для условий недостаточного увлажнения: Автореф. дис … д-ра с.-х. наук. Ленинград, 1989. 35 с.

Navolotskii V.D. Breeding of spring barley for insufficient watering conditions: Doctoral (Agric.) Dissertation. Leningrad, 1989. (In Russian).

Соколов В.А. Локализация мутантного гена, контролирующего пигментацию типа *chlorotica* у гороха // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308. № 5. С. 1244–1246.

Sokolov V.A. Localization of the mutant gene controlling chlorotica coloration in pea // Dokl. AN SSSR. 1989. V. 308. No. 5. P. 1244–1246. (In Russian).

Соколов В.А. Биометрическое изучение гетерозиса // Докл. АН СССР. 1990а. Т. 315. № 2. С. 491–494.

Sokolov V.A. Biometric study of heterosis // Dokl. AN SSSR. 1990. V. 315. No. 2. P. 491–494. (In Russian).

Соколов В.А. Компенсационный комплекс генов – причина гетерозиса у гороха // Докл. АН СССР. 1990б. Т. 310. № 5. С. 1242–1244.

Sokolov V.A. Compensation complex of genes is the cause of heterosis in pea // Dokl. AN SSSR. 1990. V. 310. No. 5. P. 1242–1244. (In Russian).

Струнников В.А. Возникновение компенсационного комплекса генов – одна из причин гетерозиса // Журн. общ. биологии. 1974. Т. 35. № 5. С. 666–677.

Strunnikov V.A. Emergence of the compensation gene complex is one of the heterosis causes // Zhurn. Obshch. Biol. 1974. V. 35. No. 5. P. 666–677. (In Russian).

Струнников В.А. Генетический анализ повышенной гетерозисности гомозиготных по всем локусам партеногенетических самцов тутового шелкопряда // Докл. АН СССР. 1976. Т. 227. № 6. С. 1457–1460.

Strunnikov V.A. Genetic analysis of the elevated heterosis potential in parthenogenetic silkworm males homozygous for all loci // Dokl. AN SSSR. 1976. V. 227. P. 1457–1460. (In Russian).

Струнников В.А. Природа гетерозиса: ее научное и практическое значение // Вестн. с.-х. науки. 1983. № 1. С. 34–40.

Strunnikov V.A. The nature of heterosis: its academic and practical significance // Vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki. 1983. No. 1. P. 34–40. (In Russian).

Струнников В.А. Шелковый путь. М.: Наука, 2004.

Strunnikov V.A. Shelkovyi Put (Silk Road). M.: Nauka, 2004. (In Russian).

East E.M. Inbreeding in corn // Rep. Conn. Agric. Exp. Stn. 1908. P. 419–428.

El-Sayed A.M., Scarborough P., Seemann L., Galea S. Social network analysis and agent-based modeling in social epidemiology // Epidemiologic Perspectives and Innovations. 2012. V. 9. No. 1. P. 1.

Hageman R.H., Leng E.R., Dudley I.M. A biochemical approach to corn breeding // Adv. Agronomy. 1967. V. 19. P. 45–86.

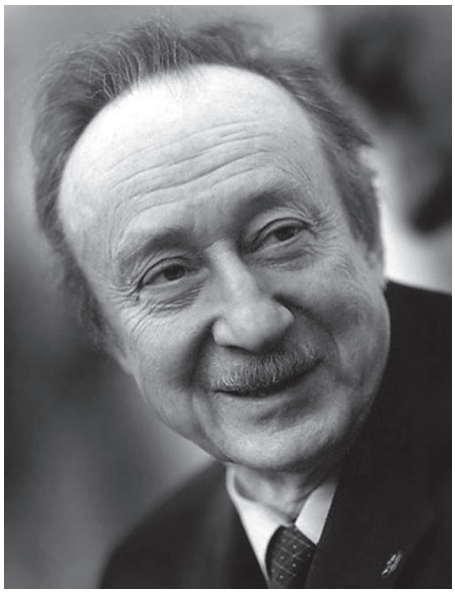
Jones D.F. Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis // Genetics. 1917. V. 2. P. 466–479.

Shull A.F. The influence of inbreeding on vigor in *Hydatina senta* // Biol. Bull. 1912. № 24. P. 1–13.

Shull G.H. What is «heterosis»? // Genetics. 1948. V. 33. P. 439–446.

Social Epidemiology / Eds L.F. Berkman, I. Kawachi, M. Glymour. Oxford Univ. Press, 2014. 640 p.

80 ЛЕТ АКАДЕМИКУ РАН СЕРГЕЮ ВАСИЛЬЕВИЧУ ШЕСТАКОВУ



23 ноября 2014 г. исполнилось 80 лет выдающемуся ученому, организатору науки и педагогу, почетному члену Вавиловского общества генетиков и селекционеров, главному редактору журнала «Генетика» академику РАН Сергею Васильевичу Шестакову, в разные годы возглавлявшему кафедру генетики и селекции Московского государственного университета, Институт общей генетики РАН, Международный учебно-научный биотехнологический центр МГУ.

В середине 1960-х годов активно происходило восстановление генетики в СССР. В 1965 г. было принято решение о создании Всесоюзного общества генетиков и селекционеров (ВОГиС), а в 1966 г. в Москве прошел учредительный съезд ВОГиС, ученым секретарем которого стал молодой ученый, преподаватель кафедры генетики и селекции биолого-почвенного факультета МГУ Сергей Васильевич Шестаков. На учредительном съезде Сергей Васильевич отвечал за организацию заседаний, подготовку устава общества и проведение выборов Центрального совета и впоследствии принимал активное участие в деятельности ВОГиС, в том числе в восстановлении его после распада СССР. В настоящее время в Российской Федерации преемником Всесоюзного общества генетиков и селекционеров является Вавиловское общество генетиков и селекционеров, а Сергей Васильевич является его почетным членом и членом президиума Центрального совета ВОГиС.

В 1980 г. Сергей Васильевич Шестаков был избран заведующим кафедрой генетики и селекции МГУ и за последующие годы руководства кафедрой фактически сформировал ее современный облик, уделяя особое внимание оснащению кафедры первоклассным оборудованием, открыл путь для развития в МГУ новых научных направлений, включая генную инженерию, генетику соматических клеток, генетику фотосинтеза и азотфиксации. Под руководством С.В. Шестакова на кафедре проводилась большая работа по повышению квалификации преподавателей вузов и сотрудников сельскохозяйственных институтов.

В 1987 г. С.В. Шестаков был избран членом-корреспондентом АН СССР по специальности

«общая биология», а весной 1988 г. он стал директором Института общей генетики имени Н.И. Вавилова (ИОГен), в котором на тот момент требовалось неотложное решение ряда административных и научно-организационных задач. В короткие сроки была разработана государственная научно-техническая программа «Приоритетные направления генетики», реализация которой позволила осуществить прорыв в модернизации материально-технической базы института, был построен новый корпус института и оптимизированы структура и его научные планы. В этот же период С.В. Шестаков становится председателем Научного совета РАН по проблемам генетики и селекции.

После успешной реорганизации института Сергей Васильевич вернулся в МГУ, где возглавил Международный биотехнологический центр МГУ и активизировал участие кафедры генетики в международном сотрудничестве. В 2003 г. С.В. Шестаков содействовал организации филиала ИОГен в Санкт-Петербурге. В 2004 г. Институт общей генетики и кафедра генетики МГУ совместными усилиями осуществили организацию и проведение третьего, а в 2009 г. – пятого съезда ВОГиС.

Существенен вклад С.В. Шестакова в издательскую деятельность и популяризацию научных знаний. Он являлся автором сценариев ряда учебных фильмов, ответственным редактором 15 монографий, учебных пособий, научных сборников, переводных изданий. В 1977–1988 гг. он входил в состав Научно-методического совета по пропаганде биологических знаний при правлении Всесоюзного общества «Знание», секции «Биологическая литература» Редакционно-издательского совета АН (РИСО), в редакционную коллегию по изданию международной переписки академика Н.И. Вавилова, в число редакторов раздела «Бактериология» Краткой медицинской энциклопедии, был заместителем главного редактора издания «Генетический словарь» БСЭ, редактором ежегодника «Успехи современной генетики». С 2013 г. С.В. Шестаков являлся членом редакционного совета по изданию «Большой Российской Энциклопедии», был участником редакционных коллегий и редакционных советов ряда журналов (в том числе «Известия Академии наук СССР, серия биологическая»; «Успехи современной биологии»; «Вестник МГУ, серия 16, биология»; «Вавиловский журнал генетики и селекции», «Экологическая генетика», «FEMS Microbiology Reviews», «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология»; «Биополимеры и клетка», «Journal of Biosciences» и др.), а в 2012 г. Сергей Васильевич стал главным редактором журнала «Генетика».

Заслуги С.В. Шестакова в педагогической и научно-организационной работе были отмечены грамотами Совета Министров СССР, ВЦСПС и ЦК ВЛКСМ, Ленинского райкома КПСС г. Москвы, Минсельхоза СССР, Минвуза СССР, Российской академии наук, правления Всесоюзного общества «Знание»; знаками победителя социалистического соревнования, памятными медалями ВАК СССР, Минвуза СССР, ВОГиС; нагрудными юбилейными знаками МГУ, Московского общества испытателей природы; почетным знаком Высшей школы СССР «За отличные успехи в работе»; дипломами правительства Москвы в области естественных наук и технологий в сфере образования.

Работа С.В. Шестакова в широком диапазоне биологических проблем с различными объектами, с решением комплексных экспериментальных задач всегда отличалась большой новизной, высоким методическим уровнем, глубиной анализа полученных результатов, высокой степенью интегрированности в мировую науку. В работах С.В. Шестакова и его научной школы можно выделить несколько основных направлений, по которым были выполнены исследования, получившие международное признание: генетика цианобактерий; молекулярная генетика фотосинтеза; генетика систем азотного метаболизма; азотфиксации и метаболизма водорода; генетика, биохимия и биотехнология микроорганизмов; радиационная генетика; генетика растений; эволюционная генетика.

Заслуги С.В. Шестакова в науке получили международное признание и были отмечены высокими званиями и премиями. В 1987 г. он получил вместе с академиком Е.Н. Кондратьевой, М.В. Гусевым, А.Б. Рубиным и др. Государственную премию СССР за работы в области биологии и биотехнологии фотосинтезирующих микроорганизмов. В 1995 г. он был удостоен Ломоносовской премии 1-й степени

(МГУ) за работы по молекулярной генетике фотосинтеза и азотфиксации, в 1997 г. награжден золотой медалью имени Н.И. Вавилова Российской академии наук за цикл работ по генетике и геномике цианобактерий, в 2003 г. получил премию издательства «МАИК-Интерпериодика» за публикации по генетике фотосинтезирующих организмов. В 2000 г. он был удостоен серебряной медали Международного биографического центра в Кембридже (Англия), в 2006 г. – медали Пауля Эрлиха (ФРГ), в 2009 г. – нагрудного знака «Naturalistae Eminenti». В 1999 г. он был избран в Международную академию наук (IAS). В 1997 г. С.В. Шестакову присвоили звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации», в 2011 г. – звание «Заслуженный работник высшей школы РФ», в 2000 г. – звание «Заслуженный профессор Московского университета».

В 2000 г. он был избран действительным членом Российской академии наук.

Генетическое сообщество России желает Сергею Васильевичу доброго здоровья и дальнейших творческих успехов.

Президиум Центрального совета
Вавиловского общества генетиков и селекционеров

Федеральное государственное унитарное предприятие «ПОЧТА РОССИИ»

Бланк заказа периодических изданий Ф. СП-1

АБОНЕМЕНТ на газету / **журнал** **4 2 1 5 3**

(индекс издания)

Вавиловский журнал

(наименование издания)

генетики и селекции

Количество Комплектов

на 20__год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Куда

(почтовый индекс) (адрес)

Кому

(фамилия, инициалы)

---------- Линия отреза ----------

ПВ | Место | Литер

ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА **4 2 1 5 3**

(индекс издания)

На газету / журнал **Вавиловский журнал генетики и селекции**

(наименование издания)

Стоимость

подписки	руб.	Кол-во комп-лектов	
переадресовки	руб.		

на 20__год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

	город
	село
почтовый индекс	область
	район
код улицы	улица
дом / корпус	квартира

Фамилия И.О.

Отредактировано и подготовлено к печати
в редакционно-издательском секторе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева
Дизайн: А.В. Харкевич
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Подписано в печать 25.12.2014 г.
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 30,2. Уч.-изд. л. 28,5
Тираж 200. Заказ 330

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН»
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2