

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВЕДЕНИЯ ЖИВОТНЫХ:
ВОСПРИЯТИЕ ВНЕШНИХ СТИМУЛОВ,
ДВИГАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ

УДК 612.8, 159.91

СВЯЗЬ УРОВНЕЙ BDNF В МЕДИАЛЬНЫХ ЗОНАХ
ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ КРЫС ПРИ НАУЧЕНИИ С МОТИВАЦИЕЙ
ФОРМИРУЕМОГО ПОВЕДЕНИЯ: ДОСТИЖЕНИЕ/ИЗБЕГАНИЕ

© 2025 г. А. И. Булава^{1, 2, *}, Ю. И. Александров¹

¹Лаборатория психофизиологии имени В.Б. Швыркова, ФГБУН «Институт психологии РАН», Москва, Россия

²НОЧУ ВО «Московский институт психоанализа», Москва, Россия

*e-mail: bulavaai@ipran.ru

Поступила в редакцию 02.10.2024 г.

После доработки 11.12.2024 г.

Принята к публикации 11.12.2024 г.

В статье приведены результаты сравнения выраженности изменений молекулярных маркеров системогенеза при актуализации систем доменов опыта достижения и избегания, отличающихся уровнем вовлечения стресс-реализующих механизмов. С помощью анализа содержания нейротрофического фактора мозга (BDNF) в медиальных зонах префронтальной коры были получены различия, обусловленные мотивацией формируемого поведения: достижения или избегания. Работа проведена на взрослых крысах Long Evans. BDNF выявляли непрямым иммунопероксидазным методом на криогенных срезах мозга. После предварительного поведенческого фенотипирования были сформированы две группы обучения поведению нажатия на педаль: 1) для запуска кормушки и получения пищи; 2) для отключения тока и избегания боли. Количественный анализ иммунореактивности в прелимбической и инфралимбической зонах префронтальной коры выявил значимо меньшее число BDNF-иммунопозитивных клеток у животных группы обучения поведению избегания по сравнению с группой обучения поведению достижения. Также обнаружена связь уровня BDNF с индивидуальными различиями, такими как тревожность и исследовательская активность. Делается вывод о вовлечении медиальных зон префронтальной коры в обеспечение поведения достижения, а также поведения избегания, но в значимо меньшей степени. Обсуждается вероятная роль стресс-индуцированного нейровоспаления в полученных различиях.

Ключевые слова: системогенез, поведенческое фенотипирование, обучение, достижение/избегание, стресс, медиальная префронтальная кора, нейротрофины, BDNF

DOI: 10.31857/S0044467725010091

Ранее нами было показано, что реализация сходных актов, направленных на достижение противоположных результатов – избегания угрозы или приближения к цели, – у людей и животных различается на уровне как поведенческих, так и нейрофизиологических показателей (Alexandrov, Sams, 2005; Александров, 2009; Sozinov et al., 2012; Bulava et al., 2016; Булава, Гринченко, 2017; Булава и др., 2020). Кроме того, при исследовании динамики амплитудных характеристик вызванных потенциалов электроэнцефалограммы человека в поведении приближения/избегания нами были обнаружены аргументы в пользу предположения о том, что динамика процессов обучения в соответствующих доменах опыта (группах систем, объединенных общностью результатов), то есть включение вновь образующихся систем в сравниваемые домены,

различается (Alexandrov et al., 2007). С помощью определения числа и распределения нейронов, экспрессирующих транскрипционный фактор с-Fos – маркера вовлечения нейронов в формируемое поведение (Анохин, 1997; Сварник и др., 2001), – продемонстрированы различия в степени вовлечения разных структур мозга при обучении поведению избегания в сравнении с обучением поведению достижения у животных: достоверное снижение вовлечения ряда зон неокортика (Bulava et al., 2016; Булава и др., 2020; Александров и др., 2022), а также палеокортика (Булава, Гринченко, 2017) у крыс в группе обучения навыку активного избегания стрессового воздействия по сравнению с группой пищедобывательного поведения. Мы предполагаем, что сниженная активность палеокортика, в частности гиппокампальной зоны CA1, в стресс-индуцированном

поведении может препятствовать формированию инструментального поведения избегания у животных после хирургической экстирпации неокортика, в то время как инструментальное пищедобывательное поведение формируется так же быстро, как и у животных с неповрежденным мозгом (см. (Oakley, 1979)). Результаты других исследований также указывают на связанные с типом используемого подкрепления различия нейрофизиологического обеспечения формируемого поведения. Так, с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии (ФМРТ) были продемонстрированы различия в степени вовлечения разных структур мозга у людей при обучении в задачах с поощрением и наказанием (например, (Kim et al., 2015; Steel et al., 2019) и мн. др.). При этом метаанализ результатов ФМРТ-исследований выявил, что, кроме типа подкрепления, модерирующей переменной являлось то, характеризовалась ли задача для испытуемого новизной, или была предварительно им освоена (Jauhar et al., 2021).

В связи со сказанным мы считаем, что системогенез (Анохин, 1948) – формирование новых функциональных систем в процессе обучения, в частности при формировании инструментального поведения, – связан с характеристиками того домена опыта, системы которого актуализируются в данной ситуации, и предполагаем, что мозговое, в том числе молекулярное, обеспечение формируемого поведения будет варьировать в связи с тем, актуализация систем какого домена опыта имеет место в данной ситуации: избегания или достижения, даже если поведение, формируемое для достижения разных целей, внешне сходно. Поскольку системогенез характеризуется вовлечением нейронов в обеспечение формируемого поведения и их специализацией в отношении системы этого поведения (Швырков, 1988), он связан с изменением свойств нейронов на молекулярно-генетическом и морфофункциональном уровнях и сопровождается процессами клеточной дифференциации: (нео)нейрогенеза, дендрито-, аксоно- и синаптогенеза, а также синаптического прунинга (см., например, обзоры (Alexandrov et al., 2018; Alexandrov, Pletnikov, 2022)). Поиск наиболее информативных маркеров выраженности процессов, обусловленных системогенезом, представляет собой сложную задачу. Результаты исследований *in vivo* демонстрируют критически важную роль нейротрофинов, в частности нейротрофического фактора мозга (brain derived neurotrophic factor, BDNF), в нейро- и глиогенезе на протяжении пре- и постнатального онтогенеза ((Lee et al., 2002; Tyler et al., 2002; Gonzalez et al., 2016; Бородинова, Саложин, 2016; Ribeiro, Xapelli, 2021) и мн. др.). Важным результатом взаимодействия нейротрофинов с рецепторами к ним является активация транскрипционных факторов (таких как CREB), изменяющих профиль

экспрессии генов. Особое внимание уделяется двум типам рецепторов к BDNF, которые, согласно исследованиям, являются функциональными (по эффекту) антагонистами: TrkB (tyrosine kinase receptor, тип В) и p75NTR (низкоаффинный泛-neurotrophin receptors), активация которого пептидным предшественником BDNF инициирует процессы апоптоза (Tyler et al., 2002; Gehler et al., 2004; Gonzalez et al., 2016; Бородинова, Саложин, 2016). Кроме того, показаны противоположные эффекты двух основных активных изоформ BDNF: зрелого (mBDNF) и его предшественника (proBDNF). Оба индуцируют множественные сигнальные каскады с участием различных вторичных посредников, при этом mBDNF связывается преимущественно с рецептором группы тирозинкиназ – TrkB, тогда как proBDNF преимущественно взаимодействует с рецептором семейства фактора некроза опухолей – p75NTR (Gehler et al., 2004; Бородинова, Саложин, 2016).

В эмпирическом исследовании с использованием мышей, нокаутированных по гену рецептора p75NTR (Gehler et al., 2004), продемонстрирована плейотропия BDNF относительно морфогенеза дендритов. Инкубация нейронов сетчатки нокаутированных мышей (p75^{-/-}) с нейротрофинами не оказала влияния на длину филоподий, однако предварительно не инкубированные с нейротрофинами нейроны сетчатки (p75^{-/-}) продемонстрировали рост филоподий, сопоставимый с ростом филоподий дендритов, инкубированных с BDNF нейронов контрольных мышей (p75^{+/+}). Авторы пришли к выводу, что свободный рецептор p75NTR (не связанный с BDNF) оказывает негативное влияние на длину филоподий, которое отсутствует у нокаутированных по гену p75NTR мышей (Gehler et al., 2004). Ингибирование нейротрофина BDNF приводит к «аберрантному» нейрогенезу: мутантные нейроны характеризуются меньшим числом, толщиной и длиной дендритных ветвей, а также меньшей плотностью дендритных шипиков (Gao et al., 2009).

Интратекальное введение BDNF в спинной мозг крыс с поврежденным позвоночником способствовало обучению в задаче формирования поведения избегания электроболевого раздражения. Когда лапа крысы вытягивалась за пределы установленного порога, по ней наносили удар током, однако при введении в спинной мозг BDNF наблюдалось постепенное увеличение продолжительности сгибания лапы, что приводило к минимизации воздействия тока (Gómez-Pinilla et al., 2007). В то же время интракраниальное введение ингибиторов BDNF антител в прелимбическую и инфралимбическую зоны медиальной префронтальной коры нарушает формирование памяти о прекращении электроболевого раздражения у крыс в задаче на «угасание» поведения избегания. Животных

обучали находиться на безопасной платформе в течение 10 дней. На 11-й день всем животным через имплантированные в мозг канюли вводили сыворотку (контрольным – без ингибитора) и прекращали подавать ток. Чтобы дотянуться до кор�ушки, депривированные на пищу крысы должны были сойти с платформы. Животные контрольной и опытной групп демонстрировали статистически не различающуюся динамику снижения времени пребывания на платформе в течение экспериментальной сессии в первый день отсутствия тока. Однако на второй день животные группы ингибирования BDNF демонстрировали выраженное поведение избегания, то есть длительность нахождения на платформе не отличалась от таковой в первый день отсутствия тока. На третий день разница во времени нахождения на платформе между контрольной и опытной группами отсутствовала (Rosas-Vidal et al., 2018).

Вышеописанные результаты исследований демонстрируют участие BDNF в регуляции основных процессов клеточной дифференциации нейронов, пролиферации клеток предшественников (Ribeiro, Xapelli, 2021; Gao et al., 2009), их миграции (Snappyan et al., 2009), дендрито- и синаптогенезе (Gehler et al., 2004; Gao et al., 2009; Zagrebelsky et al., 2020), а также апоптозе (Tyler et al., 2002; Gehler et al., 2004; Gonzalez et al., 2016; Бородинова, Саложин, 2016). В связи с этим BDNF может представлять определенный интерес в исследованиях системогенеза.

Префронтальная область коры у человека характеризуется большей продолжительностью созревания по сравнению с другими животными (например, (Perica, Luna, 2023)). Эволюционный тренд на увеличение времени созревания неокортика прослеживается на всех этапах антропогенеза (Qiu et al., 2019). Вероятно, это обусловливает повышенные адаптационные возможности людей, что может выражаться в расширении поведенческого репертуара. Однако данные структуры мозга, сравнительно более молодого онтогенетического возраста, оказываются наиболее чувствительными к отрицательным эффектам интенсивного и/или хронического стресса (Березова и др., 2011; Arnsten et al., 2015; Bulava et al., 2017; Rosas-Vidal et al., 2018; Perica, Luna, 2023). Цитоархитектоника и нейронная организация медиальных областей префронтальной коры в сопоставлении с данными об их эволюционно-морфологическом становлении (Kalimullina et al., 2015), а также указания на стресс-индуцированные изменения, включая морфометрические (например, (Belleau et al., 2019)), наблюдавшиеся в случае развития тревожных и стрессовых расстройств, послужили обоснованием их выбора в качестве зон интереса для нашего исследования.

Таким образом, задачей работы, результаты которой приведены ниже, являлось сравнение выраженности изменений молекулярных маркеров

системогенеза в условиях актуализации систем доменов опыта достижения и избегания, отличающихся уровнем вовлечения стресс-реализующих механизмов, с помощью анализа содержания нейротрофического фактора мозга в медиальных зонах префронтальной коры.

МЕТОДИКА

30 половозрелых особей крыс Long Evans (200–350 г) содержали в стандартных лабораторных индивидуальных клетках ($46 \times 30 \times 16$ см) в виварии при температуре 22 ± 1 °С и 12-часовом цикле день–ночь с неограниченным доступом к воде и пище до этапа формирования поведения в эксперименте.

Поведенческие тесты. Для поведенческого фенотипирования исходного состояния была проанализирована поведенческая активность животных в модифицированных тестах «открытое поле» и «новый объект» в течение 5 минут для каждого теста (Bulava et al., 2023). Оценивалась спонтанная двигательная и исследовательская активность, а также выраженность поведения, связываемого с тревожностью (Antunes, Biala, 2012; Belovicova et al., 2017; Bulava et al., 2023). Время, затраченное на каждое поведенческое событие (продолжительность в секундах), было записано программным обеспечением RealTimer (RPC Open Science Ltd).

Инструментальное поведение. После поведенческого фенотипирования животные были подвержены пищевой депривации при ежедневном контроле веса, суммарная потеря веса за все время эксперимента не превышала 20% от исходной массы. Животные были обучены внешне сходному инструментальному поведению: группа 1 – нажатие на педаль для получения пищи; группа 2 – нажатие на педаль для избегания боли. Группы были сбалансированы по уровню тревожности на основе результатов поведенческого фенотипирования исходного состояния животных. Для формирования инструментального поведения использовали созданную ранее на базе института психологии РАН экспериментальную установку для обучения животных инструментальным навыкам достижения (воды/пищи) и избегания (электроболевой стимуляции). Безопасный уровень стрессирующего воздействия, мотивирующий активный поиск выхода из стрессовой ситуации, подбирался на популяции крыс Long Evans обоих полов на основе анализа вакализации и двигательной активности: 0.9 мА для самок и 1.2 мА для самцов (Bulava et al., 2020). С помощью операционного усилителя и полевого транзистора, работающего в линейном режиме, ток, протекающий через крысу, поддерживается на заданном уровне автоматически, что позволяет регулировать интенсивность стрессирующего

воздействия и нивелировать индивидуальные различия в электрическом сопротивлении кожи у экспериментальных животных (патент на изобретение RU2675174C1, Булава и др., 2017).

Инструментальные навыки, которым обучали животных, внешне сходны, но отличаются результатом – либо получение пищи, либо отключение тока. Обучение проводили в камере размером $25 \times 25 \times 50$ см, оборудованной рычагами-педалями (инструменты для лап), автоматическими кормушками для подачи пищи при нажатии соответствующего рычага (пищедобывающее поведение) и электродным полом для подачи тока, отключаемого нажатием на рычаг (поведение избегания боли). Обучение проводилось ежедневно в течение 30-минутных сессий. Критерий научения считался достигнутым, если животное выполняло десять эффективных циклов «инструмент–результат» подряд. После достижения критерия научения каждое животное выполняло дефинитивное поведение в течение еще пяти дней. Таким образом, общее количество дней, проведенных в установке, варьировало и составило от 12 до 14. Анализ поведения проводили с использованием специального программного обеспечения, разработанного Волковым С.В. (Bulava et al., 2020).

Через семьдесят пять минут после заключительной сессии животные были усыплены ингаляционным наркозом и декапитированы, мозг был немедленно извлечен и фиксирован в парах жидкого азота для хранения при -72 °С. Животных группы интактного контроля брали из вивария в сопоставимое с группами обучения время дня. Временная шкала эксперимента в днях приведена на рис. 1.

Иммуногистохимические процедуры. Выявление BDNF и NeuN на срезах мозга проводили с использованием протокола непрямой иммуногистохимии (IHC-Fr HRP). Коронарные срезы мозга толщиной 16 мкм готовили с использованием криомикротома Leica CM1100 (Leica Microsystems, Германия). С каждого мозга брали 12 срезов в соответствии с данными стереотаксического атласа мозга крысы (Paxinos, Watson, 2009) на координатных уровнях от 4.20 до 3.00 мм от Брегмы (forebrain). Препараты фиксировали в течение 10 минут в 4%-ном растворе параформальдегида при комнатной температуре, отмывали однократным раствором фосфатного буфера (PBS). Антигены демаскировали в цитратном буфере 0.01 М pH 6.0 на водяной бане при температуре буфера 95–99 °С в течение 10 минут. Для подавления неспецифического связывания антител препараты мозга на предметных стеклах преинкубировали в 1%-ном растворе перекиси водорода в PBS, отмывали и преинкубировали в PBS, содержащем 10% сыворотки донора вторых антител в течение 30 мин при комнатной температуре и перекладывали в установку для иммунной реакции на срезах ткани (Thermo Scientific Shandon Sequenza Immunostaining Center), затем инкубировали с первичными поликлональными антителами к BDNF (1:200; PAA011Ra01, Cloud-Clone, КНР) в течение 15 часов. Часть препаратов инкубировали с первичными моноклональными антителами к NeuN (1:100; A60 MAB377, CA, США) в течение того же времени. Отмывали в PBS и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с HRP (1:400, SAA544Rb19, Cloud-Clone, КНР для BDNF; sc-516102, 1:200, Santa Cruz Biotechnology

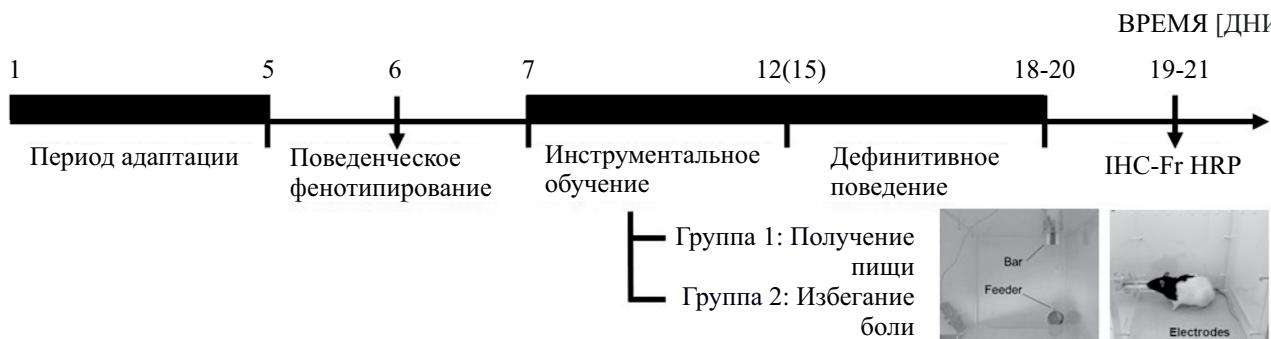


Рис. 1. Временная шкала эксперимента (в днях). Период адаптации после рассаживания животных в индивидуальные клетки вивария – не менее 5 дней. Поведенческое фенотипирование – модифицированные тесты «открытое поле» и «новый объект». Обучение животных навыку нажатия на педаль: группа 1 – для получения пищи, группа 2 – для отключения тока. IHC-Fr HRP – иммуногистохимическое выявление BDNF и NeuN на криостатных срезах мозга с иммунопероксидазным окрашиванием.

Fig. 1. Experimental timeline. Behavioral tests – the open-field and the novel object recognition modified tests. Instrumental learning – animals were trained food-acquisition (Group 1) or footshock-avoidance (Group 2) operant behavior. Pictures from the actual video recording during acquisition of operant behavior (food/footshock). IHC-Fr HRP – frozen brain sections immunoperoxidase staining of BDNF or NeuN.

для NeuN) в течение 2 часов. Отмывали в PBS и помещали в раствор диаминобензидина (DAB) с содержанием 0.3% перекиси водорода в PBS на 3 минуты, отмывали проточной водой. Препараты дегидрировали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали под покровные стекла с использованием монтирующей среды (Thermo Scientific Shandon Mounting Media). Визуализацию и оцифровку микропрепараторов мозга проводили на микроскопе Axio Star Plus (Carl Zeiss, Германия), с помощью камеры Axiocam и программы Zeiss Efficient Navigation (ZEN, Германия). Окрашивание NeuN способствовало определению границ неокортикальных зон. Меченные клетки в исследуемых областях мозга считали с помощью морфометрической программы «Image Pro Plus 3.0» (Media Cybernetics Inc., США).

Статистический анализ. В связи с малыми размерами выборок групп сравнения были применены непараметрические критерии. Наличие статистически достоверных различий между интактной и опытными группами животных определяли с помощью критерия Краскела–Уоллиса (multiple two-sided Kruskal–Wallis test), для оценки различий между конкретными группами применяли критерий Манна–Уитни (Mann–Whitney U Test). Для заключения о значимости, степени (силы) и направленности взаимосвязи между поведенческими показателями и уровнями BDNF в мозге животных разных групп применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (Spearman Rank Order Correlations). Различия считались достоверными при $p \leq 0.05$. Статистические процедуры с построением графиков проведены с использованием статпакета Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уровень нейротрофина BDNF в медиальных зонах префронтальной коры крыс групп обучения поведению достижения и избегания выше, чем у группы интактного контроля (критерий Краскела–Уоллиса, для прелимбической зоны $p = 0.0001$; для инфралимбической зоны $p = 0.00001$).

При этом число BDNF-иммунопозитивных клеток в прелимбической и инфралимбической зонах префронтальной коры значимо ниже у животных группы обучения поведению избегания (рис. 2в, Манна–Уитни, $Z = 2.95$, $p = 0.003$; $Z = 3.15$, $p = 0.001$ соответственно).

Обнаружена связь между индивидуальными различиями, выявленными с помощью поведенческого фенотипирования, и уровнем нейротрофического фактора мозга в зонах префронтальной коры (рис. 2 (г)). Суммарное время

замирания в teste «Открытое поле» отрицательно связано с количеством BDNF в прелимбической (коэф. Спирмена, $r = -0.56$, $p = 0.007$) и инфралимбической (коэф. Спирмена, $r = -0.53$, $p = 0.012$) зонах префронтальной коры. При этом обнаружена сильная прямая связь уровня BDNF с выраженностью исследовательской активности (коэф. Спирмена для прелимбической: $r = 0.78$, $p = 0.00002$; для инфралимбической: $r = 0.77$, $p = 0.00003$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследовательский дизайн с обучением животных поведению избегания, в частности электроболевого раздражения, традиционно используется в качестве инструмента для разработки моделей, воспроизводящих спектр симптомов стрессовых расстройств, включая депрессию и посттравматическое стрессовое расстройство (Bali, Jaggi, 2015). Результаты исследований показывают, что экспериментальные модели на животных, имитирующие стресс-индуцированные состояния, приводят к поведенческим и нейрохимическим изменениям, сопоставимым с таковыми у людей (Goff, 2013; Bali, Jaggi, 2015).

Ранее опубликованные нами результаты анализа выраженности индуцированной новизной экспрессии гена *c-fos*, которая связывается с формированием специализаций нейронов при обучении (Анохин, 1997; Сварник и др., 2001), позволили выявить эффекты хронического стресса в модели неизбегаемого электроболевого раздражения на степень вовлечения цингулярной зоны коры переднего мозга в формирование нового опыта непосредственно после окончания стрессового периода (Bulava et al., 2016).

Кроме того, была показана связь тревожности и исследовательской активности с числом Fos-экспрессирующих нейронов в глубоких и поверхностных слоях дисгранулярной зоны ретроспленальной коры (Bulava et al., 2023). Таким образом, были продемонстрированы количественные различия в числе нейронов структур разного филогенетического возраста при их вовлечении в системогенез, зависящие от индивидуальных различий и степени вовлечения стресс-реализующих механизмов в обеспечение формируемого поведения. Результаты многочисленных исследований (как на людях, так и на животных моделях) свидетельствуют о том, что в стрессе происходит смещение к более примитивным, ранее сформированным моделям поведения, при этом новый высокоиндивидуализированный опыт частично блокируется (Schwabe, Wolf, 2013; Булава и др., 2020; Александров и др., 2022). На нейрональном уровне этот процесс характеризуется временным снижением

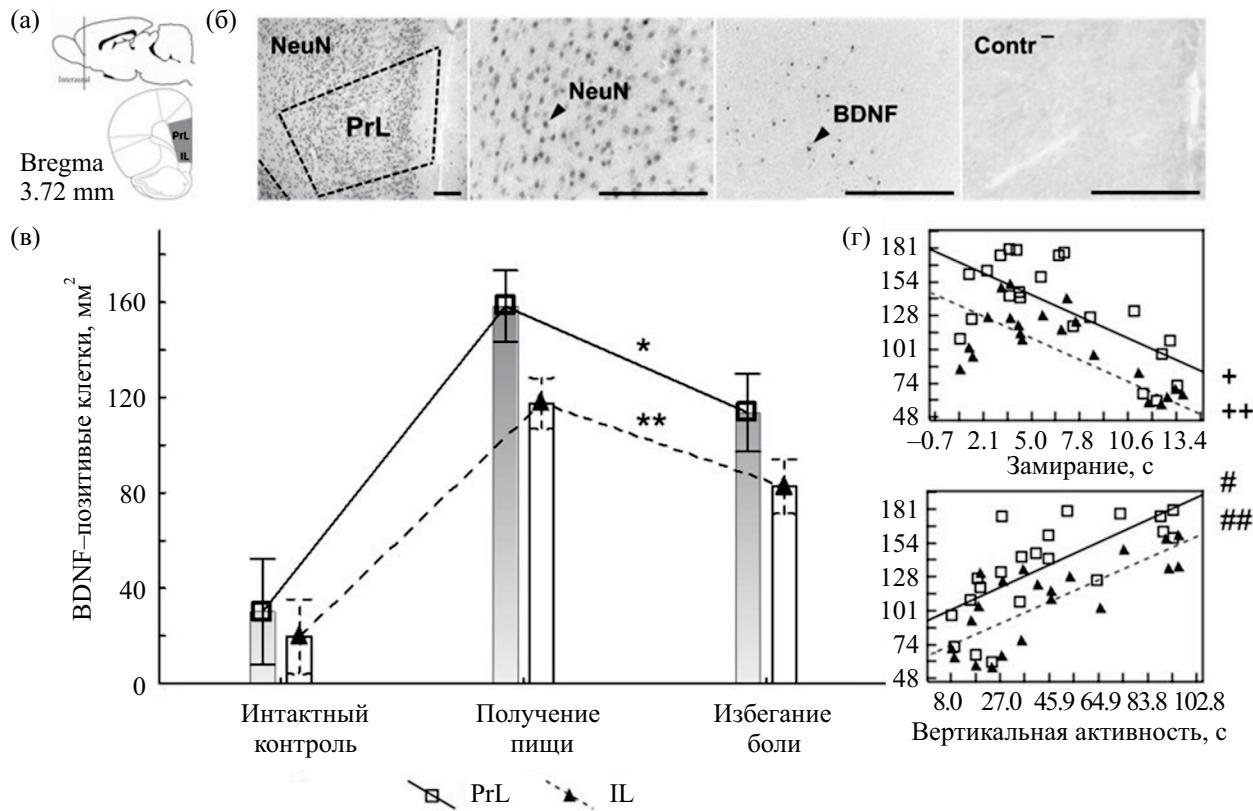


Рис. 2. Число BDNF-иммунопозитивных клеток в зонах медиальной префронтальной коры у животных разных групп. (а) – схема мозга крысы в координате 3.72 мм от Брегмы, сагиттальная (сверху) и фронтальная плоскости. Исследованные зоны префронтальной коры выделены серым: прелимбическая (PrL) и инфралимбическая (IL) области; (б) – representative microphotographs of immunohistochemical staining (HRP DAB) of the medial prefrontal cortex (PrL) and negative controls (Contr, IHC without primary antibodies). Scale bar = 200 μm ; (в) – Связь типа обучения (достижения/избегания) и уровней BDNF в неокортике крыс. Показаны квартили и средние значения интактной и опытных групп. Appetitive – инструментальное пищедобывательское поведение ($n = 13$); Avoidance – инструментальное поведение избегания боли ($n = 11$); Группа пассивного контроля, интактные животные ($n = 6$). Kruskal–Wallis, PrL H(N30) = 19.6, $p = 0.0001$; IL H(N30) = 20.4, $p = 0.00001$. Mann–Whitney, * $Z = 2.95$, $p = 0.003$; ** $Z = 3.15$, $p = 0.001$; (г) – графики корреляции между переменными поведенческого фенотипирования – временем замирания (freeze) и вертикальной активностью (vertical activity) – и числом BDNF-позитивных клеток в зонах префронтальной коры (PrL, IL). Spearman, Freeze *PrL $r = -0.56$, $p = 0.007$; **IL $r = -0.53$, $p = 0.012$. Vertical activity *PrL $r = 0.78$, $p = 0.00002$; #IL $r = 0.77$, $p = 0.00003$.

Fig. 2. (а) – schematic diagram of the rat brain (3.72 mm from Bregma), sagittal and frontal planes, region of interest are indicated; (б) – representative microphotographs of IHC-prepared tissue (HRP DAB) show NeuN and BDNF stained areas of medial prefrontal cortex (PrL), including negative controls (contr, IHC excluding primary antibodies). Scale bar = 200 μm ; (в) – the relationship between learning and level of BDNF in rat neocortex. M \pm SEM are shown. Appetitive – instrumental food-obtaining behavior ($n = 13$); Avoidance – instrumental footshock-avoidance behavior ($n = 11$); Int.contr – intact animals ($n = 6$). Kruskal–Wallis, PrL H(N30) = 19.6, $p = 0.0001$; IL H(N30) = 20.4, $p = 0.00001$. Mann–Whitney, * $Z = 2.95$, $p = 0.003$; ** $Z = 3.15$, $p = 0.001$; (г) – graphs showing the correlations obtained between behavioral variables, such as freeze and vertical activity and the number BDNF-positive cells of the medial prefrontal cortex. Spearman, Freeze *PrL $r = -0.56$, $p = 0.007$; **IL $r = -0.53$, $p = 0.012$. Vertical activity *PrL $r = 0.78$, $p = 0.00002$; #IL $r = 0.77$, $p = 0.00003$.

показателей активности неокортикальных, а также гиппокампальных структур и увеличением показателей активности подкорковых структур, таких как миндалевидный комплекс, ядра таламуса и гипоталамуса (Sawchenko et al., 1996; Ossewaarde et al., 2011; Булава, Гринченко, 2017; Bulava et al., 2017; Булава и др., 2020).

В настоящей работе выявлены различия в уровне нейротрофического фактора мозга в медиальных зонах префронтальной коры в условиях формирования поведения достижения и избегания: BDNF-иммунопозитивных клеток значительно меньше в группе обучения поведению избегания по сравнению с группой обучения поведению

достижения. Также обнаружена связь между индивидуальными различиями, выявленными с помощью поведенческого фенотипирования (такими как тревожность и исследовательская активность), и уровнем BDNF в прелимбической и инфралимбической зонах префронтальной коры. Наши результаты согласуются с данными о наличии обратной связи между уровнем экспрессии BDNF во фронтальной коре и выраженностью стресс-индуцированного депрессивноподобного состояния у крыс в тесте вынужденного плавания (Березова и др., 2011). Предполагается, что нейровоспаление, опосредованное стресс-реализующими механизмами, а именно чрезмерная и/или затяжная продукция нейростероидов с возрастающим дисбалансом про- и противовоспалительных факторов в сторону первых, может лежать в основе развития расстройств тревожно-депрессивного спектра (Aktas et al., 2005; Goff, 2013; Гуляева, 2019; Gulyaeva, 2021), при этом хронический стресс становится основным фактором риска. Стресс-индуцированная мобилизация длительное время характеризуется долгосрочными изменениями на нейроэндокринном и морфофункциональном уровнях, такими как увеличение плотности мембранных рецепторов к глюкокортикоидам в клетках стресс-чувствительных структур мозга (например, обзор (Sapolsky et al., 2000)), уменьшение объема гиппокампа ((Gilbertson et al., 2002; Teicher et al., 2012) и мн. др.), уменьшение объема серого вещества в ряде корковых структур и увеличение – в подкорковых (Van der Werff et al., 2013). На данный момент принято считать эти морфологические особенности следствием развития стрессового расстройства, а не его причиной (о механизмах гибели нервных клеток в результате хронического стресса см. обзоры (Aktas et al., 2005; Kasai et al., 2008; Гуляева, 2019; Gulyaeva, 2021)). Выше мы отмечали многочисленные эффекты зрелого BDNF и его предшественника. Учитывая проапоптотическую активность предшественника BDNF, сравнительно низкий уровень зрелого BDNF при реализации поведения избегания может свидетельствовать о развертывании процессов стресс-индуцированного нейровоспаления. Регуляция транскрипции гена BDNF (включая различные промоторы) осуществляется с участием эпигенетических механизмов, что связывает транскрипционную активность BDNF с формируемым индивидуальным опытом. Участие BDNF в процессах нейропротекции, (нео)нейрогенеза, дендрито- и синаптогенеза, а также апоптоза не позволяет использовать его как показатель выраженности конкретных процессов, имеющих отношение к системогенезу, но позволяет охарактеризовать выраженность требуемых изменений в разных структурах мозга при их вовлечении в системогенез.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно сделать вывод об интенсивном вовлечении медиальных зон префронтальной коры в обеспечение поведения достижения, а также поведения избегания, но в значительно меньшей степени. То есть выраженность изменений в медиальных зонах префронтальной коры ниже при вовлечении в системогенез, характеризующийся актуализацией систем домена опыта избегания, чем с актуализацией систем домена опыта достижения. Однако с учетом ранее продемонстрированного нами снижения числа нейронов неокортика, вовлекаемых в обеспечение поведения избегания при сохранении состояния стресса длительное время, а также проапоптотической активности предшественника BDNF, уровень которого в упомянутом исследовании не контролировался, сравнительно низкий уровень зрелого BDNF при реализации поведения избегания также может свидетельствовать о развертывании процессов стресс-индуцированного нейровоспаления и апоптоза, что требует анализа дополнительных молекулярных маркеров системогенеза, включая показатели выраженности нейровоспаления и нейроапоптоза.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.И. Булава – проведение экспериментов, написание текста статьи; Ю.И. Александров – теоретико-методологическое обеспечение работы, редактирование текста статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-18-00435).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование выполнено в соответствии с Этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (директива 2010/63/EU), протокол исследования одобрен Комитетом по этике Института психологии РАН (решение от 7 июля 2021 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров Ю.И.** Дифференциация и развитие. Теория развития: Дифференционно-интеграционная парадигма. Сост. Н.И. Чуприкова. М.: Языки славянских культур. 2009: 17–28.
- Александров Ю.И., Булава А.И., Бахчина А.В., Гаврилов В.В., Колбенева М.Г., Кузина Е.А., Знаменская И.И., Русак И.И., Горкин А.Г.** Стресс и индивидуальное развитие. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2022. 72 (4): 437–456.
- Анохин К.В.** Молекулярные сценарии консолидации долговременной памяти. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 1997. 47(2): 261–279.
- Анохин П.К.** Системогенез как общая закономерность эволюционного процесса. Бюлл. эксп. биол. и мед. 1948. 26(2): 81–99.
- Березова И.В., Шишкина Г.Т., Калинина Т.С., Дыгало Н.Н.** Поведение в teste вынужденного плавания и экспрессия в мозге крыс генов нейротрофического фактора (BDNF) и антиапоптозного белка Bcl-xl. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2011. 61(3): 332–339.
- Бородинова А.А., Саложин С.В.** Различия биологических функций BDNF и proBDNF в центральной нервной системе. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2016. 66(1): 3–3.
- Булава А.И.** Системогенез: роль транскрипционных факторов. Новые тенденции и перспективы психологической науки. Отв. ред. А.Л. Журавлев, А.В. Юревич. М.: Институт психологии РАН, 2019. 583–593. ISBN978-5-9270-0393-8
- Булава А.И., Волков С.В., Александров Ю.И.** Электродная платформа для электроболевой стимуляции животных. Патент на изобретение от 28.12.2017. RU2675174C1. 2017.
- Булава А.И., Гринченко Ю.В.** Паттерны активаций субрегионов гиппокампа в ситуациях аверсивного и неаверсивного обучения. Биомедицинская радиоэлектроника. М.: Радиотехника. 2017. 2: 5–8.
- Булава А.И., Назарова А.Г., Гуляева Н.В., Александров Ю.И.** Системогенез при психотравмирующем опыте. Способности и ментальные ресурсы человека в мире глобальных перемен. Отв. ред. А.Л. Журавлев, М.А. Холодная, П.А. Сабадош. М.: Институт психологии РАН, 2020. 1527–1537.
- Гаврилов В.В., Онуфриев М.В., Мусеева Ю.В., Александров Ю.И., Гуляева Н.В.** Хронические социальные стрессы изоляции и скученности по-разному влияют на инструментальное поведение и состояние гипоталамо-гипофизарно-адренокортиkalной системы у крыс. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2021. 71 (5): 710–719.
- Сварник О.Е., Анохин К.В., Александров Ю.И.** Распределение поведенчески специализированных нейронов и экспрессия транскрипционного фактора c-Fos в коре головного мозга крыс при обучении. Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2001. 51(6): 758–761.
- Швырков В.Б.** Системная детерминация активности нейронов в поведении. Успехи физиологических наук. 1983. 14(1): 45–66.
- Aktas O., Smorodchenko A., Brocke S., Infante-Duarte C., Topphoff U.S., Vogt J., Prozorovski T., Meier S., Osmanova V., Pohl E., Bechmann I.** Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. Neuron. 2005. 46(3): 421–432.
- Alexandrov Y.I., Klucharev V., Sams M.** Effect of emotional context in auditory-cortex processing. International journal of psychophysiology. 2007. 65(3): 261–271.
- Alexandrov Y.I., Pletnikov M.V.** Neuronal metabolism in learning and memory: the anticipatory activity perspective. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2022. 137: 104664: 1–9.
- Alexandrov Y.I., Sams M.E.** Emotion and consciousness: Ends of a continuum. Cognitive brain research. 2005. 25(2): 387–405.
- Alexandrov Yu.I., Sozinov A.A., Svarnik O.E., Gorkin A., Kuzina E.A., Gavrilov V.V.** Neuronal bases of systemic organization of behavior. Advances in Neurobiology. In: Cheung-Hoi Yu A., Li L. (eds.) Systems Neuroscience. Springer, Cham. 2018. 21: 1–33.
- Antunes M., Biala G.** The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive processing. 2012. 13(2): 93–110.
- Arnsten A.F.T., Raskind M.A., Taylor F.B., Connor D.F.** The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. Neurobiology of Stress. 2015. 1: 89–99.
- Bali A., Jaggi A.S.** Electric foot shock stress: a useful tool in neuropsychiatric studies. Reviews in the Neurosciences. 2015. 26(6): 655–677.
- Belleau E.L., Treadway M.T., Pizzagalli D.A.** The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology. Biological psychiatry 2019. 85(6): 443–453.
- Belovicova K., Bogi E., Csatlosova K., Dubovicky M.** Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. Interdisciplinary toxicology. 2017. 10(1): 40–43.
- Bulava A.I., Osipova Z.A., Arapov V.V., Gorkin A.G., Alexandrov I.O., Grechenko T.N., Alexandrov Y.I.** The Influence of Anxiety and Exploratory Activity on Learning in Rats: Mismatch-Induced c-Fos Expression in Deep and Superficial Cortical Layers. Advances in Neural Computation, Machine Learning, and Cognitive Research VII. Studies in Computational Intelligence. Springer, Cham. 2023. 1120: 323–333.
- Bulava A.I., Svarnik O.E., Alexandrov Yu.I.** Differential forebrain c-fos expression induced by novelty after chronic stress. 24th Multidisciplinary International Neuroscience and Biological Psychiatry Conference. Stress, Brain and Behavior. 2017. 7: 28.
- Bulava A.I., Svarnik O.E., Alexandrov Yu.I.** Reconsolidation of the previous memory: Decreased cortical

- activity during acquisition of an active avoidance task as compared to an instrumental operant food-acquisition task. 10th FENS Forum of Neuroscience. Abstracts. 2016: P044609.
- Bulava A.I., Volkov S.V., Alexandrov Y.I.* A Novel Avoidance Test Setup: Device and Exemplary Tasks. Studies in Computational Intelligence. Springer, Cham. 2020. 856: 159–164.
- Gao X., Smith G.M., Chen J.* Impaired dendritic development and synaptic formation of postnatal-born dentate gyrus granular neurons in the absence of brain-derived neurotrophic factor signaling. *Exp Neurol.* 2009. 215(1):178–190.
- Gehler S., Gallo G., Veien E., Letourneau P.C.* p75 neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity. *J. Neurosci.* 2004. 24(18): 4363–4372.
- Gilbertson M.W., Shenton M.E., Ciszewski A., Kasai K., Lasko N.B., Orr S.P., Pitman R.K.* Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma // *Nat Neurosci.* 2002. 5(11): 1242–1247.
- Goff D.C.* Future perspectives on the treatment of cognitive deficits and negative symptoms in schizophrenia. *World Psychiatry.* 2013. 12(2): 99–107.
- Gómez-Pinilla F., Huie J.R., Ying Z., Ferguson A.R., Crown E.D., Baumbauer K.M., Edgerton V.R., Grau J.W.* BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression. *Neuroscience.* 2007. 148(4): 893–906.
- Gonzalez A., Moya-Alvarado G., Gonzalez-Billaut C., Bronfman F.C.* Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Cytoskeleton (Hoboken).* 2016. 73(10): 612–628.
- Gulyaeva N.V.* Biochemical Mechanisms and Translational Relevance of Hippocampal Vulnerability to Distant Focal Brain Injury: The Price of Stress Response. *Biochemistry (Mosc).* 2019. 84(11): 1306–1328. doi: 10.1134/S0006297919110087.
- Gulyaeva N.V.* Stress-associated molecular and cellular hippocampal mechanisms common for epilepsy and comorbid depressive disorders. *Biochemistry.* 2021. 86(6): 641–656.
- Jauhar S., Fortea L., Solanes A., Albajes-Eizagirre A., McKenna P.J., Radua J.* Brain activations associated with anticipation and delivery of monetary reward: A systematic review and meta-analysis of fMRI studies. *PLoS One.* 2021. 16(8): e0255292.
- Kasai K., Yamasue H., Gilbertson M.W., Shenton M.E., Rauch S.L., Pitman R.K.* Evidence for acquired pregenual anterior cingulate gray matter loss from a twin study of combat-related posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry.* 2008. 63(6): 550–556.
- Kim S.H., Yoon H., Kim H., Hamann S.* Individual differences in sensitivity to reward and punishment and neural activity during reward and avoidance learning. *Social cognitive and affective neuroscience.* 2015. 10(9): 1219–1227.
- Lee J., Duan W., Mattson M.P.* Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 2002. 82(6): 1367–1375.
- Oakley D.A.* Learning with food reward and shock avoidance in neocorticate rats. *Experimental Neurology.* 1979. 63(3): 627–642.
- Ossewaarde L., Qin S., van Marle H.J.F., van Wingen G.A., Fernández G., Hermans E.J.* Stress-induced reduction in reward-related prefrontal cortex function. *NeuroImage.* 2011. 55: 345–352.
- Paxinos G., Watson C., Carrive P., Kirkcaldie M.T.K., Ashwell K.* Chemoarchitectonic Atlas of the Rat Brain. Elsevier. USA. 2009. 375.
- Perica M.I., Luna B.* Impact of stress on excitatory and inhibitory markers of adolescent cognitive critical period plasticity. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2023: 105378.
- Qiu P., Jiang J., Liu Z., Cai Y., Huang T., Wang Y., Liu Q., Nie Y., Liu F., Cheng J., Li Q.* BMAL1 knockout macaque monkeys display reduced sleep and psychiatric disorders. *National Science Review.* 2019. 1: 87–100.
- Ribeiro F.F., Xapelli S.* Intervention of brain-derived neurotrophic factor and other neurotrophins in adult neurogenesis. *Recent Advances in NGF and Related Molecules: The Continuum of the NGF «Saga».* 2021: 95–115.
- Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U.* How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews.* 2000. 21(1): 55–89.
- Sawchenko P.E., Brown E.R., Chan R.K., Ericsson A., Li H.Y., Roland B.L., Kovacs K.J.* The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog. Brain Res.* 1996. 107: 201–222.
- Schwabe L., Wolf O.T.* Stress and multiple memory systems: from «thinking» to «doing». *Trends in Cognitive Sciences.* 2013. 17(2): 60–68.
- Snappyan M., Lemasson M., Brill M.S., Blais M., Massouh M., Ninkovic J., Gravel C., Berthod F., Götz M., Barker P.A., Parent A., Saghatelyan A.* Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 2009. 29(13): 4172–4188.
- Sozinov A.A., Laukka S.J., Tuominen T., Siipo A., Nopanen M., Alexandrov Y.I.* Transfer of simple task learning is different in approach and withdrawal contexts. *Procedia-Social and Behavioral Sciences.* 2012. 69: 449–457.
- Steel A., Silson E.H., Stagg C.J., Baker C.I.* Differential impact of reward and punishment on functional connectivity after skill learning. *Neuroimage.* 2019. 189: 95–105.
- Teicher M.H., Anderson C.M., Polcari A.* Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and

- subiculum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. 109(9): E563–E572.
- Tyler W.J., Alonso M., Bramham C.R., Pozzo-Miller L D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal dependent learning. *Learn. Mem.* 2002. 9(5): 224–237.
- Van der Werff S.J., van den Berg S.M., Pannekoek J.N., Elzinga B.M., van der Wee N.J. Neuroimaging resilience to stress: a review. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2013. 7: 39.
- Zagrebelsky M., Tacke C., Korte M. BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines. *Cell and Tissue Research*. 2020. 382: 185–199.

LEARNING-DEPENDENT BDNF LEVELS IN THE RAT MEDIAL PREFRONTAL CORTEX: APPROACH VS. WITHDRAWAL

A. I. Bulava^{a, b, #}, Yu. I. Alexandrov^a

^a*Shvyrkov Laboratory, Neural Bases of Mind,
Institute of Psychology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
^b*Moscow Institute of Psychoanalysis, Moscow, Russia*
[#]*e-mail: bulavaai@ipran.ru*

This article presents a comparison of changes in molecular markers of systemogenesis related to behavioral motivation: approach versus avoidance, differing in their stress levels. We conducted an immunohistochemical study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the medial prefrontal cortex of adult Long-Evans rats. Two groups were trained in a bar-pressing task: 1) to activate a food dispenser and obtain food (approach); 2) to terminate a shock and avoid pain (avoidance). The avoidance group showed significantly fewer BDNF-immunopositive cells in the prelimbic and infralimbic prefrontal cortex compared to the approach group. Furthermore, BDNF levels correlated with individual differences in anxiety and exploratory activity. We conclude that the medial prefrontal cortex is involved in both approach and avoidance behaviors, but to a significantly lesser extent in avoidance. The potential role of stress-induced neuroinflammation in these differences is discussed.

Keywords: systemogenesis, behavioral phenotyping, learning, approach/withdrawal, stress, medial prefrontal cortex, neurotrophins, BDNF