

# Сенсорная пластичность нейронов ольфакторного эпителия мыши при ассоциативном обучении

А.В. Ромащенко<sup>1, 2</sup>✉, П.Е. Киреева<sup>1</sup>, М.Б. Шаропова<sup>2</sup>, Т.А. Запара<sup>1</sup>, А.С. Ратушняк<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт вычислительных технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

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

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

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

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

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

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

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

Received September 3, 2018  
Revised October 23, 2018  
Accepted October 23, 2018  
© AUTHORS, 2018

✉ e-mail: yuter2006@yandex.ru

## Learning-induced sensory plasticity of mouse olfactory epithelium

A.V. Romashchenko<sup>1, 2</sup>✉, P.E. Kireeva<sup>1</sup>,  
M.B. Sharapova<sup>2</sup>, T.A. Zapara<sup>1</sup>, A.S. Ratushnyak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Computational Technologies, SB RAS,  
Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

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

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

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

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

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

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

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

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

## Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

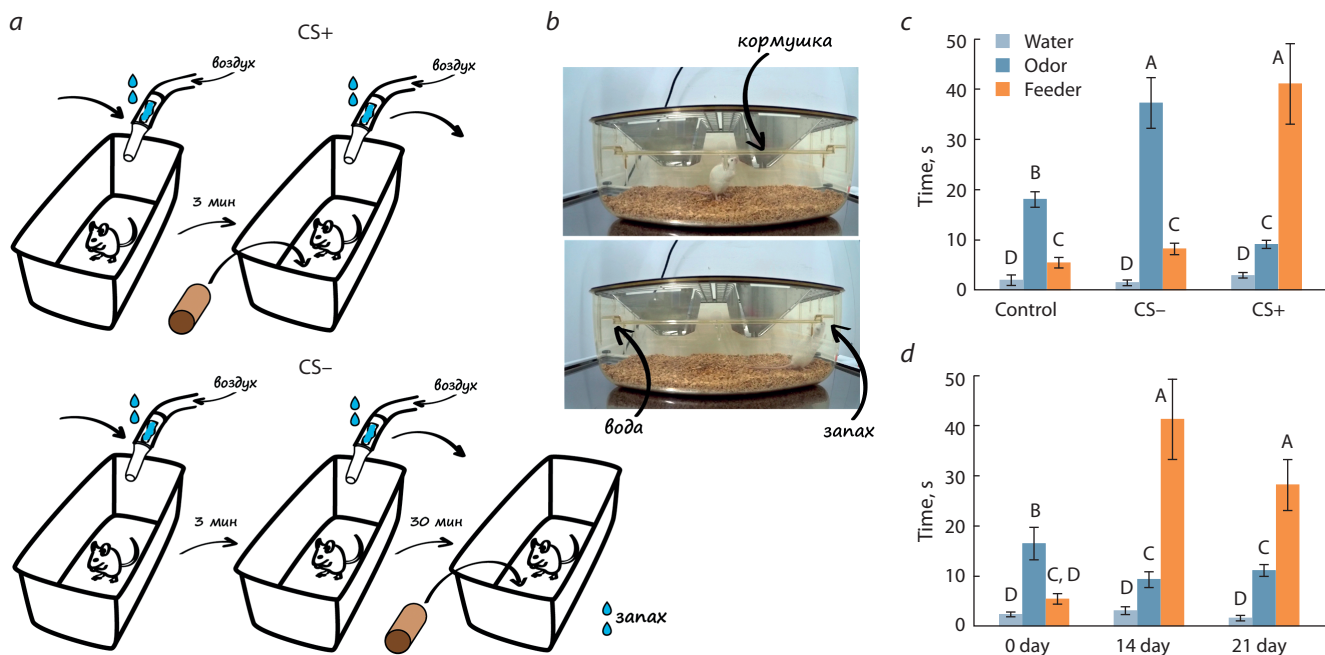
**Статистика.** Для оценки взаимосвязи двух паттернов активации ОЭ использовали непараметрический коэффициент корреляции Спирмана, для множественных сравнений средних – LSD-тест (Least Significant Difference). Данные выражали как среднее  $\pm$  SE.

## Результаты

### Поведенческий ответ мышшь на условный запаховый стимул

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





**Fig. 1.** The influence of associative learning on the behavioral response of mice to an indifferent olfactory stimulus.

(a) Training scheme: The conditional stimulus (CS+) was performed by blowing the cage housing the animal with air containing the stimulating olfactory agent (20  $\mu$ L of 1 % orange oil applied to a piece of filter paper, air flux 250 mL/min) for 3 minutes. After the stimulus, food was presented. Conditioning without reinforcement (scheme below, CS-) was conducted basically as in the CS+ group, but food was presented 30 minutes after the end of the conditioning. (b) The olfactory test: top, the animal sniffs the above-mentioned source of the smell; bottom, the mouse examines the feeder. The stimulus was applied to the filter paper attached to the cage wall. On the opposite wall, a piece of filter paper of the same size with the solvent was attached. (c) The distribution of the time for sniffing filter paper with distilled water (white bars) and orange smell (gray bars) and the time of examination of the feeder (black bars) in animals of different groups, the CS+ group being examined on day 14 of training. (d) Dynamics of the behavioral response to the conditioned odor stimulus (smell of orange oil) of animals of the CS group. Parameters of the behavioral response of CS+ individuals before the start of the experiment (day 0) and after the end of training (days 14 and 21) are presented. a-d – significant differences by the LSD test ( $p < 0.05$ ).

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

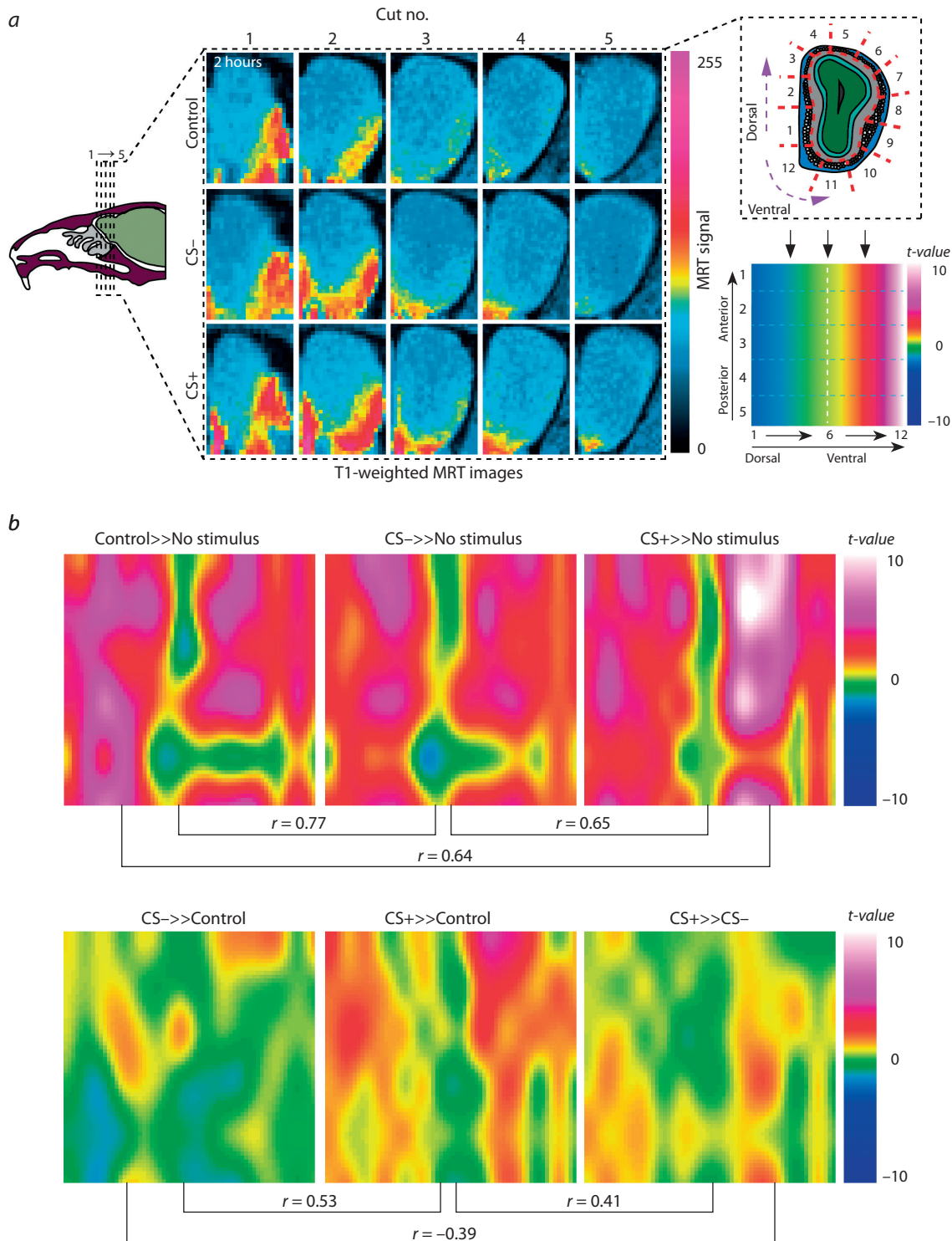
### Исследование активности нейронов обонятельного эпителия мышей в ответ на условный запаховый стимул

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

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

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

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



**Fig. 2.** The influence of associative learning on the patterns of accumulation of manganese ions in the olfactory bulbs (OBs) of mice in response to the smell of orange oil.

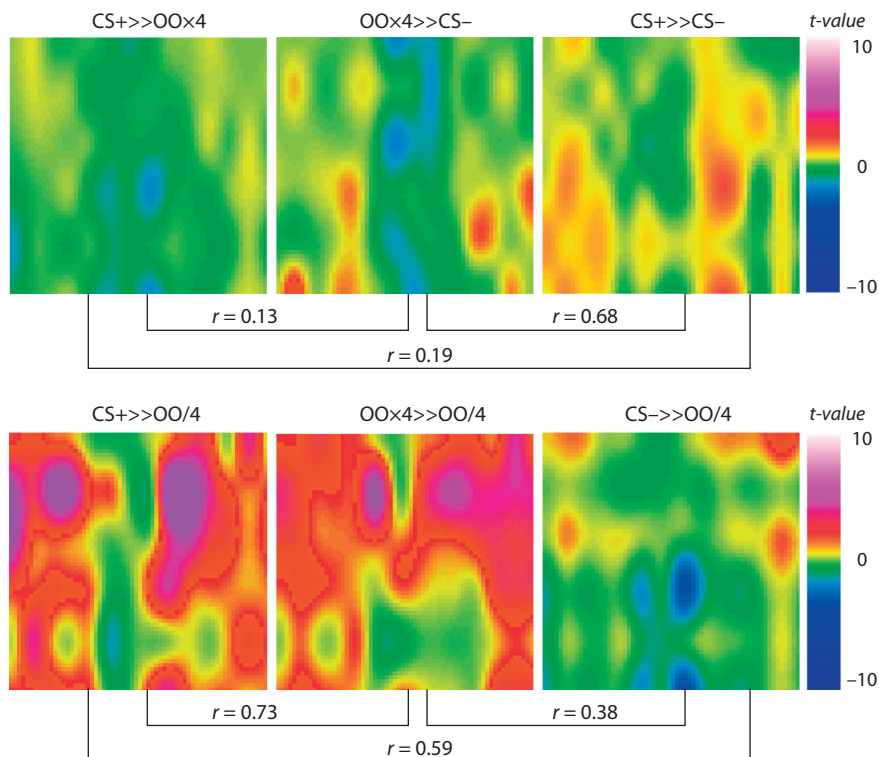
(a) Schematic processing of T1-weighted MRI scans and construction of thermal maps. Scans of mouse OBs of different experimental groups were made 2 hours after the presentation of orange oil and/or intranasal application of manganese chloride. The pseudo-coloring of T1-weighted scans shows the patterns and intensity of contrast agent accumulation in OBs of mice in response to the exposure of the orange oil odor. The red dashed line indicates the boundaries of each of the 12 zones of the globular layer in the cut. (b) Influence of conditioning on the patterns of accumulation of manganese ions in different zones of Balb/c male OBs in response to the smell of orange oil. Pseudo-coloring reflects the significance of the increase ( $t > 0$ ) or the decrease ( $t < 0$ ) of the MRI signal level in various compartments of an OB in response to the olfactory stimulus compared to the individuals administered manganese ions without odor stimulation (upper row). The bottom row presents the thermal maps obtained as a result of intergroup comparisons. The figure shows the correlation coefficients ( $r$ ) of manganese distribution patterns in OBs. >>  $-t\text{-test} > 0$  if the accumulation of the contrast agent in the group animals to the left of the sign was higher than that in the group on the right and  $t\text{-test} < 0$  if otherwise.

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

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

## Обсуждение

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



**Fig. 3.** Effect of the concentration of orange oil smell on manganese accumulation patterns in mouse OBs.

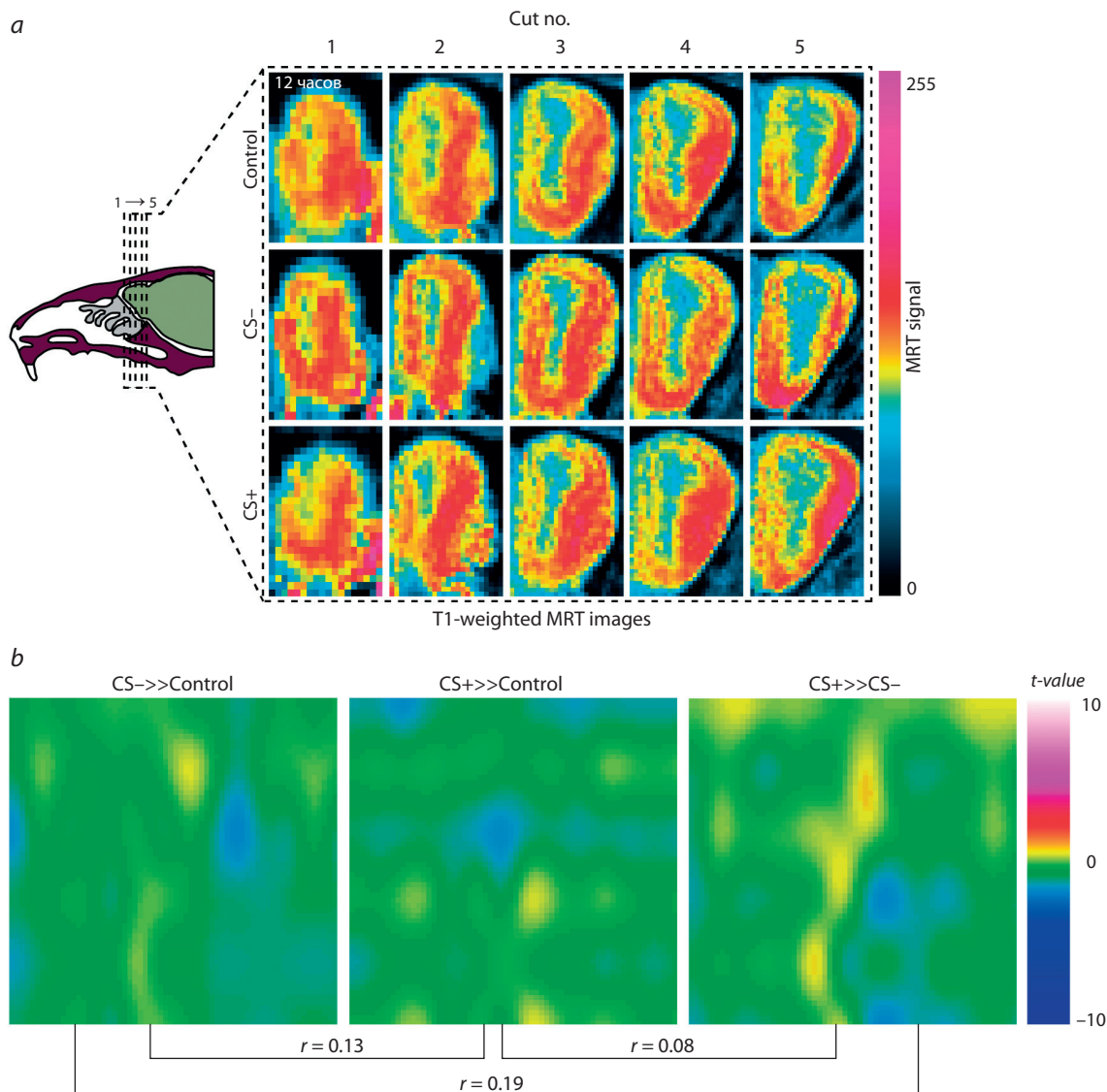
Pseudo-coloring on thermal maps reflects the significance of the increase ( $t > 0$ ) or decrease ( $t < 0$ ) of the intensity of contrast agent accumulation in various zones of the OB in response to the olfactory stimulus. We compared the contrast agent distribution patterns of conditioned (CS–, CS+) and naive animals, where the smell of orange oil (OO) was presented only once at concentrations 4 times larger (OO×4) or 4 times lower (OO/4) than that used in the conditioning process. The figure shows the correlation coefficients ( $r$ ) of manganese distribution patterns in OBs. >>  $-t$ -test > 0 if the accumulation of manganese in the given OB area in the group animals to the left of the sign was higher than that in the group on the right and  $t$ -test < 0 if otherwise.

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

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

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





**Fig. 4.** Comparison of distribution patterns of manganese ions in a mouse OB 12 hours after exposure to the smell of orange oil. (a) Examples of T1-weighted MRI sections of olfactory bulbs of mice from different experimental groups made 12 hours after the intranasal injection of manganese chloride and orange oil presentation. (b) Pseudo-coloring reflects the reliability of the increase ( $t > 0$ ) or decrease ( $t < 0$ ) of the intensity of contrast agent accumulation in various OB compartments in response to the olfactory stimulus. The figure shows the correlation coefficients ( $r$ ) of manganese distribution patterns in OBs.  $>>$  -  $t$ -test  $> 0$  if the accumulation of manganese in the given OB area in the group animals on the left of the sign was higher than that in the group on the right and  $t$ -test  $< 0$  if otherwise.

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

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

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

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

### Acknowledgements

The work was supported by Government procurement IV.35.2.6 for the Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics, Novosibirsk, and the Russian Foundation for Basic Research, project 17-04-01440. Use of the equipment of the Shared Access Center for Genetic Resources of Laboratory Animals (ICG SB RAS) was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project RFMEFI62117X0015.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

Abraham N.M., Vincis R., Lagier S., Rodriguez I., Carleton A. Long term functional plasticity of sensory inputs mediated by olfactory learning. *Elife*. 2014;(3):e02109. DOI 10.7554/eLife.02109.

Aoki I., Wu Y.J.L., Silva A.C., Lynch R.M., Koretsky A.P. In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage*. 2004;22(3):1046-1059. DOI 10.1016/j.neuroimage.2004.03.031.

Bieszczad K.M., Weinberger N.M. Extinction reveals that primary sensory cortex predicts reinforcement outcome. *Eur. J. Neurosci*. 2012; 35(4):598-613. DOI 10.1111/j.1460-9568.2011.07974.x.

Carey R.M., Verhagen J.V., Wesson D.W., Pérez N., Wachowiak M. Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J. Neurophysiol*. 2009;101(2):1073-1088. DOI 10.1152/jn.90902.2008.

Gao E., Suga N. Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: role of the corticofugal system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97(14):8081-8086. DOI 10.1073/pnas.97.14.8081.

Getchell T.V. Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. *Physiol. Rev*. 1986;66(3):772-818. DOI 10.1152/physrev.1986.66.3.772.

Headley D.B., Weinberger N.M. Relational associative learning induces cross-modal plasticity in early visual cortex. *Cerebral Cortex*. 2013;25(5):1306-1318. DOI 10.1093/cercor/bht325.

Jones S.V., Choi D.C., Davis M., Ressler K.J. Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. *J. Neurosci*. 2008; 28(49):13106-13111. DOI 10.1523/JNEUROSCI.4465-08.2008.

Kass M.D., Rosenthal M.C., Pottackal J., McGann J.P. Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. *Science*. 2013;342(6164):1389-1392. DOI 10.1126/science.1244916.

McGann J.P. Associative learning and sensory neuroplasticity: how does it happen and what is it good for? *Learn. Mem*. 2015;22(11):567-576. DOI 10.1101/lm.039636.115.

Moulton D.G., Beidler L.M. Structure and function in the peripheral olfactory system. *Physiol. Rev*. 1967;47(1):1-52. DOI 10.1152/physrev.1967.47.1.1.

Pautler R.G. *In vivo*, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed*. 2004;17(8):595-601. DOI 10.1002/nbm.942.

Pautler R.G., Koretsky A.P. Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2002;16(2):441-448.

Polley D.B., Heiser M.A., Blake D.T., Schreine C.E., Merzenich M.M. Associative learning shapes the neural code for stimulus magnitude in primary auditory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(46):16351-16356. DOI 10.1073/pnas.0407586101.

Schwob J.E., Youngentob S.L., Mezza R.C. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol*. 1995;359(1):15-37. DOI 10.1002/cne.903590103.

Smith K.D.B., Kallhoff V., Zheng H., Pautler R.G. *In vivo* axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2007;35(4):1401-1408. DOI 10.1016/j.neuroimage.2007.01.046.

Weinberger N.M. Reconceptualizing the Primary Auditory Cortex: Learning, Memory and Specific Plasticity. In: Winer J.A., Schreiner C.E. (Eds.). *The Auditory Cortex*. N. Y.: Springer, 2011;465-491. DOI 10.1007/978-1-4419-0074-6\_22.

Zhang X., Firestein S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci*. 2002;5(2):124-133. DOI 10.1038/nm800.

Zhang Y., Zhao Y., Zhu X., Sun X., Zhou X. Refining cortical representation of sound azimuths by auditory discrimination training. *J. Neurosci*. 2013;33(23):9693-9698. DOI 10.1523/JNEUROSCI.0158-13.2013.

### ORCID ID

A.V. Romashchenko [orcid.org/0000-0002-0674-0574](https://orcid.org/0000-0002-0674-0574)  
T.A. Zapara [orcid.org/0000-0002-8144-9090](https://orcid.org/0000-0002-8144-9090)  
A.S. Ratushnyak [orcid.org/0000-0001-5198-8926](https://orcid.org/0000-0001-5198-8926)