

УДК 612.084

СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА: АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПОДХОДЫ

© 2023 г. С. В. Альбертин*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**e-mail: albertinsv@infran.ru*

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 27.10.2022 г.

Принята к публикации 27.10.2022 г.

Рассматриваются возможности различных способов определения локализации малоразмерных клеточных образований мозга у животных. Показаны преимущества электрофизиологического подхода, используемого при локализации тестируемых ядерных структур мозга, их селективного повреждения и последующей гистологической верификации места и размера повреждения мозговой ткани. Предложены методические рекомендации, которые обеспечивают более точное определение координат тестируемых структур мозга, что приводит к значительному сокращению времени на проведение запланированных исследований и затрат на их выполнение за счет отсутствия необходимости включения в эксперимент большого количества подопытных животных.

Ключевые слова: электрофизиологическое картирование мозга, локализация структур, их повреждение и гистологическая верификация

DOI: 10.31857/S0042132423020035, **EDN:** KMAJTR

ВВЕДЕНИЕ

Основная проблема, которая стоит перед экспериментатором при исследовании функций ЦНС, — повышение точности при определении локализации исследуемых образований мозга, необходимой для корректного введения электродов и фармакологических канюль в тестируемые структуры головного и спинного мозга (Li et al., 2016; Sedrak et al., 2020).

Основные причины снижения точности попаданий при использовании стандартного стереотаксического метода определения координат по атласу мозга: индивидуальные анатомические вариации черепа, различия в размерах мозга и вариативное местоположение референтных точек (брегма, лямбда) у животных подопытной группы. Другие причины разброса попаданий электродов в тестируемые структуры мозга — ошибки экспериментатора при использовании стереотаксических аппаратов, а также эксплуатационные неудобства, отмечаемые исследователями у ряда серийно выпускаемых стереотаксических приборов, которые не обеспечивают свободного подхода к тестируемым структурам головного и спинного мозга и точной фиксации головы и позвоночника животных в единой системе стереотаксических координат с учетом естественных анатомических (кифоз, лордоз) и патологических (сколиозы) изгибов позвоночника.

Следует подчеркнуть, что вероятность и выраженность ошибок особенно высока при тестировании компактных ядерных образований головного мозга, а также ядер, имеющих сложную геометрическую форму у животных малого размера (Wang et al., 2020; Liu et al., 2021), что в ряде случаев исключает возможность точного введения электродов и фармакологических канюль в исследуемые ядра мозга и их последующее выключение при использовании стандартных подходов.

Задача публикуемой статьи — показать возможности альтернативных подходов, используемых при установлении локализации тестируемых ядерных структур мозга, их селективного повреждения и последующей гистологической верификации места и размера повреждения.

ВОЗМОЖНОСТИ СТЕРЕОТАКСИЧЕСКОГО ПОДХОДА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ПРИ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПАКТНЫХ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР МОЗГА ЖИВОТНЫХ

При проведении нейрофизиологических исследований обычно используется стереотаксический метод введения электродов в тестируемые структуры по координатам, рассчитанным с помощью атласа мозга различных видов лабораторных животных, которые анатомически привязаны к раз-

личным референтным точкам черепа лабораторных животных (Мещерский, 1961; Jasper, Ajmon-Marsan, 1954; Pellegrino et al., 1979; Paxinos, Watson, 2013). При этом точность попадания электрода в выбранную структуру мозга, а также локализация и размер повреждений мозга, произведенных путем пропускания тока через этот электрод, определяются гистологически после завершения многодневных хронических экспериментов на оперированных животных. Морфологические исследования срезов мозга выявляют в большинстве экспериментальных работ, выполненных с применением стереотаксического метода погружения электродов, значительный разброс в локализации электродов и/или произведенных электролитических повреждений. При этом экспериментатору *post factum* приходится выбраковывать значительное число подопытных животных, повреждения мозга которых не соответствуют задаче эксперимента, что приводит к существенному (многократному) увеличению времени на проведение запланированных исследований и материальных затрат на их выполнение, в частности за счет необходимости включения в эксперимент большего числа животных (Альбертин, 2014).

Малые размеры ядерных образований, например вентромедиального ядра гипоталамуса или прилежащего ядра (*nucleus accumbens septi*), особенно у мелких лабораторных животных (крысы, мыши), чрезвычайно затрудняют их безошибочную локализацию и последующее избирательное выключение с использованием стандартных физиологических процедур, что вызывает значительные сложности при изучении селективной роли данных образований в организации различных форм врожденного и приобретенного поведения животных и в патогенезе неврологических заболеваний.

По расчетам (Мещерский, 1961), для попадания электродов у десяти кроликов в вентромедиальное ядро гипоталамуса, имеющее приблизительно сферическую форму с диаметром 0.8 мм и сопоставимое с размерами отдельных областей прилежащего ядра, следует прооперировать, по крайней мере, 100 животных. Как уже отмечалось, основные причины разброса попаданий при использовании стандартного стереотаксического метода определения координат по атласу мозга — индивидуальные анатомические вариации черепа, различия в размерах мозга и вариативное местоположение референтных точек (брегма, лямбда) у животных подопытной группы, а также ошибки экспериментатора при использовании стереотаксических аппаратов. Вероятность и выраженность ошибок еще выше при тестировании компактных ядерных образований, имеющих сложную геометрическую форму и морфофункциональную организацию, что в ряде

случаев исключает возможность точного введения электродов и фармакологических канюль в исследуемые отделы мозга и их последующее выключение при использовании стандартных подходов.

Так, анатомические (Zahm, Brog, 1992), нейрорхимические (Jongen-Relo et al., 1994) и нейрофизиологические (Mulder, 1996) исследования разных лет показали, что *n. accumbens septi*, входящее в состав вентрального стриатума у крыс, несмотря на свои небольшие размеры, является гетерогенным образованием и состоит из двух отчетливо дифференцируемых отделов: сердцевин (core part) ядра, концентрирующейся вокруг передней комиссуры (*anterior commissura*) и оболочки (*shell part*) — узкого клеточного образования, медиально, вентрально и латерально примыкающего к сердцевине ядра. Некоторые исследователи (Zahm, Heimer, 1993) у крыс выделяют дополнительно ростральный полюс (*rostral pole*) ядра, а в оболочке различают вентролатеральный (*ventrolateral*) и каудомедиальный (*medial shell*) отделы ядра, дифференцируемые по содержанию медиаторов и нейропептидов, а также распределению афферентных и эфферентных проекций (Miyamoto et al., 1980; Beijer et al., 1994).

Гистологический анализ повреждений прилежащего ядра у крыс, выполненных по стереотаксическим координатам атласа мозга, показал наличие у оперированных животных неселективных, преимущественно комбинированных повреждений разного размера, локализованных в различных отделах прилежащего ядра и соседних структурах мозга (Miyamoto et al., 1980; Sutherland, Rodriguez, 1989). Малопродуктивными оказались также попытки нейрорхимического выключения по стереотаксическим координатам различных отделов прилежащего ядра, в частности его медиального отдела (*medial shell part*), с помощью инъекции нейроблокаторов и нейротоксинов (Seamans, Fillips 1994; Bowman, Brown, 1998), которые даже при точном попадании канюли в ядро не могли обеспечить полного выключения медиального отдела прилежащего ядра — вытянутой узкой области, граничащей с латеральным отделом (*core part*) тестируемого ядра, но, напротив, создавали условия для нежелательной диффузии вводимого вещества в соседний латеральный отдел прилежащего ядра и в другие структуры мозга. Следует также учесть, что нейроны медиального отдела прилежащего ядра по-разному реагируют на процедуру повреждения: они чувствительны к электролитическому повреждению ядра, но более устойчивы к нейротоксическому повреждению NMDA (Kodsi, Swerdlow, 1997). Другие исследователи сообщают, что латеральный отдел прилежащего ядра более чувствителен к инъекции квинолиновой (*quinolinic*) кисло-

ты, а медиальный отдел более подвержен влиянию иботеновой (ibotenic) кислоты (Parkinson et al., 1999). Очевидно, что это обстоятельство также осложняет оценку результатов исследований, использующих разные нейротоксины для выключения различных отделов прилежащего ядра.

Вместе с тем, практика физиологического эксперимента показала, что эффективный контроль местоположения электрода в исследуемой структуре может быть основан на регистрации вызванных потенциалов в тестируемом образовании мозга при активации ее сенсорных входов (Альтман, Марусева, 1959) или при электрической стимуляции ее афферентных проекций (Freeman, 1959), осуществляемых во время стереотаксической операции вживления электродов.

В этой связи мы исследовали возможность точной локализации и селективного электролитического повреждения наиболее труднодоступной и наименее исследованной медиальной области (medial shell part) прилежащего ядра с помощью разработанного нами инновационного метода электрофизиологического картирования *n. accumbens* — серийной регистрации фокальных потенциалов, вызванных электрической стимуляцией гиппокампальных проекций, входящих в состав проводящих путей *fimbria-fornix* гиппокампа (Альбертин, 2005; Albertin, Wiener, 2015).

ПРОЦЕДУРА ЛОКАЛИЗАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ МЕДИАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА

Исследование выполнено на восьми подопытных крысах линии Long-Evans. Операцию проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно). Для стимуляции использовали биполярные электроды диаметром 60 мкм, изготовленные из нержавеющей стали и изолированные лаком за исключением кончика длиной 800 мкм. Стимулирующие электроды погружали в мозг в области проводящей системы *fimbria-fornix* с координатами: AP = -1.3 мм; ML = 0.9–1.9 мм; H = 3.7 мм, они топографически соответствовали локализации вентрального субикулярного пути, проекции которого селективно оканчиваются в медиальной области прилежащего ядра. Изготовленные из вольфрама или нержавеющей стали электроды диаметром 100 мкм, предназначенные для регистрации фокальных потенциалов в *n. accumbens*, впоследствии использовали в качестве прижигающих. Свободным от лаковой изоляции остается кончик электрода длиной 500 мкм.

Картирование фокальных потенциалов осуществляли в поисковом режиме с помощью одной или более трековых проходов по координатам атласа мозга (Paxinos, Watson, 2013): AP = 1.0–

1.6 мм; ML = 0.65–0.85 мм; H = 6.4–8.0 мм. Стимуляцию *fimbria-fornix* проводили одиночными прямоугольными импульсами постоянного тока (I = 0.4–0.6 мкА, t = 0.2 мкс) ипсилатерально регистрирующему электроду, введенному в прилежащее ядро.

Фокальные вызванные потенциалы, отводимые в *n. accumbens* монополярно, усиливали посредством дифференциального усилителя Model 1800 (A-M System, Inc., USA) и вводили в компьютер посредством входного устройства CED 1401 (Cambridge Electronic Design, Ltd., UK), где подвергали усреднению по десяти ответам, отводимым от каждой тестируемой точки прилежащего ядра. Интервал между отдельными стимулами — 7 с. Расстояние между отдельными точками отведения — 0.5 мм.

Показателем нахождения электрода в медиальной области *n. accumbens* являлось отведение двухфазного позитивного фокального потенциала с пиковой латентностью 8 и 20 мс (рис. 1), что, по данным (Mulder, 1996), соответствует моносинаптическому и полисинаптическому (путем антимонной активации гиппокампа) ответам нейронов прилежащего ядра при электрической стимуляции проекций вентрального субикулюма, следующих в составе проводящей системы *fimbria-fornix*. Выключение этого пути с помощью электролитического разрушения, инъекции лидокаина или глутантагониста кинуренина, как правило, ведет к исчезновению этих ответов в прилежащем ядре (Mulder, 1996).

При отсутствии в трековой проходке потенциалов с вышеуказанным паттерном ответа координаты электрода менялись, и поиск продолжался в новом треке.

При регистрации двухфазных позитивных потенциалов в трех соседних точках медиальной области ядра, ориентированных в дорсовентральном направлении и разделенных промежутком не менее 0.5 мм, производили процедуру электролитического прижигания путем подачи через данный электрод электрического постоянного тока, монополярно (I = 100 мкА, t = 20 с).

Прижигание в указанных точках ядра производилось последовательно, начиная с наиболее глубоко расположенной точки, и далее осуществлялось в дорсальном направлении. После завершения прижигания в данном полушарии оба электрода извлекались и устанавливались в соответствующие области противоположного полушария, а процедура картирования вызванных потенциалов и электролитического прижигания ядра повторялась в указанном выше порядке.

В исследовании также использовали контрольных животных, которых подвергали при операции тем же манипуляциям (аппликация электрода и стимуляция проводящей системы *fimbria-for-*

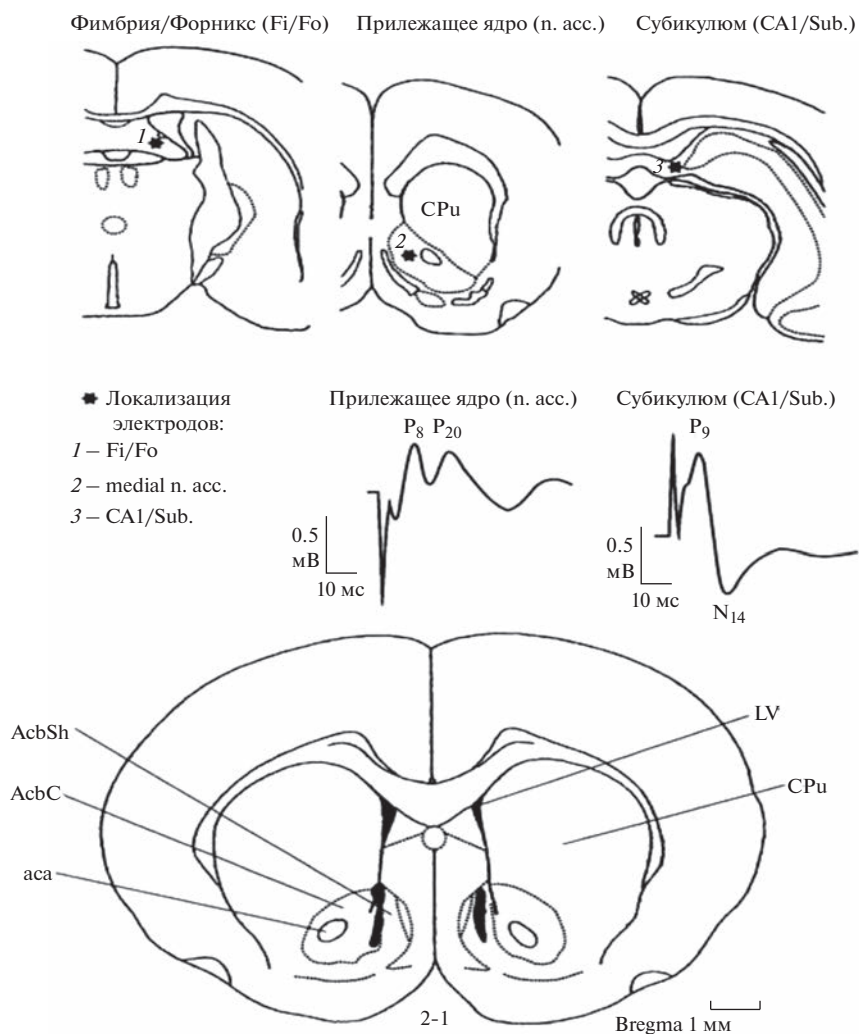


Рис. 1. В верхней части рисунка: схематическое изображение процедуры регистрации фокальных потенциалов в медиальном отделе прилежащего ядра при электрической стимуляции проводящей системы гиппокампа fimbria-fornix (1); medial n. acc. (2); CA1/Sub. (3). Звездочками отмечена локализация электродов. В средней части рисунка: характерный паттерн вызванного ответа в медиальном отделе прилежащего ядра n. accumbens и в субикулярной области CA1/subiculum, где P₈, P₉, P₂₀ – позитивные и N₁₄ – негативный компоненты вызванного ответа. В нижней части рисунка: локализация электрических повреждений в медиальном отделе (AcbSh) прилежащего ядра (крыса 2-1). AcbSh – медиальный отдел н. асс. (medial shell part); AcbC – латеральный отдел н. асс. (core part); aca – передняя комиссура (anterior commissure); LV – латеральные желудочки (lateral ventricle); CPu – каудато-путамен (caudate-putamen). Фронтальные планы срезов мозга соответствуют координате 1.0 мм от брегмы (по: Paxinos, Watson, 2013, с изменениями).

nix) за исключением введения в прилежащее ядро регистрирующего (электролитического) электрода. После операции рану зашивали и животных содержали в изолированных клетках под наблюдением экспериментатора, а также проводили поведенческие исследования. Через 4–5 недель животных под глубоким нембуталовым наркозом проводили транскардиальную перфузию 4%-ным раствором формальдегида в фосфатном буфере. Гистологические срезы мозга изготавливали на замораживающем микротоме и окрашивали крезил-виолетом, для более точной оценки локализации и размера повреждений использовали также нейрогистохимическое окрашивание с помо-

щью маркера-протеина NeuN. При верификации срезов мозга к области повреждения относили лишь участки ядра, не содержавшие сохранившихся тел нервных клеток.

Гистологическое исследование мозга оперированных животных показало, что используемый нами метод электрофизиологического контроля местоположения электродов обеспечил у всех подопытных крыс компактные селективные повреждения в медиальном отделе прилежащего ядра, которые были локализованы в центре тестируемого образования и его периферийной области, граничащей с латеральным отделом н. accumbens.

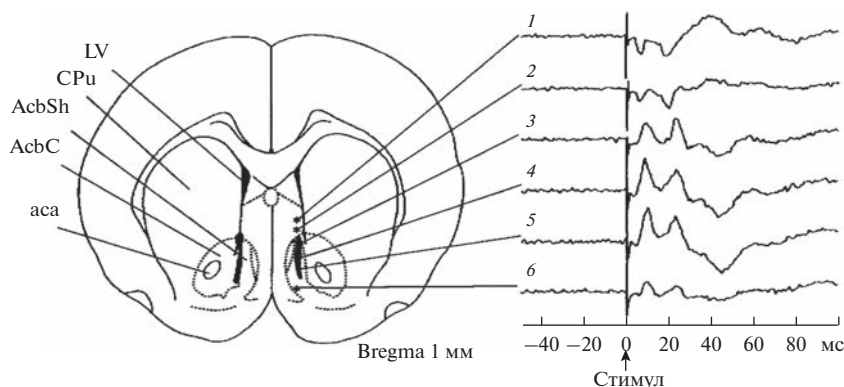


Рис. 2. Реконструкция маркирующих повреждений п. accumbens и соответствующие этим точкам фокальные потенциалы при последовательном перемещении электрода в треке у одной из подопытных крыс. 3, 4, 5 – последовательные отведения с регистрацией двухфазного позитивного вызванного ответа, соответствующие точкам электролитического разрушения п. асс. На рисунке представлены усредненные (10 ответов) значения вызванных потенциалов. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕДИАЛЬНОГО ОТДЕЛА ПРИЛЕЖАЩЕГО ЯДРА

На рис. 2. представлены реконструкция маркирующих повреждений ядра и соответствующие этим точкам фокальные потенциалы при последовательном перемещении электрода в треке у одной из подопытных крыс. Фронтальный план среза соответствует координате 1.0 мм от брегмы (Paxinos, Watson, 2013).

В отведениях 3, 4 и 5 показаны усредненные вызванные ответы с двухфазным положительным потенциалом с пиковой латентностью 8 и 20 мс. В отведении 6 эти ответы резко редуцированы, что соответствует локализации кончика электрода в вентральной области прилежащего ядра. В отведениях 1 и 2 указанные ответы практически отсутствуют, так как электрод находится выше проекционной зоны гиппокампа или выходит за пределы прилежащего ядра (рис. 2).

Анализ поведенческих нарушений, которые были выявлены нами у крыс с электролитическими повреждениями прилежащего ядра, выполненными при использовании электрофизиологического контроля (Альбертин, Винер, 2014; Wiener et al., 2003; Albertin, Wiener, 2015), показал, что сравнительно небольшие электролитические повреждения ядра приводили к более выраженным и однозначным нарушениям, по сравнению с нейрохимическими повреждениями прилежащего ядра, выявленными в других исследованиях (Seamans, Phillips, 1994). Это объясняется тем, что область повреждений в наших опытах топографически точно соответствовала зоне афферентных входов гиппокампальных, а также амигдаларных проек-

ций, которые конвергируют на одни и те же нейроны медиального отдела прилежащего ядра (Groenewegen et al., 1999).

Таким образом, в отличие от нейрохимических повреждений прилежащего ядра, вызванных инъекцией нейротоксинов (Bowman, Brown, 1998), электролитические повреждения в наших опытах обеспечивали выключение не только клеточных тел, но и афферентных проекций, поступающих в тестируемое ядро. Следует отметить, что из восьми животных, составляющих однородную подопытную группу крыс (имеющих одинаковый возраст и вес), реальные значения координат, определенные электрофизиологически и соответствующие точному повреждению тестируемой (medial shell part) области ядра, совпадали у пяти крыс, но лишь у одного животного из группы их значения соответствовали координатам данной области прилежащего ядра, рассчитанным по атласу мозга крысы (Paxinos, Watson, 2013). Таким образом, есть основания полагать, что, наряду с методикой индивидуального электрофизиологического контроля, обеспечивающего в 100% случаев точную локализацию электрода, при наличии большой однородной группы подопытных животных определение точных координат путем электрофизиологического картирования можно проводить в пилотных исследованиях на ограниченном количестве животных и затем использовать полученные значения координат для процедуры выключения тестируемой области мозга у всей группы животных, не прибегая к регистрации вызванных потенциалов у остальных животных. Однако точность повреждений в указанном случае может быть несколько ниже, по сравнению с индивидуальным картированием каждого животного группы. Для обеспечения хороших результатов при пилотном картировании необходимо следить за соблюдением одинаковых условий

проведения операции и процедуры прижигания (фиксация головы животного, схема определения референтных точек, использование одной и той же техники и оборудования, последовательности операции и т.д.), обязательных для всех оперируемых животных.

В заключение остановимся на процедуре гистологической оценки места и размера повреждения мозговой ткани, которую после завершения экспериментов традиционно окрашивают по методу Ниссля с использованием крезил-виолета (cresyl-violet) или тионина (thionin). Следует отметить, что применение метода Ниссля при окраске некоторых мозговых структур, включая прилежащее ядро, может давать неточные результаты. В первую неделю после операции зона электролитического повреждения ядра идентифицируется как хаотическое нагромождение коагулированных нейронов и их остатков с активной пролиферацией глиальных клеток, направленной на очистку зоны повреждения от разрушенных клеточных тел. Поведенческие исследования обычно занимают несколько недель от операции до гистологического контроля. В этот период в месте разрушения завершается процесс очистки и заполнения глиальными клетками зоны повреждения. В результате этого процесса оценка места и зоны компактного повреждения становится трудной задачей, так как при окраске по Ниссля бывает трудно отличить нейроны малого размера от замещающих их глиальных клеток. В этом случае мы рекомендуем в дополнение к методике Ниссля использовать нейрогистохимическое окрашивание с помощью маркер-протеина NeuN для более точной оценки локализации и размера повреждения. Этот протеин обнаружен в ядре и клеточных телах большинства нейронов головного мозга (за исключением клеток Пуркинье мозжечка, митральных клеток обонятельной луковицы и фоторецепторных клеток сетчатки), но отсутствует в глиальных клетках (Mullen et al., 1992; Guselnikova, Korzhevskiy, 2015; Duan et al., 2016). Таким образом, после инъекции протеина зона повреждения точно определяется по отсутствию данного маркера на месте разрушенных клеточных тел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены возможности альтернативных способов определения локализации малоразмерных клеточных образований мозга у животных.

Применение разработанного нами инновационного метода картирования мозга путем регистрации вызванных потенциалов позволяет определить преимущества электрофизиологического подхода, используемого при локализации тестируемых ядерных структур мозга, при их селективном повреждении и при последующей гистологической

верификации места и размера повреждения мозговой ткани с использованием маркер-протеина NeuN. Предложены методические рекомендации, которые обеспечивают более точное определение координат тестируемых структур мозга, а также приводят к значительному сокращению и времени на проведение запланированных исследований, и затрат на их выполнение за счет отсутствия необходимости включения в опыт большого количества животных, что имеет практическое значение при проведении экспериментальных исследований в биологии и медицине.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит проф. А. Бертоза (A. Berthoz) за приглашение провести экспериментальные исследования в Лаборатории физиологии восприятия и двигательной активности Национального центра научных исследований Франции (Laboratoire de physiologie de la perception et de l'activité motrice, Centre national de la recherche scientifique, France) и доктора Н. Кенеш'дю (N. Quenech'du) (Centre national de la recherche scientifique, France) за ознакомление с методикой использования нейрохимического маркер-протеина NeuN для окрашивания гистологических препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования проведены в лаборатории физиологии высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и лаборатории физиологии восприятия и двигательной активности (LPPA, CNRS, France). Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014–2021 гг. (ГП-14, раздел 3).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов с администрацией и сотрудниками Национального центра научных исследований Франции (CNRS, France) при выполнении и обсуждении полученных автором результатов вышеописанного исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием животных, соответствуют этическим стандартам институционального и/или Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Альбертин С.В. Способ моделирования патологии проводящих путей гиппокампа // Бюл. изобр. 2005. № 23 (2 ч.). С. 415. Патент РФ № 2258961.
- Альбертин С.В. Этика физиологического эксперимента // Успехи физиол. наук. 2014. Т. 45. № 4. С. 99–110.
- Альбертин С.В., Винер С.И. Нейрональная активность прилежащего ядра и гиппокампа у крыс при формировании поискового поведения в радиальном лабиринте // Бюл. экспер. биол. мед. 2014. Т. 158. № 10. С. 400–405.
- Альтман Я.А., Марусева А.М. Методика отведения потенциалов от различных отделов слуховой системы кошки в хронических условиях эксперимента // Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова. 1959. Т. 45. № 6. С. 724–729.
- Мещерский Р.М. Стереотаксический метод. Применение в эксперименте и клинике. М.: Медгиз, 1961. 203 с.
- Albertin S.V., Wiener S.I. Neuronal activity in the nucleus accumbens and hippocampus in rats during formation of seeking behavior in a radial maze // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. V. 158 (4). P. 405–409.
- Beijer A.V.J., Witter M.P., Groenewegen H.J. Relationships of hippocampal and amygdaloid inputs to the nucleus accumbens with outputs to the mesencephalic locomotor region in the rat // Eur. J. Neurosci. 1994. Suppl. 7. P. 209.
- Bowman E.M., Brown V.J. Effects of excitotoxic lesions of the rat ventral striatum on the perception of reward cost // Exp. Brain Res. 1998. V. 123. № 4. P. 439–448.
- Duan W., Zhang Y.P., Hou Z. et al. Novel insight into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator // Mol. Neurobiol. 2016. V. 53 (3). P. 1637–1647.
- Freeman W.J. Distribution in time and space of prepyriform electrical activity // J. Neurophysiol. 1959. V. 22. P. 644–665.
- Groenewegen H.J., Mulder A.B., Beijer A.V.J. et al. Hippocampal and amygdaloid interaction in the nucleus accumbens // Psychobiology. 1999. V. 27. P. 149–164.
- Gusel'nikova V.V., Korzhevskiy D.E. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker // Acta Naturae. 2015. V. 7 (2). P. 42–47.
- Jasper H.H., Ajmone-Marsan C.A. Stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. Ottawa: National Research Council of Canada, 1954. 242 p.
- Jongen-Relo A., Voorn P., Groenewegen H.J. Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat // Eur. J. Neurosci. 1994. V. 6. № 8. P. 1255–1264.
- Kodsi M.H., Swerdlow N.R. Reduced prepulse inhibition after electrolytic lesions of nucleus accumbens subregions in the rat // Brain Res. 1997. V. 773. № 1–2. P. 45–52.
- Li Z., Zhang J.-G., Ye Y., Li X. Review on factors affecting targeting accuracy of deep brain stimulation electrode implantation between 2001 and 2015 // Stereotact. Funct. Neurosurg. 2016. V. 94 (6). P. 351–362.
- Liu H., Zhou J., Tian W. et al. DNA methylation atlas of the mouse brain at single-cell resolution // Nature. 2021. V. 598 (7879). P. 120–128.
- Miyamoto M., Saji Y., Nagawa Y. Behavioral changes following lesioning of the nucleus accumbens (ACB) and effects of centrally acting drugs in rats // Nippon Yakurigaku Zasshi. Fol. Pharmacol. Jpn. 1980. V. 76. P. 227–238.
- Mulder A.B. Interaction of inputs and synaptic plasticity in the nucleus accumbens. An *in vivo* electrophysiological study in the rat. PhD thesis. Amsterdam, 1996.
- Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates // Development. 1992. V. 116. № 1. P. 201–211.
- Parkinson J.A., Olmstead M.C., Burns L.H. et al. Dissociations in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive Pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine // J. Neurosci. 1999. V. 19. № 6. P. 2401–2411.
- Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7rd ed. San Diego: Academic Press, 2013. 480 p.
- Pellegrino L.J., Pellegrino A.S., Cushman A.J. A stereotaxic atlas of the rat brain. 2nd ed. N.Y., L.: Plenum press, 1979. 23 p.
- Seamans J.K., Fillips A.G. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesion of nucleus accumbens in rats // Behav. Neurosci. 1994. V. 108. P. 456–468.
- Sedrak M., Alaminos-Bouza A.L., Srivastava S. Coordinate systems for navigating stereotactic space: how not to get lost // Cureus. 2020. V. 12 (6). P. e8578. <https://doi.org/10.7759/cureus.8578>
- Sutherland R.J., Rodriguez A.J. The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory // Behav. Brain Res. 1989. V. 32. P. 265–277.
- Wang Q., Ding S.-L., Li Y. et al. The allen mouse brain common coordinate framework: a 3D reference atlas // Cell. 2020. V. 181 (4). P. 936–953.
- Wiener S.I., Shibata R., Tabuchi E. et al. Spatial and behavioral correlates in nucleus accumbens neurons in zones receiving hippocampal or prefrontal cortical inputs // Int. Congr. Ser. 2003. V. 1250. P. 275–292.
- Zahm D.S., Brog J.S. On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum // Neuroscience. 1992. V. 50. № 4. P. 751–767.
- Zahm D.S., Heimer L. The efferent projections of the rostral pole of the nucleus accumbens in the rat: comparison of the rostral pole projection patterns with those of the core and shell // J. Comp. Neurol. 1993. V. 327. № 2. P. 220–232.

Stereotaxic Method of Brain Loci Localization: The Alternative Approaches

S. V. Albertin*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

**e-mail: albertinsv@infran.ru*

The article discusses the possibilities of the alternative methods for determining the localization of small-sized brain cell formations in animals. The advantages of the electrophysiological approach used in localization of the tested nuclear structures of the brain, their selective damage and subsequent histological verification of the location and size of the damage to the brain tissue are shown. Methodological recommendations are proposed that provide an error-free determination of the coordinates of the tested brain structures, which leads to a significant reduction in the time for conducting planned studies and the costs of their implementation due to the absence of the need to include a large number of animals in the experiment.

Keywords: electrophysiological mapping of the brain, localization of structures, their damage and histological verification