

ПРОФИЛЬ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В НЕЙРОНАХ *IN VITRO* ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ НЕЙРОВОСПАЛЕНИИ

Доминова И.Н.¹, Туркин А.В.¹

¹*Институт живых систем, ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград, e-mail: idominova@kantiana.ru*

Целью данного исследования было определение уровней транскрипции генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса в нейронах коры головного мозга и гиппокампа *in vitro* в ответ на индуцированное нейровоспаление. Исследование проводилось на культурах нейронов, выделенных из соответствующих регионов головного мозга 3-дневных крыс линии Wistar. Индуцирование нейровоспаления осуществлялось посредством воздействия бактериальным липополисахаридом на культуру астроцитов, подготовленную из аналогичных регионов головного мозга 3-дневных крыс линии Wistar, с последующим использованием питательной среды от активированных астроцитов для выращивания нейронов. Анализ уровней транскрипции генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса, осуществлялся с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. В результате проведенного анализа нами были продемонстрированы изменения внеклеточного матрикса на примере тенасцинов, протеогликанов, ламининов, синдеканов, происходящие в нейронах *in vitro* при индуцированном липополисахаридом нейровоспалении. При этом были установлены достоверные различия не только при сравнении контрольных групп с экспериментальными (индуцированное нейровоспаление), но и региональные различия, т.е. различия между корой и гиппокампом, в пределах одной группы (контрольной или экспериментальной). В целом эти изменения указывают, с одной стороны, на развитие функциональной нестабильности нейронов, а с другой – на стремление клеток нивелировать неблагоприятные эффекты от нейровоспаления посредством изменения уровней транскрипции генов компонентов внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, нейроны, нейровоспаление, протеогликаны, ламины, тенасцины, рилин, синдеканы.

PROFILE OF EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS IN NEURONS *IN VITRO* AT INDUCED NEUROINFLAMMATION

Dominova I.N.¹, Turkin A.V.¹

¹*The School of Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, e-mail idominova@kantiana.ru*

The aim of this study was to determine the transcription levels of genes encoding the extracellular matrix components in neurons of the cerebral cortex and hippocampus *in vitro* in response to induced neuroinflammation. The study was conducted on neuron cultures isolated from the corresponding regions of the brain of 3-day-old Wistar rats. Neuroinflammation was induced by the action of bacterial lipopolysaccharide on an astrocyte culture prepared from similar regions of the brain of 3-day-old Wistar rats, followed by the use of culture medium from activated astrocytes for growing neurons. Analysis of transcription levels of genes encoding the components of the extracellular matrix was carried out using reverse transcription-polymerase chain reaction. As a result of our analysis, we demonstrated changes in the extracellular matrix by the example of tenascins, proteoglycans, laminins, syndecans, occurring in neurons *in vitro* with lipopolysaccharide-induced neuroinflammation. Moreover, significant differences were established not only for comparing control groups with experimental (induced neuroinflammation), but also regional differences, i.e. differences between the cortex and hippocampus, within the same group (control or experimental). In general, these changes indicate, on the one hand, the development of functional instability of neurons, and, on the other hand, the desire of cells to neutralize the adverse effects of neuroinflammation by changing the transcription levels of genes of the extracellular matrix components.

Keywords: extracellular matrix, neurons, neuroinflammation, proteoglycans, lamins, tenascins, reelin, syndecans.

Центральная нервная система (ЦНС) управляет всем процессами организма через тонко настроенную нейронную сеть. Эта непрерывная деятельность не может осуществляться сама по себе, доказано, что помощь нейронам в этом оказывают клетки глии,

а также внеклеточный матрикс, представляющий собой трехмерную структуру наподобие сети, которая окружает клетки, и ее свойства определяются особенностями той или иной ткани. При этом в ЦНС внеклеточный матрикс может выполнять несколько функций:

- 1) является биологическим скаффолдом, поддерживающим структуру ЦНС;
- 2) осуществляет контроль диффузии и доступности различных молекул, необходимых для биохимической сигнализации и коммуникации;
- 3) осуществляет контроль биохимических свойств ЦНС [1].

Более того, с внеклеточным матриксом напрямую связана способность тканей к регенерации, поскольку различные нарушения в механотрансдукции или отклонения от нормы в составе внеклеточного матрикса приводят к потере тканями и клетками этой способности; соответствующие иммунный и токсический ответы на инфекционные агенты также определяются правильным соотношением компонентов внеклеточного матрикса [2].

В ЦНС компоненты внеклеточного матрикса синтезируются и секретируются как нейронами, так и клетками глии, при этом качественный и количественный состав внеклеточного матрикса зависит от стадии развития головного мозга, соответственно, и от процессов нейро- и глиогенеза, которые в свою очередь также зависят от состава внеклеточного матрикса. Более того, состав внеклеточного матрикса оказывает влияние на процессы синаптогенеза и на функционирование синапсов, на основании чего была предложена концепция четырехстороннего синапса, одну из ведущих ролей в функционировании которого играет внеклеточный матрикс [3], способный развиваться с образованием специфических перинейрональных сетей (ПНС). Таким образом, внеклеточный матрикс выступает в роли своеобразного посредника между нейронами и астроцитами, благодаря чему может оказывать влияние на работу рецепторов, ионных каналов, передавать диффузные молекулярные сигналы, используя продукты протеолитического расщепления молекул, выделяемых нейронами и астроцитами.

Основными компонентами нейронального внеклеточного матрикса являются хондроитинсульфат протеогликаны лектинового семейства и гепарансульфат протеогликаны, а также тенасцины, ламинины и тромбоспондины, относящиеся к классу гликопротеинов [4].

При этом в структуре ПНС, так же как и в развивающейся ЦНС, наблюдается преимущественно экспрессия таких хондроитинсульфат протеогликанов, как агрекана, бревикана, нейрокана и версикана, при этом экспрессия компонентов ПНС в разных регионах мозга гетерогенна. Предполагается, что хондроитинсульфат протеогликаны участвуют во многих процессах, обеспечивающих нормальное функционирование мозга, например в поддержании концентрации ионов, защите от оксидативного стресса и стабилизации синапсов [5].

Целью нашего исследования было определить уровни транскрипции генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса в нейронах коры головного мозга и гиппокампа *in vitro* в ответ на индуцированное нейровоспаление.

Материал и методы исследования

Исследование проводилось на культуре нейронов, полученных от 3-дневных крыс линии Wistar.

Все манипуляции с использованием животных проводились в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006).

Культуру нейронов получали из коры и гиппокампа головного мозга в соответствии с протоколом, опубликованным Beaudoin и соавторами [6].

Культуру астроцитов получали из аналогичных регионов в соответствии с протоколом, описанном Mеча и соавторами [7]. После получения готовой культуры астроцитов в них заменялась питательная среда с DMEM (Thermo Fisher Scientific) на Neurobasal-A (Thermo Fisher Scientific), в которой росли нейроны, поскольку последние особенно чувствительны к содержанию в среде фетальной бычьей сыворотки и других ростовых факторов. Затем производилось активирование астроцитов бактериальным липополисахаридом (ЛПС) *Escherichia coli* O127:B8 (Sigma-Aldrich) в концентрации 1 мкг/мл в течение 24 часов, таким способом создавались условия индуцированного нейровоспаления.

Питательная среда культуры нейронов заменялась питательной средой от активированных ЛПС и контрольной группы астроцитов, в которой нейроны находились 24 часа, после чего проводилось определение профилей транскрипции генов, кодирующих внеклеточный матрикс.

Для этого нами была выделена РНК из культур нейронов, выращивавшихся как в нормальных условиях, так и в условиях индуцированного нейровоспаления. Выделение РНК было произведено с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, с дополнительной обработкой ДНКазой. Перед выделением РНК был подготовлен рабочий раствор буфера RLТ (лизирующий буфер, прилагается в наборе) путем добавления в 1 мл буфера 10 мкл β-меркаптоэтанола. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 («Invitrogen», США) и набора реагентов Qubit® RNA BR Assay Kit («Invitrogen», США). В результате выделения данным методом было получено около 1,5 мкг РНК.

Выделенная РНК была использована для постановки обратной транскрипции с целью получения кДНК. Проведение обратной транскрипции проводилось с помощью набора

MMLV RT (Евроген) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, с использованием термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот C1000 (Bio-Rad). Концентрация кДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 2.0 и набора реагентов Qubit® dsDNA HS Assay Kit («Invitrogen»).

Полученные образцы кДНК были использованы для дальнейшей постановки ПЦР в реальном времени с целью определения уровней транскрипции генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса в различных условиях.

Уровень транскрипции мРНК генов, кодирующих компоненты ВКМ, определяли методом ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена, относительно которого проводилась нормализация показателей уровня транскрипции исследуемых генов, был выбран ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) как один из наиболее стабильно экспрессирующихся генов в клетках. Для qRT-ПЦР использовали ДНК-полимеразу Taq и 10x буфер Taq, 50x SYBR Green I, смесь dNTP (все Евроген, Россия). Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX96 Thermal cycler («Bio-Rad», США) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей: 1x буфера Taq, 1x SYBR Green I, 0,25 мкМ смеси dNTP, 0,3 нМ смеси праймеров, 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы. ПЦР в реальном времени проводили в следующих условиях: кДНК денатурировали при 95°C в течение 3 минут, затем следовали 50 циклов: денатурация при 95°C в течение 10 с, отжиг праймеров при 63°C в течение 30 с и элонгация цепи при 72°C в течение 20 с.

В качестве отрицательных контролей использовали реакционную смесь без добавления матрицы. Все исследуемые и контрольные образцы амплифицировали в пятикратной повторности.

Уровни транскрипции выбранных генов определялись с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистическая обработка проводилась с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7. Оценку достоверности различий нормализованных уровней транскрипции генов компонентов внеклеточного матрикса между исследуемыми группами проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, различия между сравниваемыми выборками считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Для анализа уровней транскрипции генов компонентов внеклеточного матрикса нами были выбраны 20 генов, кодирующих основные компоненты внеклеточного матрикса, среди них: тенасцины С и R, рилин, агрин, аггрекан, бревикан, нейрокан, синдеканы (1–4) и ламинины (1a – 5a; 1b – 3b, 1c), а также были подобраны праймеры к референсному гену – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH).

В результате проведенных нами исследований было установлено, что уровни транскрипции семейства тенасцинов (TnC и TnR) статистически значимо снижаются при индуцированном нейровоспалении в коре только для TnR ($p < 0,01$) (рис. 1б), тогда как для TnC наблюдались лишь региональные различия в уровнях транскрипции между контрольными и экспериментальными группами ($p < 0,01$) (рис. 1а). Для TnR также были выявлены статистически значимые региональные различия в уровнях транскрипции при сравнении обеих групп ($p < 0,01$).

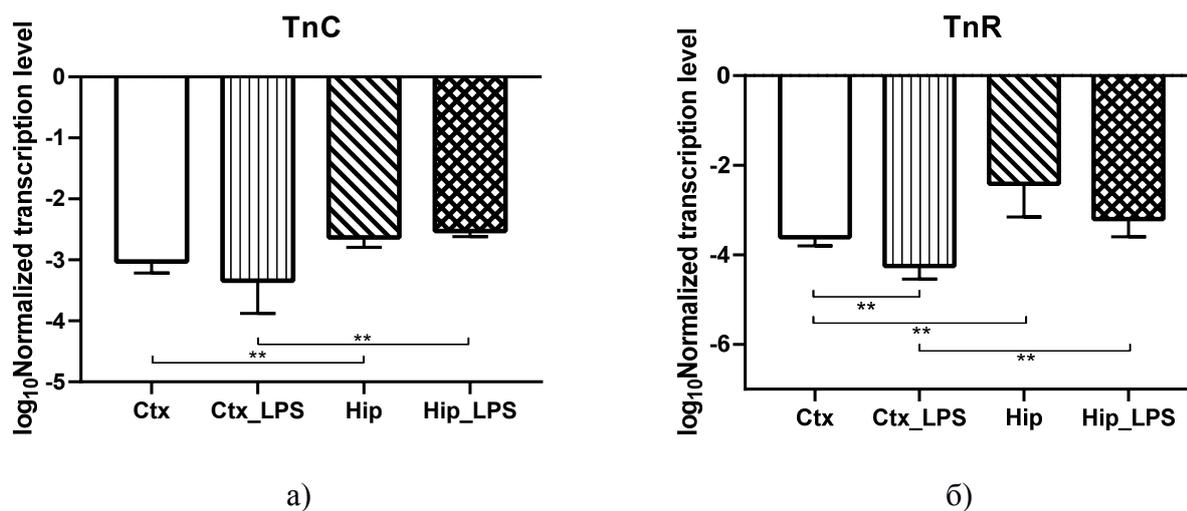


Рис. 1. Относительные уровни транскрипции генов TnC (а) и TnR (б) в коре головного мозга (Ctx) и гиппокампе (Hip), нормализованные на референсный ген, представленные в логарифмической шкале. Ctx – нейроны префронтальной коры (контроль); Ctx_LPS – нейроны префронтальной коры с индуцированным нейровоспалением; Hip – нейроны гиппокампа (контроль); Hip LPS – нейроны гиппокампа с индуцированным нейровоспалением; ** – $p < 0,01$

Анализ уровней транскрипции протеогликанов (агрекана, нейрокана и бревикана) показал, что уровни транскрипции гена агрекана (Acan) (рис. 2а) и нейрокана (Ncan) (рис. 2б) в коре в условиях индуцированного нейровоспаления статистически значимо снижаются ($p < 0,01$), для гена бревикана (Bcan) (рис. 2в) в коре и гиппокампе наблюдались аналогичные изменения ($p < 0,01$). Кроме того, для экспериментальных групп были выявлены региональные статистически значимые различия в уровнях транскрипции для Acan ($p < 0,05$) и для Bcan ($p < 0,01$), а для Ncan – в контрольных группах ($p < 0,01$).

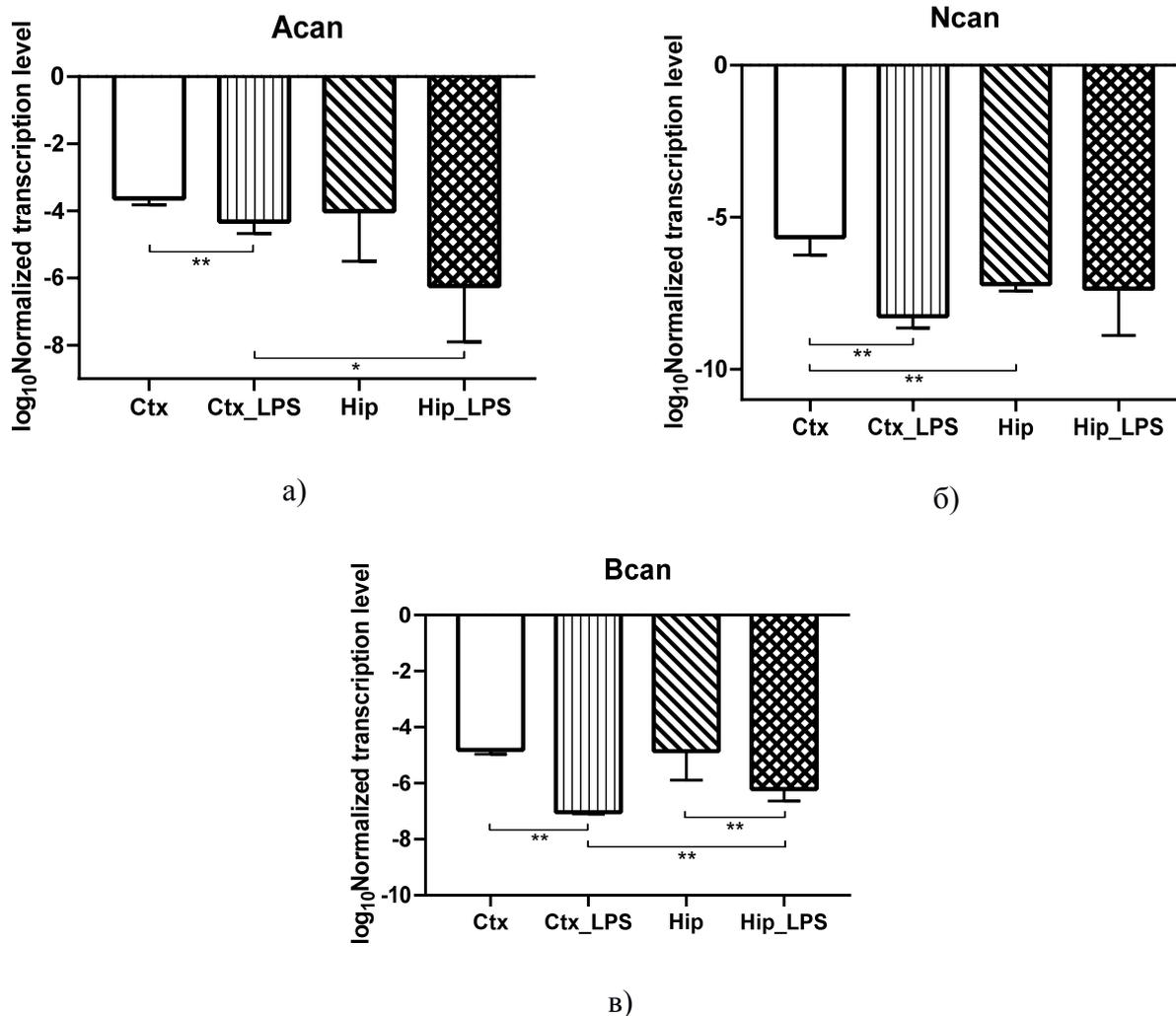


Рис. 2. Относительные уровни транскрипции генов *Acan* (а), *Ncan* (б) и *Bcan* (в) в коре головного мозга (*Ctx*) и гиппокампе (*Hip*), нормализованные на референсный ген, представленные в логарифмической шкале. *Ctx* – нейроны префронтальной коры (контроль); *Ctx_LPS* – нейроны префронтальной коры с индуцированным нейровоспалением; *Hip* – нейроны гиппокампа (контроль); *Hip_LPS* – нейроны гиппокампа с индуцированным нейровоспалением; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Анализ гена агрина (*Agri*) (рис. 3а) продемонстрировал статистически значимое повышение уровней транскрипции в коре ($p < 0,05$) при сравнении контрольной группы с экспериментальной, при этом в гиппокампе в условиях индуцированного нейровоспаления агрин прекращает транскрибироваться. При анализе гена рилина (*Reln*) (рис. 3б) было обнаружено статистически значимое снижение уровней транскрипции в гиппокампе ($p < 0,01$) при сравнении контрольной группы с экспериментальной, при этом в коре изменений, вызванных индуцированным нейровоспалением, не наблюдалось. Также были выявлены региональные различия в уровне транскрипции между экспериментальными группами ($p < 0,01$).

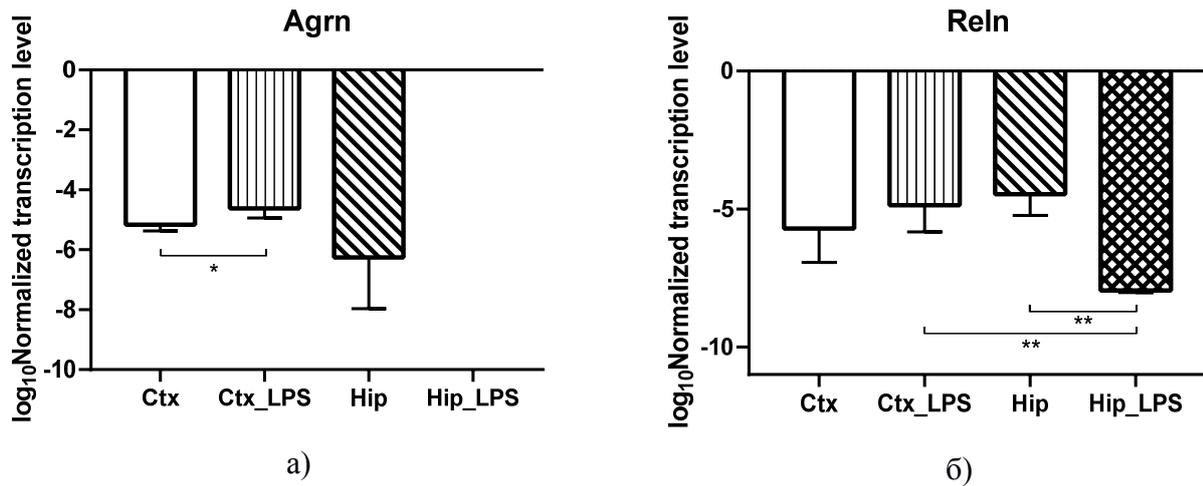
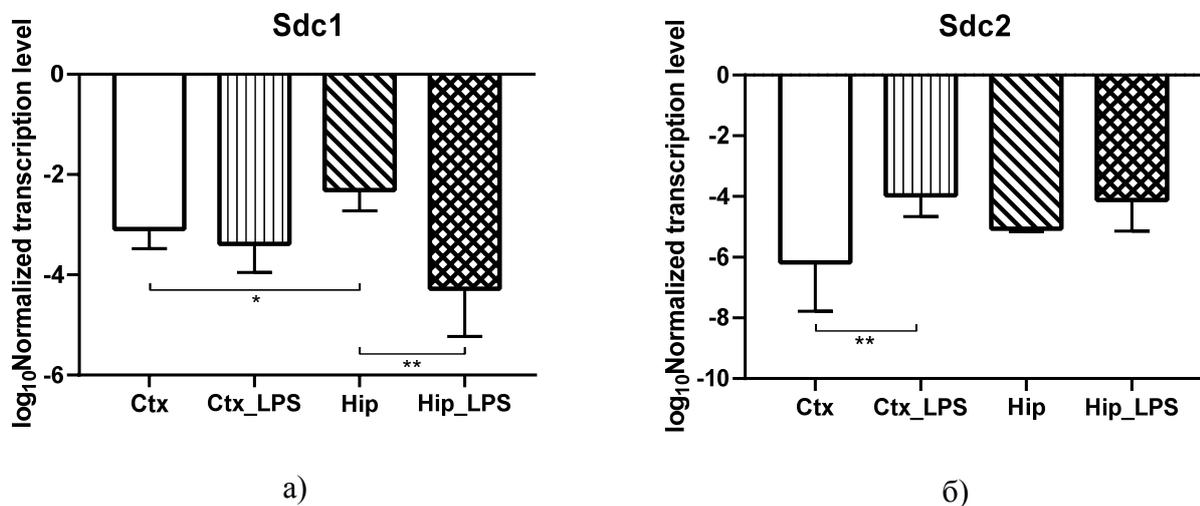
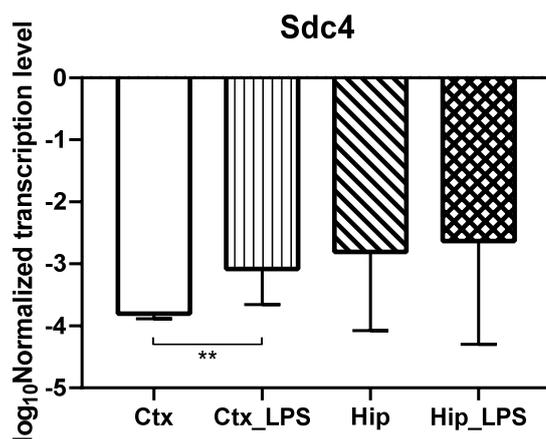


Рис. 3. Относительные уровни транскрипции генов *Agnr* (а) и *Reln* (б) в коре головного мозга (Ctx) и гиппокампе (Hip), нормализованные на референсный ген, представленные в логарифмической шкале. Ctx – нейроны префронтальной коры (контроль); Ctx_LPS –нейроны префронтальной коры с индуцированным нейровоспалением; Hip – нейроны гиппокампа (контроль); Hip LPS – нейроны гиппокампа с индуцированным нейровоспалением; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Анализ четырех генов семейства синдеканов (*Sdc1* – 4) (рис. 4) показал статистически значимое снижение уровней транскрипции гена *Sdc1* (рис. 4а) в гиппокампе ($p < 0,01$) и практически неизменные значения уровня транскрипции в коре, тогда как для гена *Sdc2* (рис. 4б) уровни транскрипции в коре повысились ($p < 0,01$), а в гиппокампе не изменились. В то же время для *Sdc1* наблюдаются статистически значимые различия в уровнях транскрипции для контрольных групп ($p < 0,05$). Аналогично *Sdc2* уровни транскрипции *Sdc4* (рис. 4в) в коре повысились ($p < 0,01$), а в гиппокампе не изменились. В уровнях транскрипции гена *Sdc3* статистически значимых различий не наблюдалось.

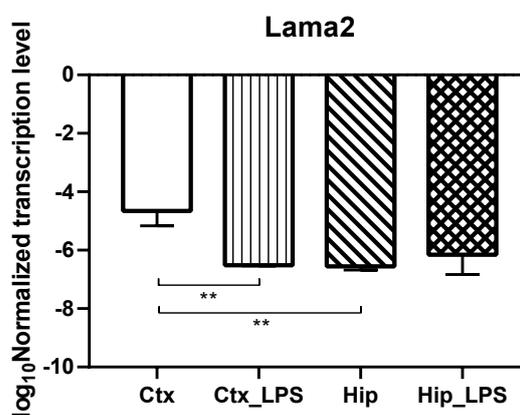
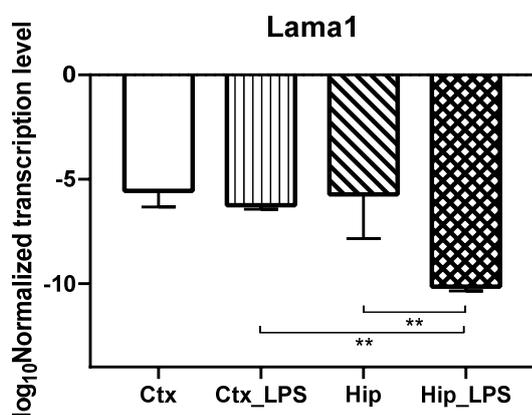




в)

Рис. 4. Относительные уровни транскрипции генов *Sdc1* (а), *Sdc2* (б) и *Sdc3* (в) в коре головного мозга (Ctx) и гиппокампе (Hip), нормализованные на референсный ген, представленные в логарифмической шкале. Ctx – нейроны префронтальной коры (контроль); Ctx_LPS – нейроны префронтальной коры с индуцированным нейровоспалением; Hip – нейроны гиппокампа (контроль); Hip LPS – нейроны гиппокампа с индуцированным нейровоспалением; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Анализ пяти генов α субъединиц белков ламининов (Lama1 – 5) (рис. 5) продемонстрировал полное отсутствие транскрипции гена субъединицы $\alpha 3$ (Lama3). При этом уровни транскрипции гена Lama1 (рис. 5а) статистически значимо снижались в гиппокампе ($p < 0,01$) и демонстрировали региональные различия между экспериментальными группами ($p < 0,01$). При анализе гена Lama2 (рис. 5б) были выявлены статистически значимые снижение уровней транскрипции в коре ($p < 0,01$) и региональные различия в контрольных группах ($p < 0,01$). Уровни транскрипции гена Lama4 не изменялись в условиях индуцированного нейровоспаления, тогда как уровни транскрипции гена Lama5 (рис. 5в) в коре статистически значимо повышались ($p < 0,01$).



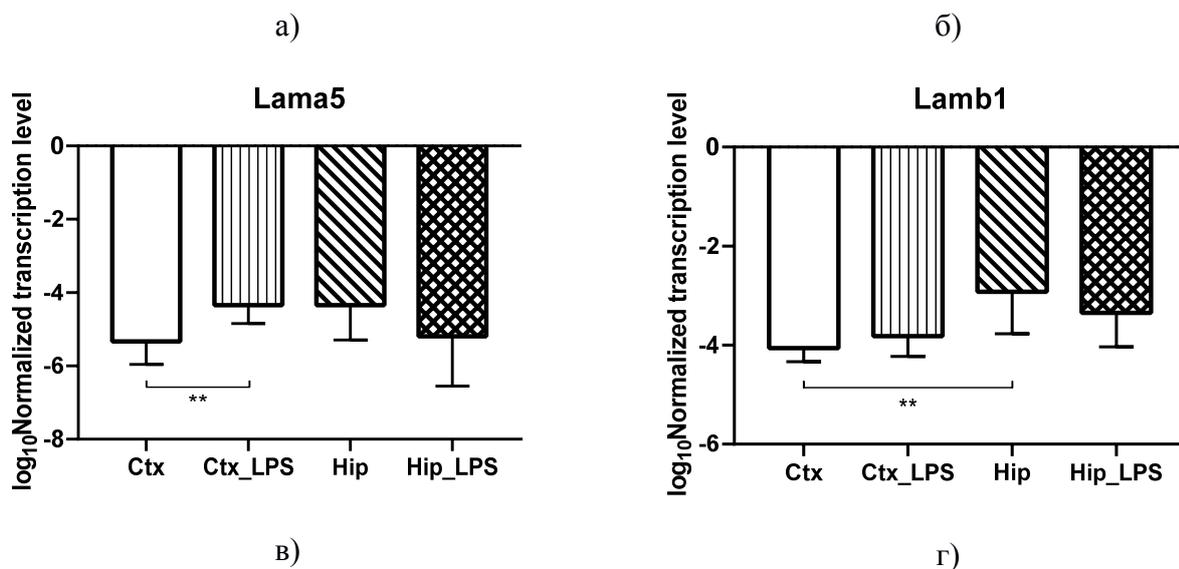


Рис. 5. Относительные уровни транскрипции генов *Lama1* (а), *Lama2* (б), *Lama5* (в) и *Lamb1* (г) в коре головного мозга (Ctx) и гиппокампе (Hip), нормализованные на референсный ген, представленные в логарифмической шкале. Ctx – нейроны префронтальной коры (контроль); Ctx_LPS – нейроны префронтальной коры с индуцированным нейровоспалением; Hip – нейроны гиппокампа (контроль); Hip_LPS – нейроны гиппокампа с индуцированным нейровоспалением; ** – $p < 0,01$

Анализ трех генов β субъединиц белков ламининов (*Lamb1* – 3) и одной субъединицы $\gamma 1$ (*Lamc1*) продемонстрировал полное отсутствие транскрипции гена субъединицы $\gamma 1$ в нейронах. Уровни транскрипции гена *Lamb1* (рис. 5г) не изменялись в условиях индуцированного нейровоспаления, однако наблюдались статистически значимые региональные различия в уровнях транскрипции между контрольными группами ($p < 0,01$). При этом ген *Lamb2* транскрибируется примерно на одном и том же уровне в обоих регионах независимо от условий. Ген *Lamb3* (рис. 6б), напротив, транскрибируется лишь в условиях индуцированного нейровоспаления.

Снижение уровней транскрипции протеогликанов, в том числе растворимых хондроитинсульфат протеогликанов (агрекана, нейрокана и бревикана), и тенасцинов-R и -C в условиях индуцированного нейровоспаления может свидетельствовать о стремлении нейронов подавить их ингибирующее действие на рост аксонов [8, 9] и, следовательно, способствовать функциональному восстановлению связей между нейронами. Ламинины и синдиканы, так же как и протеогликанов, оказывают влияние на рост нейрональных отростков, однако, в отличие от протеогликанов, ламинины и синдиканы, наоборот, способствуют росту аксонов [10, 11]. Таким образом, повышение уровней транскрипции ламинина $\alpha 5$ в коре и появление транскрипции $\beta 3$, а также повышение уровней

транскрипции синдикана 2 и 4 в обоих регионах головного мозга тоже могут свидетельствовать о противодействии разрушения связей между нервными клетками. При этом о функциональной нестабильности нейронов в условиях индуцированного нейровоспаления свидетельствует снижение уровней транскрипции рилина, необходимого для поддержания процессов синаптической пластичности, обучения и памяти [12]. В поддержании процессов синаптической пластичности также участвует гепарансульфат протеогликан – агрин [13, 14], повышение уровней транскрипции которого в коре в условиях индуцированного нейровоспаления указывает на стремление к восстановлению межклеточных взаимодействий, тогда как прекращение транскрипции в гиппокампе может означать повышенную чувствительность данного региона мозга к воздействию индуцированного нейровоспаления.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования нами были получены для нейронов *in vitro* профили транскрипции генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса, а также продемонстрированы изменения в уровнях транскрипции этих генов в условиях индуцированного нейровоспаления, указывающие, с одной стороны, на развитие функциональной нестабильности нейронов, а с другой – на стремление клеток нивелировать неблагоприятные эффекты от нейровоспаления посредством изменения уровней транскрипции генов компонентов внеклеточного матрикса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00152.

Список литературы

1. Dzyubenko E., Gottschling C., Faissner A. Neuron-glia interactions in neural plasticity: contributions of neural extracellular matrix and perineuronal nets. *Neural plasticity*. 2016. vol. 2016. DOI: 10.1155/2016/5214961.
2. Franze K., Janmey P.A., Guck J. Mechanics in neuronal development and repair. *Annual review of biomedical engineering*. 2013. vol. 15. P. 227–251. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150045.
3. Dityatev A., Rusakov D.A. Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current opinion in neurobiology*. 2011. vol. 21. no. 2. P. 353-359. DOI: 10.1016/j.conb.2010.12.006.

4. Dominova I.N., Patrushev M.V., Silina E.V., Shusharina N.N. Extracellular matrix in the central nervous system. *Journal of pharmaceutical sciences and research*. 2018. vol. 10. no. 4. P. 768-776.
5. Giamanco K.A., Matthews R.T. Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience*. 2012. vol. 218. P. 367-384. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.055.
6. Beaudoin G.M., Lee S.H., Singh D., Yuan Y., Ng Y.G., Reichardt L.F., Arikath J. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols*. 2012. vol. 7. no. 9. P. 1741-1754. DOI: 10.1038/nprot.2012.099.
7. Mecha M., Iñigo P.M., Mestre L., Hernangómez M., Borrell J., Guaza C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: a beginners approach. *Protocol Exchange*. 2011. vol. 218. P. 1038. DOI: 10.1038/protex.2011.218.
8. Iozzo R.V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*. 2015. vol. 42. P. 11-55. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.02.003.
9. Andrews M.R., Czvitkovich S., Dassie E., Vogelaar C.F., Faissner A., Blits B., Gage F.H., French-Constant C., Fawcett J.W. Alpha9 integrin promotes neurite outgrowth on tenascin-C and enhances sensory axon regeneration. *Journal of Neuroscience*. 2009. vol. 29. P. 5546–5557. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0759-09.2009.
10. Ichikawa N., Iwabuchi K., Kurihara H., Ishii K., Kobayashi T., Sasaki T., Hattori N., Mizuno Y., Hozumi K., Yamada Y., Arikawa-Hirasawa E. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *Journal of cell science*. 2009. vol. 122. no. 2. P. 289–99. DOI: 10.1242/jcs.030338.
11. Edwards T.J., Hammarlund M. Syndecan promotes axon regeneration by stabilizing growth cone migration. *Cell reports*. 2014. vol. 8. no. 1. P. 272-283. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.008.
12. Hong S.E., Shugart Y.Y., Huang D.T., Shahwan S.A., Grant P.E., Hourihane J.O., Martin N.D., Walsh C.A. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nature genetics*. 2000. vol. 26. no. 1. P. 93-96. DOI: 10.1038/79246.
13. Ferrer-Ferrer M., Dityatev A. Shaping synapses by the neural extracellular matrix. *Frontiers in neuroanatomy*. 2018. vol. 12. P. 40. DOI: 10.3389/fnana.2018.00040.
14. Smith M.A., Hilgenberg L.G. Agrin in the CNS: a protein in search of a function? *Neuroreport*. 2002. vol. 13. no. 12. P. 1485-1495. DOI: 10.1097/00001756-200208270-00001.