

ФИЗИОЛОГИЯ ПОВЕДЕНИЯ; ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ

УДК 612.821.6

Посвящается 30-летию научно-педагогического комплекса НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН и однопрофильной кафедры нормальной физиологии ММА им. И.М. Сеченова

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА c-Fos ПО РОСТРО-КАУДАЛЬНОЙ ОСИ ГИППОКАМПА ОБЫКНОВЕННЫХ ПОЛЕВОК ПОСЛЕ БЫСТРОГО ОБУЧЕНИЯ РЕШЕНИЮ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ЗАДАЧИ

© 2005 г. П. А. Купцов, М. Г. Плескачева, Д. Н. Воронков, Х.-П. Липп, К. В. Анохин

Лаборатория физиологии и генетики поведения, кафедра высшей нервной деятельности Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Институт анатомии Цюрихского университета, Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, e-mail: plesk@protein.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 21.01.2004 г.

Принята в печать 04.10.2004 г.

Уровень экспрессии c-Fos белка в нейронах использовали как индикатор активации транскрипции в гиппокампе обыкновенных полевок (*Microtus arvalis* Pall.) после быстрого пространственного обучения. Окрашенные Fos-позитивные клетки были посчитаны на 20 срезах мозга вдоль росто-каудальной оси гиппокампа. Полевок обучали находить выход в домашнюю клетку через один из рукавов модифицированного 8-рукавного радиального лабиринта (2-часовая серия из шести попыток в течение одного дня). Предварительно животные были обучены выходить в домашнюю клетку через рукав, отделенный от лабиринта. Полевок группы “активного” контроля в день эксперимента 6 раз выпускали через изолированный рукав в домашнюю клетку. Животных для “пассивного” контроля уровня c-Fos экспрессии забирали из домашней клетки. Значительное увеличение c-Fos экспрессии у полевок, обучавшихся в лабиринте, и группы активного контроля по сравнению с пассивным контролем обнаружено во всех исследуемых областях (поля CA1, CA3 гиппокампа и зубчатая фасция). В то же время существенное увеличение числа c-Fos-позитивных нейронов у полевок, обучавшихся в лабиринте, по сравнению с активным контролем отмечено только для каудального гиппокампа, различий в ростральной части не было. Максимальная активация была обнаружена в зубчатой фасции и в поле CA3. Полученные результаты свидетельствуют о неоднородности функционирования гиппокампа вдоль росто-каудальной оси при обучении полевок решению пространственной задачи.

Ключевые слова: обыкновенная полевка, пространственное обучение, c-fos экспрессия, гиппокамп, росто-каудальная ось.

Features of the c-Fos Gene Expression along the Hippocampal Rostro-Caudal Axis in Common Voles after Rapid Spatial Learning

P. A. Kuptsov, M. G. Pleskacheva, D. N. Voronkov, H.-P. Lipp, K. V. Anokhin

Lomonosov State University, Moscow, Russia,

Institute of Anatomy, University of Zurich, Zurich, Switzerland,

Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia,

e-mail: plesk@protein.bio.msu.ru

The levels of the Fos protein expression in neurons was used as an index of transcription activation in the hippocampus of common voles (*Microtus arvalis* Pall.) after their rapid spatial learning. Fos-positive cells were stained and calculated in 20 brain sections along hippocampal rostro-caudal axis. Voles (learning group) were trained in a modified 8-arm radial maze to find the entry to the home cage through a target arm (6 trials per session, 2-hour session). The animals were pretrained to enter the home cage through an arm isolated from the maze. Animals of active control group continued entering the home cage through the isolated arm, and animals of the passive control group were taken for the Fos immunohistochemistry from the home cage. Both in the learning group and active control group, a significant increase in c-Fos expression was shown in all the examined areas (CA1, CA3 and the dentate gyrus) as compared to the passive control. A significant increase in the number of c-Fos positive neurons was observed in the caudal hippocampus of the learning animals as compared to the active control, however, no differences were found in the rostral part. The maximum effects were observed in the dentate gyrus and the CA3 field. The results suggest a functional rostro-caudal inhomogeneity of the vole's hippocampus in the spatial learning task.

Key words: common vole, spatial learning, c-fos expression, hippocampus, rostro-caudal axis.

Участие гиппокампа (Гп) необходимо для осуществления многих форм поведения, успешного обучения и памяти (см. обзоры [2, 13]). Его ключевая роль многократно подтверждена в экспериментах при использовании тестов на пространственную память ([21, 23] и др.). Наиболее частым приемом для оценки функционирования Гп лабораторных грызунов было разрушение Гп или связанных с ним структур (см. [8, 16, 23]). Однако возникающие при этом побочные эффекты побудили ряд авторов к разработке и использованию других методов исследования функций данной структуры. Один из них – оценка площади терминальных полей мшистых волокон Гп. Так, были показаны положительные корреляции размеров полей инфра- и интрапирамидных мшистых волокон Гп мышей разных линий с успешностью выполнения ими стандартной пространственной задачи в радиальном лабиринте [27].

Другим распространенным методом изучения функционирования структур мозга при обучении является оценка интенсивности экспрессии гена *c-fos*, индуцирующегося в нервных клетках в связи с приобретением и консолидацией нового опыта. Использование такого маркера позволило охарактеризовать работу ряда структур мозга, непосредственно вовлеченных в процессы обучения и памяти. Большая часть данных получена на моделях, не требующих длительного обучения [1]. Использование этого метода оценки активации структур для исследования пространственного обучения началось сравнительно недавно [14, 15, 24, 29]. Так, была обнаружена высокая экспрессия белка *c-Fos* во всех полях Гп и зубчатой фасции (ЗФ) у крыс после длительного обучения в 8-лучевом радиальном лабиринте [29]. Аналогичный эффект наблюдали в условиях, когда критическим отличием для группы, обучавшейся в лабиринте, было условие “новизны” (обучение в новой комнате).

Исследования, в которых изучали характеристики пространственной памяти полевок, в отличие от экспериментов, проведенных на лабораторных мышах и крысах, немногочисленны. Показано, что полевки американских видов (*Microtus ochrogaster*, *M. montanus* и *M. pennsylvanicus*) успешно обучались пространственной задаче в тесте Морриса [12, 19, 26]. В наших экспериментах это было подтверждено и для полевок других видов (рыжей, *Clethrionomys glareolus*, и полевки-экономки, *Microtus oeconomus*) [25]. Подробный анализ траекторий их перемещения выявил существенные видовые различия стратегий поиска скрытой платформы. Рыжие полевки плыли к ней по более короткой траектории, полевки-экономки компенсировали более длинный маршрут большей скоростью перемещения. Многие особи вида *Microtus pennsylvanicus* успешно справлялись с пространственной задачей в 8-лучевом радиальном лабиринте [28]. Все эти данные свидетельствуют о достаточно вы-

соких способностях полевок к пространственному обучению в стандартных тестах, тогда как для большинства линий лабораторных мышей характерны низкие показатели обучения в радиальном лабиринте [7, 27]. Именно при сравнении двух видов полевок – рыжей и экономки – были подтверждены упомянутые выше данные относительно корреляции площади мшистых волокон Гп и успешности обучения в тесте Морриса. Более эффективно находившие платформу рыжие полевки имеют большие площади проекций мшистых волокон (особенно интра- и инфрапирамидных компонентов), чем полевки-экономки [25].

Метод оценки экспрессии белка *c-Fos* в мозге полевок (*Microtus ochrogaster*) применялся лишь для поиска структур, ответственных за разные аспекты репродуктивного поведения (см. [18] и др.). Продолжая наши исследования [25] особенностей пространственного обучения полевок и параллельного изучения функционирования Гп, мы выбрали этих животных в качестве объекта и для нового эксперимента. В отличие от других авторов, исследовавших активацию гена *c-fos* в Гп после длительного обучения животных, нас интересовал непосредственно эффект выполнения новой пространственной задачи, не осложненный дополнительными влияниями, например, выработанных стратегий посещения рукавов в уже хорошо знакомом животному лабиринте. Это требование, а также избранный метод анализа активации Гп привели нас к необходимости разработки аппарата и процедуры быстрого (в течение одного дня, даже нескольких часов) обучения. Для выявления более полной картины активации гиппокампа *c-Fos* экспрессию оценивали по многим точкам его ростокаудальной оси (в большинстве случаев при работе с мышами и крысами такая оценка производилась по единичным срезам мозга [14, 15, 24, 29]).

Целью настоящей работы было оценить влияние процесса обучения полевок выполнению новой пространственной задачи на активацию различных отделов Гп и ЗФ, используя метод определения интенсивности экспрессии белка *c-Fos* на разных уровнях ростокаудальной оси гиппокампа.

МЕТОДИКА

В эксперименте использовали 16 обыкновенных полевок (*Microtus arvalis*), массой 16–24 г, отловленных живоловками Шермана в характерных местах их обитания (Тверская область, Торопецкий заказник “Чистый Лес”), в период с июля по сентябрь 2001 и 2002 гг. Животных содержали в индивидуальных клетках в виварии заказника и кормили стандартным мышинным комбикормом с добавлением большого количества свежей травы и овощей. Полевки были равномерно (по массе) распределены на три экспериментальных группы: обучения ($n = 6$, пять самцов и одна самка), “актив-

ного” контроля ($n = 6$, четыре самца и две самки) и “пассивного” контроля ($n = 4$, три самца и одна самка). Поскольку не было обнаружено половых различий ни по поведению полевок, ни по интенсивности экспрессии, далее будем рассматривать группы без разделения на самцов и самок. Эксперименты проводили поздней осенью, когда животные находились в нерепродуктивном состоянии.

Для решения поставленной задачи была разработана методика, позволяющая проводить пространственное обучение за короткое время (1.5–2 ч). Она включала в себя элементы теста Барнс [9], в котором в качестве подкрепления использовали возможность возвращения из открытого пространства в домашнюю клетку. Однако в отличие от этой установки, чтобы избежать тигмотаксиса и четко контролировать направление движения животного, мы использовали не открытую площадку, а структурированное пространство – радиальный лабиринт [23]. Модификации радиального лабиринта, дающие возможность грызунам выходить из него, использовались ранее и другими авторами [3, 20], но в этих работах применяли другие процедуры обучения. Ввиду того, что наши эксперименты проводились на диких, достаточно пугливых полках, возникла необходимость их предварительной адаптации к обстановке опыта, к отдельным элементам процедуры, исключая приучение к лабиринту в целом.

На вращающуюся площадку, приподнятую над уровнем пола на 18 см, был помещен 8-рукавный радиальный лабиринт, сделанный из прозрачного пластика (диаметр рукава 6.5 см, длина рукава 32 см, диаметр центральной части 36 см, ее высота 45 см). В конце каждого рукава (на расстоянии 26 см от стенки центральной части) была установлена односторонняя непрозрачная дверь, закрывающая вход в отсек длиной 6 см, который соединялся с клеткой для содержания грызунов (25.5 × 18.5 × 13 см) вертикальной трубкой длиной 11 см (рис. 1). Во время эксперимента все двери были заблокированы, за исключением одной, которая могла быть свободно открыта животным. Выйдя в конечный отсек, полевка через трубку, отходящую от него, попадала в клетку с опилками из домашней клетки. Чтобы избежать ориентации животных по запаху, такие же опилки были насыпаны и в другие клетки, вход в которых был заблокирован. Кроме того, после каждой попытки лабиринт поворачивали, сохраняя неизменным направление целевого рукава. Оно было разным для разных особей, но не менялось от попытки к попытке. Установка была помещена в комнату, где также располагался компьютер, мебель, плакаты и др. Эксперимент проводили при слабом освещении установки (три лампы, направленные вверх, на высоте 2 м от пола мощностью 60 Вт), чтобы избежать излишнего стрессирования животных.

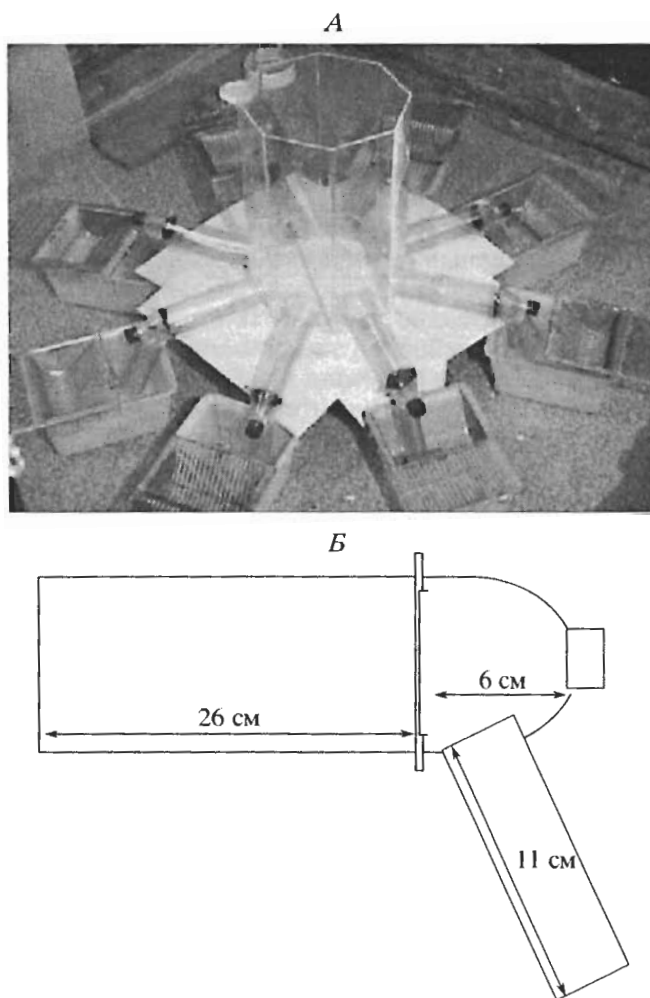


Рис. 1. Схема экспериментальной установки. А – внешний вид экспериментальной установки, Б – схема одного рукава.

Регистрацию поведения животного осуществляли с помощью автоматизированной системы, состоящей из видеокamеры “Sony” (Япония), расположенной на высоте 250 см от центра арены, монитора “Varco” (Бельгия) и персонального компьютера, оснащенного дополнительной платой видеоввода изображения VIGA+ (США). Программа Ethovision ver.1.96 (Noldus, Нидерланды) позволяла сохранять траекторию перемещения животного в виде координат. В каждом кадре программа выделяла объект путем поточечного вычитания предварительно зафиксированного изображения пустой арены из изображения сдвигающимся объектом. Регистрацию координат проводили с частотой 4.2 кадра в 1 с. С помощью программы Ethovision рассчитывали длину пути, латентный период выхода и число заходов в целевой рукав, а также в тот, через который животное выходило во время предыдущей попытки.

Животных, обучавшиеся в лабиринте, и группы “активного” контроля предварительно обучали в

той же комнате, где и проводили основной эксперимент, что позволяло ознакомить их со всеми компонентами обстановки опыта, за исключением самого лабиринта. Во время приучения (5 дней, 6 раз в день с интервалом 40 мин) полевки вынимали из домашней клетки и помещали в рукав, отсоединенный от лабиринта. Они быстро обучались открывать носом одностороннюю дверку, переходить в конечный отсек и выходить через трубку в домашнюю клетку. Каждый раз направления рукава относительно дистантных стимулов меняли. На 6-й день (основной эксперимент) животных из основной группы обучали в лабиринте (шесть попыток с 15-минутными интервалами). Полевку выпускали из непрозрачного цилиндра в центр лабиринта и начинали регистрацию траектории ее перемещения до самостоятельного выхода из лабиринта (обычно 1–2 мин). Животных из группы активного контроля 6 раз с 15-минутным интервалом из непрозрачного цилиндра выпускали в рукав, отсоединенный от лабиринта (так же как и при предварительном обучении). После окончания шестой попытки основного или контрольного эксперимента полевки отсаживали на 1.5 ч в домашнюю клетку, после чего проводили декаптацию. Такой временной интервал был выбран, исходя из имеющихся данных о том, что максимальная интенсивность экспрессии достигается в течение 1–3 ч после воздействия [1]. “Пассивным” контролем были интактные животные, которых забирали из их домашней клетки и декаптивировали.

Сразу после декаптации мозг извлекали и замораживали при температуре -40°C . Коронарные срезы толщиной 20 мкм собирали на стекла от начала Гп (расстояние от брегмы -1.06 мм) до его каудальных отделов (-3.8 мм), распределяя их на две параллельные серии – для иммуногистохимической и для контрольной окраски по Ниссляу (крезилвиолетом). Для обработки брали каждый 10-й срез. Экспрессию белка c-Fos определяли иммуногистохимически, авидин-биотин-пероксидазным методом. Для реакции использовали первичные поликлональные антитела Fos (AB-5, “Calbiochem”, США) в разведении 1:2500 (время инкубации 18 ч), вторичные биотинилированные антитела (“Vector laboratories Inc.”, США) в разведении 1:200 (2 часа инкубации) и авидин-биотин-комплекс (“Vectastain Kit Vector”, США). Для визуализации реакции использовали 8%-ный раствор 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (ДАБ).

Изображения Гп оцифровывали с разрешением 3840×3072 (300 dpi) с помощью цифровой камеры Nikon (Япония) и программы Act-1. Для подсчета c-Fos-положительных клеток были выбраны поля CA1, CA3 и ЗФ. Границы полей определяли по атласу [11], контролируя определение по срезам, окрашенным по Ниссляу. Для анализа были выбраны срезы, соответствующие 22 различным координатам (от расстояния -1.22 мм и до -3.80 мм от брег-

мы). Обработку изображений проводили с помощью программы Image Pro версия 3.00. Определяли площадь исследуемой структуры, число c-Fos-экспрессирующих клеток и рассчитывали показатель плотности как отношение числа Fos-экспрессирующих клеток к площади структуры. При статистической обработке результатов использовали методы дисперсионного анализа и t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Все полевки успешно находили выход из лабиринта, однако систематического снижения усредненных показателей длины пути и латентного периода выхода из лабиринта не было обнаружено. При анализе латентных периодов был выявлен бимодальный характер их распределения. Один пик соответствовал попыткам, латентность которых составляла 30–60 с, другой – попыткам, в которых животные более 3 мин находились в лабиринте. В соответствии с превалированием указанных диапазонов времени выхода полевки распределились на две подгруппы. Первые ($n = 4$) в большинстве случаев быстро выходили из лабиринта, в течение 1 мин. У них достоверно снижался латентный период выхода к шестой попытке по сравнению с первой ($t_{(5)} = 2.79, p < 0.05$). В качестве другого показателя обучения был выбран латентный период первого посещения целевого рукава. Было замечено, что полевки часто заглядывают в целевой рукав, но не сразу выходят из него в клетку, а возвращаются в центр лабиринта и продолжают посещать другие рукава. При анализе этого латентного периода была выявлена выраженная динамика его снижения от попытки к попытке (рис. 2, А). При этом латентный период захода в другие рукава возрастал от попытки к попытке.

Животные второй подгруппы ($n = 2$) не выходили из лабиринта длительное время (2–3 мин и более), особенно это было выражено при последних попытках. Эти полевки активно перемещались по лабиринту, многократно посещая все рукава. Латентный период выхода у таких животных снижался на второй попытке по сравнению с первой, но к последним попыткам была выражена тенденция к его увеличению. Латентный период посещения нецелевых рукавов, так же как и в первой группе, увеличивался от попытки к попытке (рис. 2, Б). Анализ динамики длины пути в течение эксперимента выявил аналогичные тенденции.

Для оценки экспрессии белка c-Fos в разных участках Гп по rostro-каудальной оси было выбрано восемь уровней, каждый из которых объединял два или три последовательных значения координаты от брегмы (табл. 1). Анализ площадей структур (рис. 3) не выявил различий показателей в обучавшейся в лабиринте и контрольных группах полевки. Для поля CA1 наибольшее значение

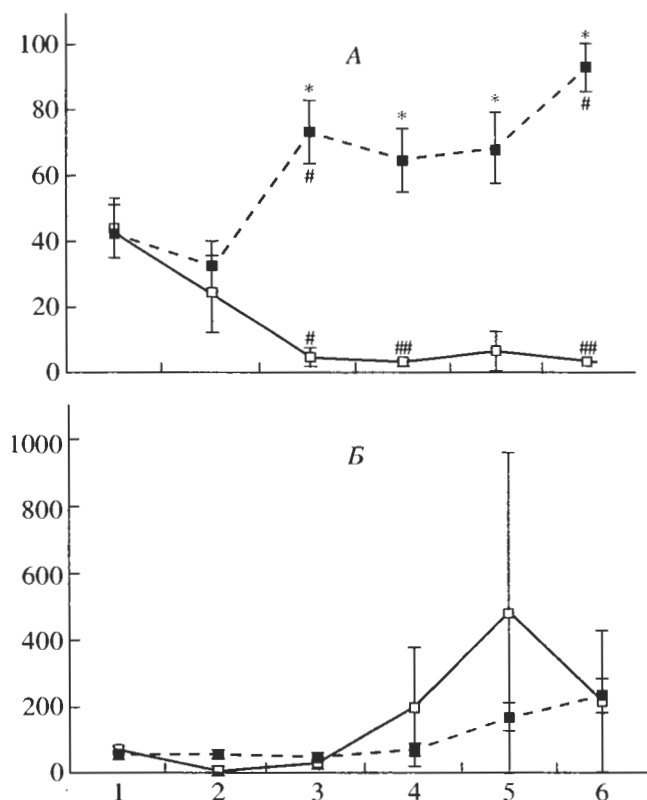


Рис. 2. Латентные периоды первого захода полевок в рукава в разные попытки тестирования. По оси абсцисс – номер попытки, по оси ординат – латентный период захода, с. Светлые квадраты – целевой рукав, темные – нецелевой. Разница латентных периодов при заходе в целевой и нецелевые рукава достоверна при: * – $p < 0.001$. Разница латентных периодов по сравнению с первой попыткой достоверна при: # – $p < 0.01$, ## – $p < 0.001$. А – “быстровыходящие” полевки, Б – “медленновыходящие” полевки.

площади достигается при расстоянии от брегмы от -3.16 до -3.4 мм, для поля СА3 – от -2.8 до -3.08 мм, для ЗФ – от -3.52 до -3.8 мм.

Дисперсионный анализ (факторы “группа” и “расстояние от брегмы”) показал значительные различия между тремя исследуемыми группами (фактор “группа” – $F_{(2)} = 150.79$, $p < 0.001$). Более интересными были различия, выявленные по взаимодействию этих факторов. Найдены достоверные различия между группами по числу нейронов, экспрессирующих c-Fos во всех исследуемых структурах (для поля СА1: $F_{(2,7,250)} = 5.42$, $p < 0.001$; для поля СА3: $F_{(2,7,243)} = 7.0$, $p < 0.001$; для ЗФ: $F_{(2,7,251)} = 7.41$, $p < 0.001$). При сравнении только групп “активного” контроля и обучавшейся в лабиринте отмечены аналогичные достоверные различия по полю СА1 ($F_{(1,7,180)} = 5.82$, $p < 0.001$); СА3 ($F_{(1,7,175)} = 8.74$, $p < 0.001$) и ЗФ ($F_{(1,7,181)} = 5.71$, $p < 0.001$). В группе пассивного контроля интенсивность экспрессии на всем протяжении Гп была значительно ниже, чем в других группах. В дальнейшем мы будем рассматривать различия только обу-

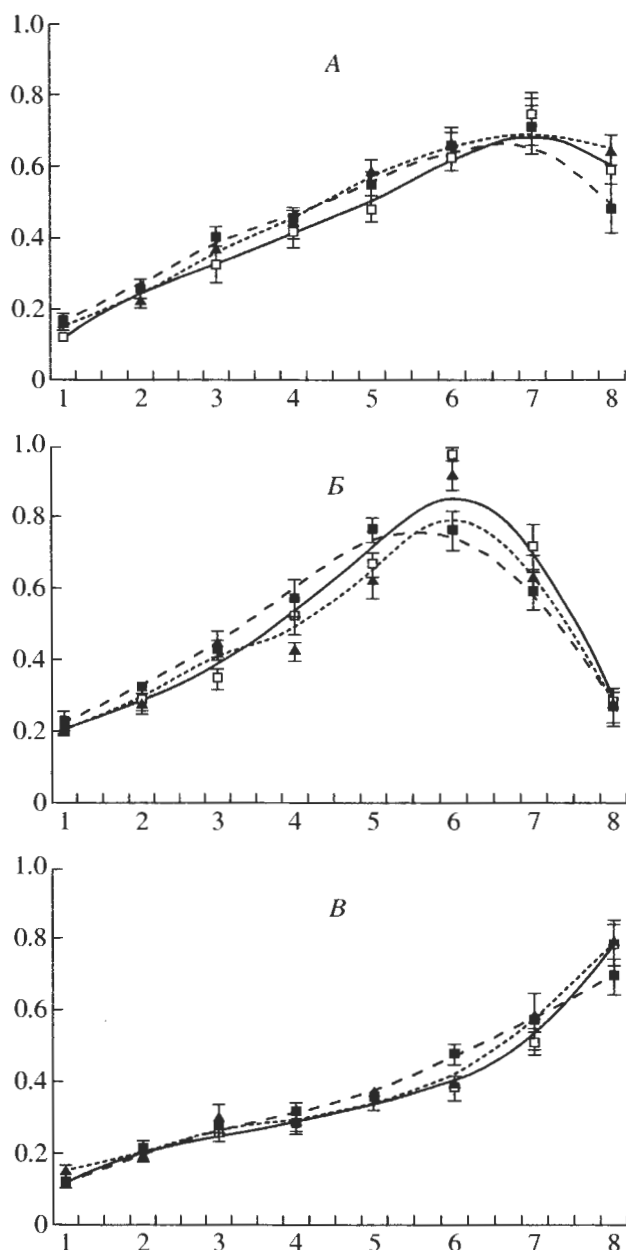


Рис. 3. Размеры площадей исследуемых структур мозга полевок (средние значения \pm ошибка средней). По оси абсцисс – анализируемые уровни мозга (см. табл. 1), по оси ординат – площадь, мм². Светлые квадраты, сплошная линия – группа, обучавшаяся в лабиринте, треугольники, пунктирная линия – группа “активного” контроля, темные квадраты, точки – группа “пассивного” контроля. А – поле СА1, Б – поле СА3, В – зубчатая фасция.

чавшейся в лабиринте и группы “активного” контроля.

У животных группы “активного” контроля наибольшее число c-Fos-экспрессирующих клеток было на уровнях, где размеры соответствующих полей были максимальны. У обеих групп интенсивность экспрессии в ростральных отделах (рас-

Таблица 1. Уровни анализируемых срезов мозга полевок

Выбранные уровни	1	2	3	4	5	6	7	8
Расстояние каудальнее брегмы, мм	1.22	1.58	1.82	2.18	2.46	2.8	3.16	3.52
	1.34	1.7	1.94	2.3	2.52	2.92	3.28	3.64
	1.46		2.06		2.7	3.08	3.4	3.8

стояние от брегмы до уровня -2.7) не различалась. Но, начиная с уровня от -2.7 до -3.08 мм (-2.7 мм – начало вентрального Гп), интенсивность экспрессии в группе, обучавшейся в лабиринте, значительно превышала показатели “активного” контроля (рис. 4). Максимальное число c-Fos-экспрессирующих клеток в поле СА1 группы, обучавшейся в лабиринте, отмечено в самых каудальных отделах (от -3.52 до -3.8 мм; отличия от контрольной группы достоверны, $t_{(25)} = 4.43$, $p < 0.001$). В поле СА3 максимальное значение было в диапазоне от -2.8 до -3.08 мм (различия групп были достоверны, $t_{(31)} = 5.36$, $p < 0.001$, и сохранялись в более каудальных отделах Гп: область от -3.52 до -3.64 мм, $t_{(13)} = 2.75$, $p < 0.05$). В ЗФ максимальное число c-Fos-

экспрессирующих клеток также находилось в самых каудальных отделах Гп (от -3.52 до -3.8), но достоверные различия показателей между группой, обучавшейся в лабиринте, и “активного” контроля наблюдались уже с уровня от -2.46 до -2.7 ($t_{(34)} = 2.82$, $p < 0.01$) и до самых каудальных отделов (уровень от -2.8 до -3.08 мм: $t_{(30)} = 2.41$, $p < 0.05$; от -3.16 до -3.4 : $t_{(19)} = 3.17$, $p < 0.01$; от -3.52 до -3.8 мм: $t_{(22)} = 2.99$, $p < 0.01$).

Анализ плотностей экспрессирующих клеток выявил сходные изменения вдоль ростро-каудальной оси (усиление экспрессии белка c-Fos в каудальных отделах Гп полевок, обучавшихся в лабиринте). Плотность в ростральных отделах была одинаково высока в обеих группах (табл. 2). Неравномерность плотности экспрессирующих нейронов по ростро-каудальной оси в группе, обучавшейся в лабиринте, обнаружена только в поле СА3 ($F_{(7,92)} = 2.19$, $p < 0.05$) и ЗФ ($F_{(7,93)} = 2.14$, $p < 0.05$). Зависимость плотности от расстояния от брегмы имела U-образную форму, т. е. в ростральной (от -1.22 мм до -1.82 мм) и каудальной (от -3.16 до -3.8) частях интенсивность экспрессии была одинаково высока. В группе “активного” контроля неравномерность была выявлена во всех структурах (для

Таблица 2. Значения плотности (средние значения \pm ошибка средней числа экспрессирующих клеток/мм²) в различных полях гиппокампа по разным уровням ростро-каудальной оси (отмечены анализируемые уровни)

Уровни		1	2	3	4
Поле СА1	Основная группа	75.77 \pm 14.10	97.36 \pm 25.26	81.56 \pm 52.29	72.29 \pm 17.36
	Группа активного контроля	95.03 \pm 7.87	92.00 \pm 10.37	63.58 \pm 9.54	66.92 \pm 13.12
Поле СА3	Основная группа	98.00 \pm 13.04	72.00 \pm 14.53	61.25 \pm 13.13	83.14 \pm 15.41
	Группа активного контроля	91.17 \pm 4.96	67.56 \pm 6.81	72.01 \pm 8.99	52.77 \pm 10.79
Зубчатая фасция	Основная группа	83.58 \pm 0.92	64.21 \pm 9.50	60.77 \pm 9.67	51.72 \pm 11.82
	Группа активного контроля	66.82 \pm 6.91	70.82 \pm 7.64	41.26 \pm 5.86	37.12 \pm 8.30
Уровни		5	6	7	8
Поле СА1	Основная группа	62.34 \pm 6.86	61.21 \pm 4.88	85.93 \pm 9.19	98.26 \pm 8.30
	Группа активного контроля	61.64 \pm 8.92	75.58 \pm 10.32	61.15 \pm 13.97	39.10 \pm 9.00
Поле СА3	Основная группа	72.15 \pm 6.46	89.42 \pm 5.26	65.56 \pm 6.07	76.51 \pm 14.28
	Группа активного контроля	$t_{(41)} = 2.71$, $p < 0.01$ 50.89 \pm 4.68	$t_{(31)} = 6.01$, $p < 0.001$ 43.33 \pm 4.98	49.79 \pm 12.52	54.72 \pm 18.71
Зубчатая фасция	Основная группа	55.74 \pm 7.51	43.45 \pm 4.80	50.08 \pm 6.68	73.29 \pm 13.87
	Группа активного контроля	$t_{(38)} = 3.46$, $p < 0.01$ 27.18 \pm 3.97	$t_{(31)} = 3.00$, $p < 0.01$ 24.16 \pm 3.69	30.96 \pm 7.52	$t_{(22)} = 2.90$, $p < 0.01$ 25.44 \pm 7.18

Примечание. Приведены данные по полям СА1, СА3 и зубчатой фасции в группе, обучавшейся в лабиринте, и активного контроля. Различия групп оценены по t-критерию Сьюдента.

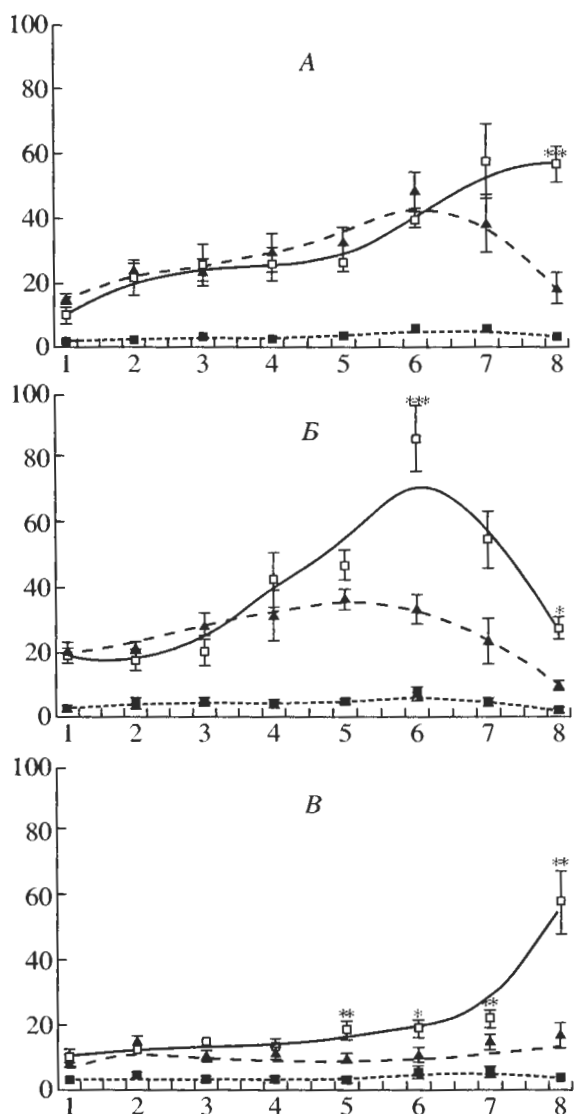


Рис. 4. Число c-Fos экспрессирующих нейронов (среднее \pm ошибка средней), обнаруженное на срезе в пределах площади исследуемой структуры. По оси абсцисс – анализируемые уровни мозга (см. табл. 1), по оси ординат – число клеток. Светлые квадраты – группа, обучавшаяся в лабиринте, треугольники – группа “активного” контроля, темные квадраты – группа “пассивного” контроля. Разница показателей по сравнению с результатами группы “активного” контроля достоверна при: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$. А – поле CA1, Б – поле CA3, В – зубчатая фасция.

поля CA1 $F_{(7,89)} = 2.70$, $p < 0.05$, для поля CA3 $F_{(7,87)} = 3.49$, $p < 0.05$, для ЗФ $F_{(7,93)} = 8.60$, $p < 0.001$), но ее характер был иной: наибольшая плотность была только в ростральных отделах. Интенсивность экспрессии белка c-Fos у полевок второй подгруппы (“медленновыходящие”) соответствовала уровню средних значений первой подгруппы (“быстро-выходящие”); отмечено усиление экспрессии в каудальных отделах.

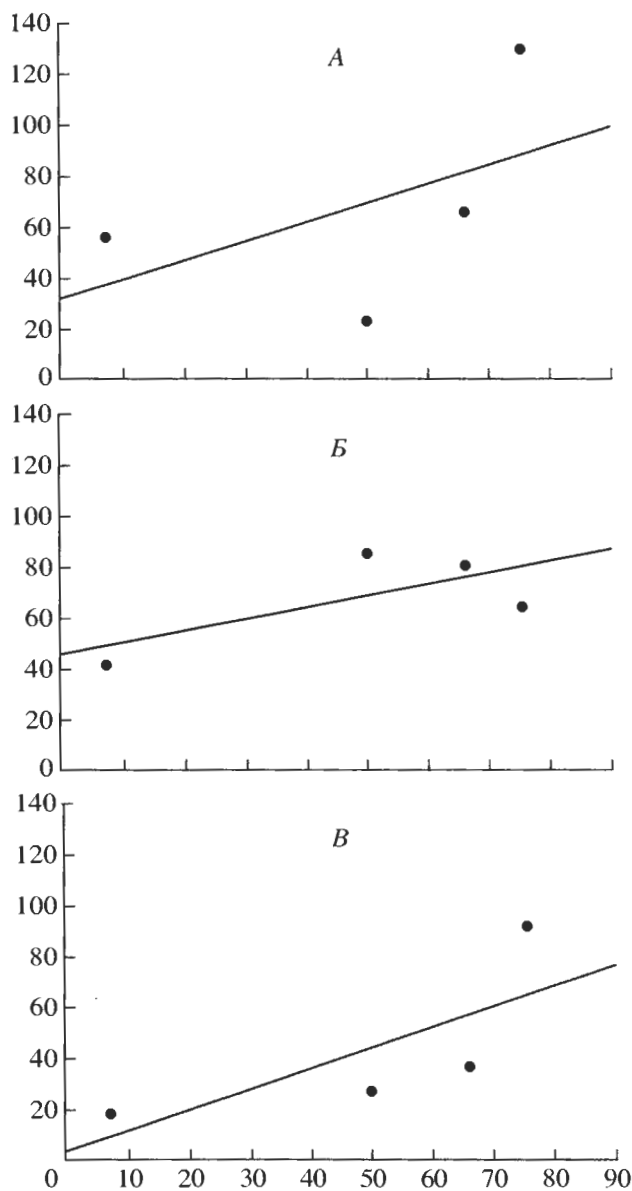


Рис. 5. Корреляция показателей максимальной интенсивности экспрессии гена c-fos и успешности обучения. По оси абсцисс – разница между значениями латентных периодов выхода из лабиринта в шестую и первую попытку, с; по оси ординат – максимальное значение числа нейронов экспрессирующих c-Fos. А – поле CA1, Б – поле CA3, В – зубчатая фасция.

Корреляции между максимальным числом экспрессирующих нейронов и показателем обучения (разница значений латентных периодов выхода из лабиринта в первую и шестую попытку) вычисляли только для полевок первой подгруппы (рис. 5). Тенденция к положительной корреляции, т.е. к большей экспрессии при большей успешности обучения, была выявлена для поля CA1 и ЗФ. Не было выявлено достоверных различий по интенсив-

ности экспрессии белка *c-Fos* в правом и левом полушариях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отличие от классических методик изучения пространственной памяти [9, 21, 23], где обучение длится несколько дней, целью нашей работы было оценить активацию Гп после обучения выполнению новой пространственной задачи. Эксперименты показали, что полевки быстро (за шесть попыток в течение одного дня) обучаются выходить из лабиринта, запоминать направление рукава, ведущего в “домашнюю” клетку, и выделять его из всех остальных. Поиск выхода сопровождался высокой исследовательской активностью животных, часто усиливающейся по мере их адаптации к процедуре тестирования. Это иногда препятствовало быстрому выходу полевок из лабиринта (в двух отмеченных случаях такая форма поведения становилась доминирующей). К сожалению, малое число животных не дает нам возможности детального анализа поведения, как это было сделано другими авторами на большой выборке (см. [4]), хотя можно констатировать значительную вариабельность исследовательского поведения, по-разному проявляющегося на разных этапах пространственного обучения (это ранее отмечалось и для полевок другого вида [28]).

Вращение лабиринта между попытками исключало использование любых внутрिलाбиринтных стимулов, выделение целевого рукава могло происходить только на основе ориентации по внелабиринтным (главным образом зрительным) стимулам. Это подтверждается отсутствием у полевок предпочтения рукавов, через которые они выходили в предыдущую попытку.

Оценка экспрессии гена *c-fos* в Гп показала, что она была выше у полевок, обучавшихся в лабиринте, чем у представителей контрольных групп. Это подтвердило данные других авторов, полученные на крысах, обучавшихся выполнению стандартной пространственной задачи в 8-лучевом [14, 15, 29] и на мышах в модифицированном крестообразном лабиринте [24], несмотря на значительные отличия процедур обучения и используемых контрольных групп. В одном из экспериментов [29] сравнивали эффекты тестирования в знакомом лабиринте у двух групп предварительно обученных крыс в условиях, когда приманка могла быть во всех 8 рукавах или только в одном, т.е. оценивали эффект большей нагрузки на рабочую память. Как и в нашем эксперименте, было обнаружено усиление экспрессии в полях CA1, CA3 и в ЗФ, но число экспрессирующих клеток в Гп было меньше (в 3–5 раз), чем в нашем случае, причем активация Гп “активного” контроля также была ниже (в 3 раза). Возможно, что более высокий уровень экспрессии в наших опытах – это следствие видовых различий

исследуемых объектов. Кроме того, в нашем эксперименте полевки впервые попадали в лабиринт, процесс обучения в новой сложной пространственной среде мог вызывать большую активацию Гп, чем поиск приманки в уже знакомом лабиринте. Второй эксперимент С. Вани [29], когда обученных крыс тестировали в другой комнате, подтверждает этот вывод.

В опытах других авторов [14, 15] в отличие от наших не было получено различий экспрессии в Гп в 1-й день тестирования в 8-лучевом радиальном лабиринте: они появились только на 3-й день и только в поле CA3. Все крысы до основного эксперимента имели опыт посещения рукавов и поиска приманок. Основную группу тестировали по методике, когда приманка каждый раз была в одних и тех же 4 рукавах, а контрольную – в том же лабиринте, но приманка была в центре. Интенсивность экспрессии увеличивалась во всех полях и в ЗФ в том случае, если набор целевых рукавов варьировали от попытки к попытке [15]. В отличие от этих опытов в нашем случае полевок группы “активного” контроля не помещали в лабиринт, они лишь проходили по рукаву, отсоединенному от него, в домашнюю клетку, т.е. в контроле не было той же самой, что и в опыте, пространственно-структурированной среды. В этом случае после обучения выполнению пространственной задачи активировались все поля Гп и ЗФ, но только в каудальных отделах. Необходимо отметить, что такие характеристики активации Гп не зависели от уровня исследовательской активности. Показатели подгрупп “медленновыходящих” и “быстровыходящих” полевок не различались. По-видимому, основное влияние на активацию каудальных отделов Гп оказывал собственно процесс обучения в сложной пространственной среде, независимо от индивидуальных особенностей проявления исследовательской активности.

В отличие от предшествующих работ нами была проанализирована интенсивность экспрессии белка *c-Fos* в Гп по отдельным полям в росто-каудальном направлении. В других работах для оценки применяли усредненные показатели, взятые с трех-четырёх срезов рострального гиппокампа [14, 15, 24, 29], авторы не ставили задачу анализировать экспрессию по всему Гп. Наши данные позволили выявить более тонкие особенности в функционировании разных отделов этой структуры. Мы не обнаружили различий в интенсивности экспрессии белка *c-Fos* в Гп группы, обучавшейся в лабиринте, и “активного” контроля в ростральных отделах, в том числе на уровнях, оцениваемых в упомянутых выше работах.

Неоднородность активации Гп в росто-каудальном направлении в наших экспериментах можно объяснить особенностями вентрального Гп, представленного только в каудальных отделах.

Функциональные различия дорзального и вентрального Гп найдены и описаны в литературе (см. [5, 6, 8, 16]), в том числе и различия характеристик клеток места [17]. Данные об участии вентрального Гп в процессах пространственного обучения противоречивы, одни авторы отмечают большее участие дорзального отдела [8, 22], другие склоняются к выводу о вовлечении обеих этих частей Гп [10]. В упомянутой выше работе С. Ванн [29] показано, что в вентральном Гп число c-Fos-экспрессирующих клеток было в 2–3 раза больше, чем в дорзальном, как в основной, так и в контрольной группе. Но увеличение интенсивности экспрессии после пространственного обучения было сильнее в дорзальном Гп. Авторы предположили, что в процессах пространственного обучения участвует Гп в целом, хотя вентральный Гп вовлекается меньше дорзального.

Нами показано, что увеличение экспрессии c-Fos происходило в каудальных областях Гп, которые включали как дорзальный, так и вентральный Гп, и мы не можем исключить вовлечение вентрального отдела в процесс обучения новой пространственной задаче. В отличие от этого экспрессия c-Fos в роstralных отделах, представленных исключительно дорзальным Гп, одинаково усиливалась по сравнению с группой “пассивного” контроля как при обучении, так и в группе “активного” контроля. Здесь уместно напомнить о наличии корреляций способностей грызунов к пространственному обучению и размеров площадей проекций мшистых волокон Гп (см. [25, 27]), которые относятся именно к каудальным отделам дорзального Гп.

Представленные нами данные позволяют сделать вывод о необходимости учитывать особенности активации по роstral-каудальной оси полей Гп и ЗФ при исследовании механизмов вовлечения этой структуры в процессы пространственного обучения, особенно нового для животных. В дальнейшем мы планируем дополнить полученные нами данные, в частности, провести эксперименты с использованием разработанной методики на других видах грызунов, включая и лабораторных мышей.

ВЫВОДЫ

1. Разработана адекватная методика для оценки активации гиппокампа обыкновенных полевок (*Microtus arvalis* Pall.) после быстрого обучения их выполнению пространственной задачи: нахождения выхода в домашнюю клетку из модифицированного 8-рукавного радиального лабиринта.

2. Обучение сопровождалось высоким уровнем исследовательской активности животных. Отмечены значительные индивидуальные различия по ее интенсивности и проявлению на разных стадиях обучения.

3. Обучение вызывало усиление нейронной экспрессии белка c-Fos, которое происходило главным образом в каудальных отделах гиппокампа. Такое увеличение уровня экспрессии, по-видимому, не зависело от индивидуальных особенностей исследовательской активности полевок.

4. Усиление экспрессии белка c-Fos при пространственном обучении происходило во всех исследованных областях, однако оно было более выраженным в поле СА3 и в зубчатой фасции, чем в поле СА1.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 01-04-48290 и 04-04-48445) и того же фонда в поддержку молодых ученых и студентов (грант № 02-04-06268), а также Swiss National Foundation (гранты 7IP62645, SNF 31-57139.99 и NCCR “Neural Plasticity and Repair”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Анохин К.В. Молекулярно-генетические предпосылки системогенеза поведенческих актов // Теория системогенеза / Под ред. Судакова К.В. М.: Гориздат, 1997. С. 215–276.
2. Виногадова О.С. Гиппокамп и память. М.: Наука, 1975. 334 с.
3. Григорьев Н.Р. Функциональная организация поисковой активности. Автореф. дис. докт. мед. наук. Чита: Амурская государственная медицинская академия, 1998. 42 с.
4. Никольская К.А., Хоничева Н.М. Особенности обучения крыс в условиях свободного выбора // Журн. высш. нерв. деят. 1999. Т. 49. № 3. С. 436–445.
5. Унгуадзе А.А. Поведенческие и электрофизиологические эффекты электрического раздражения гиппокампа // Физиол. журн. СССР. 1970. Т. 56. № 11. С. 1531–1538.
6. Чайченко Г.М. Функциональная роль дорзального и вентрального гиппокампа в оборонительном поведении крыс // Журн. высш. нерв. деят. 1984. Т. 34. № С. 1109–1115.
7. Ammassari-Teule M., Hoffmann H.J., Rossi-Arnaud C. Learning in inbred mice: strain-specific abilities across three radial maze problems // Behav. Genet. 1993. V. 23. P. 405–412.
8. Bannerman D.M., Yee B.K., Good M.A., Heupel M.J., Iversen S.D., Rawlins J.N. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions // Behav. Neurosci. 1999. V. 113. P. 1170–1188.
9. Barnes C.A., Nadel L., Honig W.K. Spatial memory deficit in senescent rats // Can. J. Psychol. 1980. V. 34(1). P. 3429–3439.
10. De Hoz L., Knox J., Morris R.G.M. Longitudinal axis of the hippocampus: both septal and temporal poles of the hippocampus support water maze learning depending on the training protocol // Hippocampus. 2003. V. 13. P. 587–603.

11. Franklin K., Paxinos G. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Acad. Press, 1997. 115 p.
12. Galea L.A., Ossenkopp K.P., Kavaliers M. Developmental changes in spatial learning in the Morris water-maze in young meadow voles, *Microtus pennsylvanicus* // *Behav. Brain Res.* 1994. V. 60. P. 43–50.
13. Good M.A. Spatial memory and hippocampal function: Where are we now? // *Psicologica.* 2003. V. 23. P. 109–132.
14. He J., Yamada K., Nakajima A., Nabeshima T. Learning and memory in two different reward tasks in a radial arm maze in rats // *Behav. Brain Res.* 2002. V. 134. P. 139–148.
15. He J., Yamada K., Nabeshima T. A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats // *Neuropsychopharmacology.* 2002. V. 26. P. 259–268.
16. Hock B.J.J., Bunsey M.D. Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 7027–7032.
17. Jung M.W., Wiener S.I., McNaughton B.L. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 7347–7356.
18. Katz L.F., Ball G.F., Nelson R.J. Elevated Fos-like immunoreactivity in the brains of postpartum female prairie voles, *Microtus ochrogaster* // *Cell. Tissue Res.* 1999. V. 298. P. 425–435.
19. Kavaliers M., Galea L.A. Spatial water maze learning using celestial cues by the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus* // *Behav. Brain Res.* 1994. V. 61. P. 97–100.
20. Masuda Y., Odashima J., Murai S., Saito H., Itoh M., Itoh T. Radial arm maze behavior in mice when a return to the home cage serves as the reinforced // *Physiol. Behav.* 1994. V. 56. № 4. P. 785–788.
21. Morris R.G., Garrud P., Rawlins J.N., O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions // *Nature.* 1982. V. 297. P. 681–683.
22. Moser E., Moser M.B., Andersen P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions // *J. Neurosci.* 1993. V. 13. P. 3916–3925.
23. Olton D.S., Walker J.A., Gage F.H. Hippocampal connections and spatial discrimination // *Brain Res.* 1978. V. 139. P. 295–308.
24. Passino E., Middei S., Restivo L., Bertaina-Anglade V., Ammassari-Teule M. Genetic approach to variability of memory systems: analysis of place vs. response learning and fos-related expression in hippocampal and striatal areas of C57BL/6 and DBA/2 mice // *Hippocampus.* 2002. V. 12. № 1. P. 63–75.
25. Pleskacheva M.G., Wolfer D.P., Kupriyanova I.F., Nikolenko D.L., Scheffrahn H., Dell'Omo G., Lipp H.-P. Hippocampal mossy fibers and swimming navigation learning in two vole species occupying different habitats // *Hippocampus.* 2000. V. 10. P. 17–30.
26. Sawrey D.K., Keith J.R., Backes R.C. Place learning by three vole species (*Microtus ochrogaster*, *M. montanus*, and *M. pennsylvanicus*) in the Morris swim task // *J. Comp. Psychol.* 1994. V. 108. P. 179–188.
27. Schwegler H., Crusio W.E., Brust I. Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse: a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory // *Neuroscience.* 1990. V. 34. P. 293–298.
28. Teskey G.C., Ossenkopp K.P., Kavaliers M., Innis N.K., Boon F.H. Individual differences in radial maze performance and locomotor activity in the meadow vole, *Microtus pennsylvanicus* // *Physiol. Behav.* 1998. V. 65. P. 555–561.
29. Vann S.D., Brown M.W., Erichsen J.T., Aggleton J.P. Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 2711–2718.