

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.821.2+612.825

**РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ И ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА c-Fos В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ НАУЧЕНИИ**

© 2001 г. О. Е. Сварник, К. В. Анохин, Ю. И. Александров

*Институт психологии РАН, Институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН, Москва*

Поступила в редакцию 06.12.2000 г.

Принята в печать 10.01.2001 г.

В настоящее время исследование научения осуществляется на самых различных уровнях, включая такие, как нейронный и молекулярно-биологический. Интеграция данных, полученных на этих двух уровнях, может способствовать разработке целостных представлений о процессах, происходящих в головном мозге при научении.

Данные, полученные нейрофизиологическими методами, свидетельствуют в пользу того, что научение осуществляется за счет процесса "поведенческой специализации" молчащих нейронов запаса [1, 3, 5, 7]. Согласно системно-селекционной теории формирование нового поведенческого акта при научении включает формирование новой функциональной системы - системогенез; на нейронном уровне этому процессу соответствует формирование специализаций нейронов относительно этой системы [7]. Специализация нейронов проявляется в возникновении у ранее "молчащих" нейронов активаций, неизменно появляющихся при осуществлении сформированного поведенческого акта.

Неоднократно было показано, что различные структуры мозга характеризуются различными паттернами поведенческих специализаций нейронов [1]. Так, в моторной коре превалируют нейроны, специализированные относительно систем, сформированных на ранних этапах индивидуального развития: так называемые нейроны старых систем, например нейроны "движения" или "захвата пищи". В цингулярной коре преобладают нейроны, специализированные относительно новых систем, сформированных при обучении животных в экспериментальной клетке, например нейроны "нажатия на педаль" [4]. Сравнение паттернов специализаций в ретроспленальной области цингулярной коры и в антеролатеральной области моторной коры кроликов показывает, что число "новых" нейронов в первой из них на порядок выше, чем во второй. Было также показано, что паттерны специализаций в цингулярной коре сходны у кроликов и у крыс: "новые" нейроны превалируют у животных обоих видов [3]. Дальнейшее исследование В.В. Гаврилова и др.

выявляет сходство между паттернами специализаций и для моторной коры крыс и кроликов. Таким образом, соотношение паттернов специализаций нейронов у крыс оказывается такое же, как у кроликов.

По-видимому, процессы формирования специализаций нейронов обеспечиваются долговременными изменениями в функционировании клетки и клеточных связях, что должно требовать активации экспрессии генов. Было показано, что обучение индуцирует каскады молекулярных перестроек в нейронах и что экспрессия непосредственных ранних генов является одним из критических элементов таких модификаций [2]. При формировании нового поведения индукция гена *c-fos* - одного из основных членов семейства непосредственных ранних генов - варьирует в разных структурах мозга. В работе К.О. Жу с соавт. [9] было установлено, что набор активирующихся структур головного мозга крыс, обнаруженный методом иммуногистохимического картирования, совпадает с набором активирующихся структур, выявляемым при регистрации нейронной активности, во время предъявления знакомых или незнакомых объектов. Все сказанное выше позволяет предположить, что межструктурные различия уровней экспрессии генов могут быть связаны с различием вкладов сопоставляемых структур мозга в процесс специализации нейронов при научении. Для того чтобы проверить это предположение и тем самым приблизиться к пониманию молекулярно-биологических основ формирования специализаций нейронов, необходимо было сопоставить число нейронов, экспрессирующих ранние гены в данной структуре мозга при научении, со степенью ее вовлеченности в формирование новых специализаций. Насколько нам известно, такие сопоставления ранее не проводились. Задача настоящего исследования заключалась в том, чтобы сопоставить паттерны поведенческих специализаций нейронов в антеролатеральной и цингулярной коре с индукцией экспрессии транскрипционного фактора *c-Fos* в этих областях при научении.



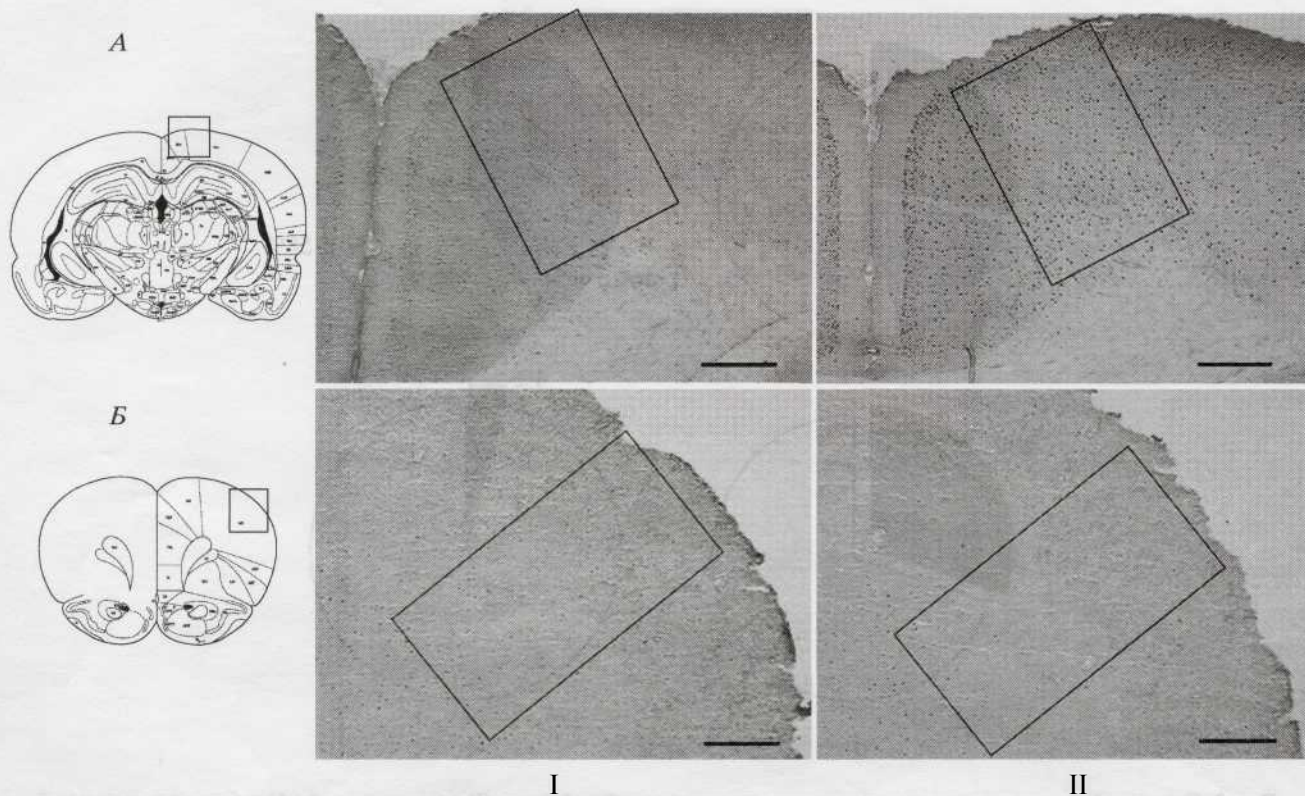
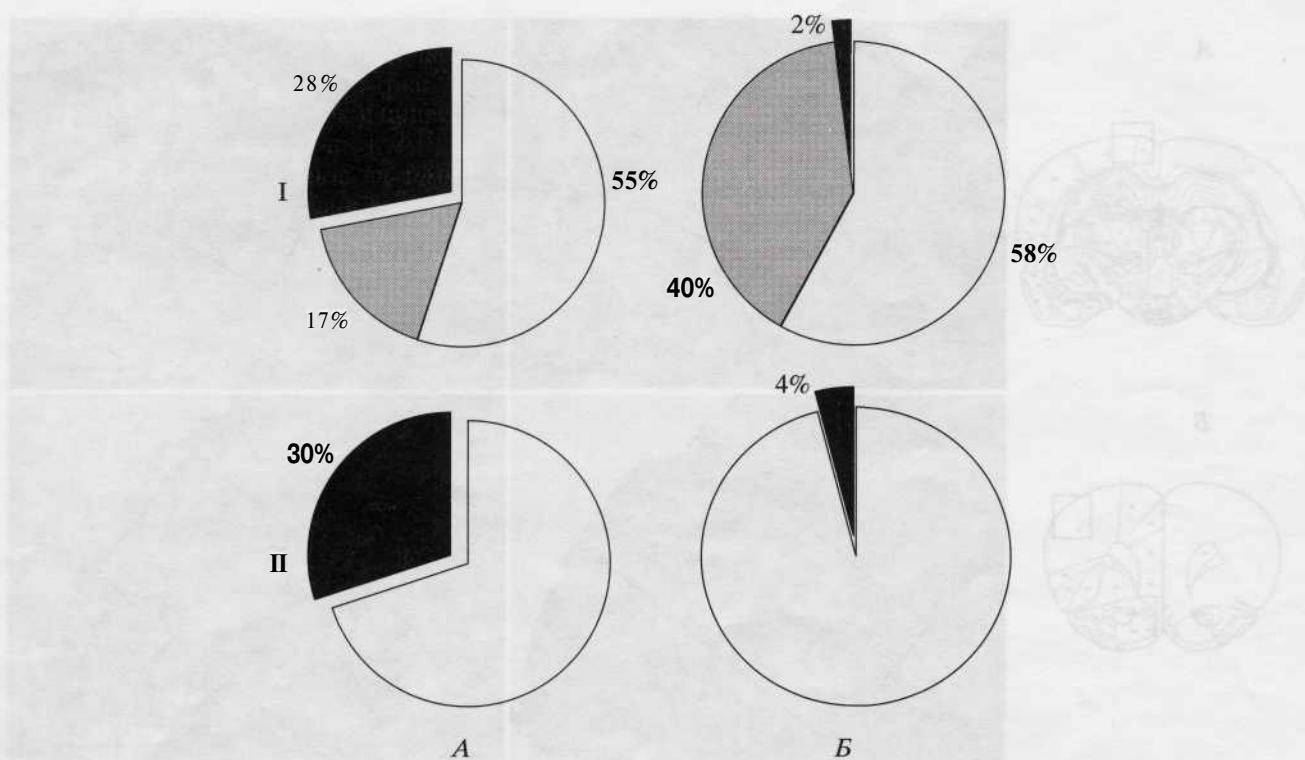


Рис. 1. Диаграммы фронтальных срезов, обозначающие исследуемые области, и микрофотографии фронтальных срезов, показывающие Fos-окрашенные ядра нейронов в цингулярной (А) и антеролатеральной (Б) коры крыс группы пассивного контроля (I) и сформировавших новое поведение (II). Калибровка: 500 мкм.

Капюшонных крыс (Long Evans, самцы массой 250 г,  $n = 8$ ) поэтапно обучали инструментально-пищедобывательному поведению в экспериментальной клетке с одной кормушкой и одной педалью. Такое поведение явилось аналогом поведения животных при регистрации нейронной активности в экспериментах по определению нейронной специализации [1, 3]. Обучение проводили в течение 13 дней в несколько этапов. На первом этапе крыс обучали захватывать пищу из кормушки, на втором - поворачиваться от кормушки к середине клетки, на третьем - отходить от кормушки и подходить к середине стенки клетки, на четвертом - подходить к педали и на пятом - нажимать на педаль. Каждый этап занимал два сеанса обучения по 30 мин; в день проводили один сеанс. В течение последнего 30-минутного сеанса обучения животные научились нажимать на педаль. Затем крыс помещали в домашние клетки на 1 ч 15 мин, после чего усыпляли ингаляционным наркозом и декапитировали. Непосредственно после этого мозг животных извлекали и замораживали в жидком азоте. Животных группы пассивного контроля (Long Evans, самцы, массой 250 г,  $n = 3$ ) брали из домашней клетки непосредственно перед декапитированием. Были приготовлены фронтальные криостатные срезы мозга толщиной 20 мкм. Мозг каждого животного был представлен 10 парами

последовательных срезов антеролатеральной коры (+2.5...+3.5 мм от брегмы) и 10 парами последовательных срезов цингулярной коры (-4.0...-5.0 мм от брегмы). Выбранные координаты соответствовали координатам регистрации импульсной активности нейронов головного мозга крыс в экспериментах по определению поведенческих специализаций нейронов [3]. Первый срез каждой пары использовали для иммуногистохимической окраски, которая была проведена в соответствии с протоколом стрептавидин-биотин-пироксидазного иммуногистохимического набора ("Vector Laboratories", США). Для реакции были использованы поликлональные кроличьи антитела к белку Fos ("Calbiochem", Ab-5 Cat. № PC38, США) в разведении 1 : 2000. Второй срез каждой пары окрашивали по Нисслю. Изображения правых полушарий микропрепаратов срезов мозга, полученные с помощью микроскопа Olympus VX-50 (Япония) и видеокамеры Panasonic WV-CP230 (Япония), анализировались в компьютерной программе Image Pro Plus 3.0. Анализ распределения Fos-положительных клеток в исследуемых областях был проведен на площади прямоугольника, одна сторона которого равнялась глубине коры, а вторая составила 1 мм, что примерно соответствовало ширине области регистрации импульсной активности нейронов.





**Рис. 2.** Сопоставление паттернов поведенческих специализаций нейронов (I) в цингулярной (A) и антеролатеральной коре (B) [1,3] с относительными долями Fos-положительных нейронов (II) в этих областях. I: темный сектор - процент нейронов, принадлежащих к новым системам; сектор со штриховкой - принадлежащих к старым системам; светлый сектор - не вовлекающихся в данное поведение. II: темный сектор - процент нейронов, экспрессирующих c-Fos; светлый сектор - не экспрессирующих c-Fos.

Динамика поведения животных экспериментальной группы в течение последнего 30-минутного сеанса обучения была следующей. Первая треть времени в экспериментальной клетке была представлена в основном актами подхода к педали, не приводящими к подаче кормушки, ориентировочно-исследовательским поведением и единичными актами нажатия. В дальнейшем происходило увеличение числа нажатий на педаль и уменьшение проявлений ориентировочно-исследовательского поведения. В последней трети достигался критерий 10 нажатий подряд, после которого поведенческий акт нажатия на педаль считался сформированным.

Анализ иммуногистохимически окрашенных срезов головного мозга животных пассивного контроля выявил, что экспрессия транскрипционного фактора c-Fos в исследуемых областях у этих крыс находится на низком уровне (рис. 1, I). Плотность Fos-положительных клеток в цингулярной коре составила  $30 \pm 9$  нейронов на  $1 \text{ мм}^2$ , а в антеролатеральной —  $18 \pm 8$  нейронов на  $1 \text{ мм}^2$ . Дальнейший анализ показал, что уровни экспрессии c-Fos этих двух областей достоверно не различаются: процент Fos-положительных нейронов от общего числа клеток на срезе в каждой области оказался равен соот-

ветственно 3.7 и 3. Анализ иммуногистохимически окрашенных срезов головного мозга животных, сформировавших новое поведение, выявил увеличение уровня экспрессии c-Fos в цингулярной коре по сравнению с контрольными животными (рис. 1, II). Экспрессия наблюдалась и в цингулярной, и в антеролатеральной коре. Плотность Fos-положительных клеток в цингулярной коре составила  $258 \pm 69$  нейронов на  $1 \text{ мм}^2$ , а в антеролатеральной —  $29 \pm 6$  нейронов на  $1 \text{ мм}^2$ . Процент Fos-положительных нейронов от их общего числа на срезе в цингулярной коре составил 30.1, что было достоверно выше ( $p < 0.05$  по T-критерию Вилкоксона), чем в антеролатеральной коре, где процент Fos-положительных нейронов оказался равным 3.6.

Таким образом, сопоставление индукции экспрессии транскрипционного фактора c-Fos при научении с ранее выявленным паттерном поведенческих специализаций нейронов показало, что данный ген c-fos экспрессируется главным образом в цингулярной коре, число нейронов новых специализаций которой превышает число таковых в антеролатеральной коре на порядок (рис. 2). Порядок различия между долей Fos-положительных нейронов в цингулярной коре и долей Fos-положительных нейронов в антеролатеральной коре оказался ана-

логичным. Полученные данные свидетельствуют в пользу высказанного предположения о том, что экспрессия транскрипционного фактора *c-Fos* связана с формированием новых специализаций нейронов при научении.

В настоящее время процессы специализации нейрона могут быть описаны лишь гипотетически. Известно, что при научении наблюдаются две фазы генетических процессов: сначала активируется экспрессия ранних генов, а затем экспрессия регулируемых ими генов-мишеней [2]. Можно предположить, что такая двухфазность отражает стадии процесса специализации нейрона относительно системы поведенческого акта. Выше было отмечено, что специализация нейронов происходит за счет молчащих нейронов или нейронов "запаса". Данные литературы показывают [4, 8], что определенные воздействия, изменяющие микросреду нейронов (ионофорез, электрическая стимуляция), приводят к появлению активаций у ранее молчащих клеток. В то же время изменения микросреды нейрона, имеющие место при ишемии, температурном шоке, введении судорожных агентов, а также при научении приводят к активации экспрессии ранних генов [2, 6]. Следовательно, можно предположить, что изменения микросреды молчащего нейрона при научении, с одной стороны, связаны с появлением у них активаций, а с другой - с экспрессией ранних генов, которая является первым этапом каскада процессов, ведущих к специализации.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 99-04-49303 и 00-15-98838) и Российского гуманитарного научного фонда (грант № 99-06-00169)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров Ю.И., Греченко Т.Н., Гаврилов В.В. и др. Закономерности формирования и реализации индивидуального опыта // Журн. высш. нерв. деят. 1997. Т. 47. № 2. С. 243-260.
2. Анохин К. В. Молекулярные сценарии консолидации долговременной памяти // Журн. высш. нерв. деят. 1997. Т. 47. № 2. С. 261-279.
3. Гаврилов В.В., Гринченко Ю.В., Александров Ю.И. Сравнительное исследование паттернов поведенческой специализации нейронов лимбической коры крыс и кроликов // Материалы международной конференции "Новое в концепциях о механизмах ассоциативного обучения и памяти". Москва, 23-26 сентября, 1999.
4. Шерстнев В.В. Нейрохимическая характеристика "молчащих" нейронов коры мозга // Докл. АН СССР. 1972. Т. 202. № 6. С. 1473-1476.
5. Alexandrov Yu. I., Grinchenko Yu. V., Laukka S. et al. Acute effect of alcohol on unit activity in the motor cortex of freely moving rabbits: Comparison with the limbic cortex // Acta Physiol. Scand. 1991. V. 142. P. 429.
6. Herrera D.G., Robertson H.A. Activation *c-fos* in the brain // Progr. Neurobiol. 1996. V. 50. P. 83-107.
7. Shvyrkov V.B. Behavioral specialization of neurons and the system-selection hypothesis of learning // Human Memory and Cognitive Capabilities/Eds Klix F., Hagen-dorf H. Amsterdam: Elsevier, 1986. P. 599-611.
8. Swadlow H.A., Hicks T.P. Subthreshold receptive fields and baseline excitability of "silent" S1 callosal neurons in awake rabbits: contributions of AMPA/kainate and NMDA receptors // Exp Brain Res. 1997. V. 115. P. 403-409.
9. Zhu X.O., Brown M.V., McCabe B.J., Aggleton J.P. Effects of the novelty or familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene *c-fos* in rat brain // Neuroscience. 1995. V. 69. № 3. P. 821-829.

## Distribution of Behaviorally Specialized Neurons and Expression of Transcription Factor *c-Fos* in Rat Brain Cortex during Learning

O. E. Svarnik, K. V. Anokhin, Yu. I. Alexandrov

*Institute of Psychology, Russian Academy of Sciences, Anokhin Institute of Normal Physiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow*

In order to investigate the relation between the immediate early gene induction in neurons and neuronal specialization in respect to functional systems of newly formed behavior, the neuronal expression of *Fos* transcription factor in rat brain was studied in animals of learning group and home cage control group. Animals of the learning group acquired a new behavior of pressing a pedal. *Fos*-positive neurons were counted in the retrosplenial area of cingulate cortex and anterolateral area of motor cortex, i.e., the two brain regions that differ in the number of neurons showing specific activity during this behavior. In the home cage control animals the number of *Fos*-positive neurons was low and no difference was found between the two brain regions. In the animals of the learning group the number of *Fos*-positive neurons was significantly higher in the cingulate cortex characterized by the greater number of neurons specialized in relation to the system of new behavior. These findings suggest that the *c-Fos* expression can indicate the processes of neuronal specialization.