

УДК 612.821

**ОПЫТ ПЕРВОГО, “ВИБРИССНОГО”, НАВЫКА ВЛИЯЕТ НА ИНДУКЦИЮ  
ЭКСПРЕССИИ c-FOS В НЕЙРОНАХ БОЧОНКОВОГО ПОЛЯ  
СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫС ПРИ ОБУЧЕНИИ ВТОРОМУ,  
“НЕВИБРИССНОМУ”, НАВЫКУ**

© 2013 г. О. Е. Сварник<sup>1</sup>, К. В. Анохин<sup>2</sup>, Ю. И. Александров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория психофизиологии им. В.Б. Швыркова Института психологии РАН,

<sup>2</sup>Отдел нейронаук, Курчатовский нано-био-инфо-когно-социогуманитарный (НБИКС) Центр, Москва

e-mail: olgasva@psychol.ras.ru

Поступила в редакцию 20.03.2013 г.

Принята в печать 22.07.2013 г.

В настоящей работе была предпринята попытка создания у крыс контролируемой истории последовательного обучения двум навыкам для выявления закономерностей активации нейронов первого навыка при формировании второго. Животных обучали сначала инструментальному питьевому поведению, требующему использование левых или правых вибрисс (“вибриссный” навык), а затем пищедобывательному навыку нажатия на педаль, не требующему использования вибрисс. Было установлено, что обучение пищедобывательному навыку вызывает экспрессию c-Fos в достоверно большем числе нейронов бочонкового поля у животных, обучавшихся предварительно инструментальному питьевому (“вибриссному”) навыку, чем в аналогичной области контрольных животных, обучавшихся предварительно неинструментальному питьевому навыку. Наши данные позволяют предположить, что активация экспрессии c-Fos при втором обучении происходила и в тех нейронах, которые уже являлись специализированными относительно первого, “вибриссного”, навыка.

*Ключевые слова:* Fos, нейрон, обучение, питьевой навык, пищевой навык, бочонковое поле.

**Experience of the First “Whisker-Dependent” Task Influenced c-Fos Induction in Rat Barrel Cortex Neurons during Acquisition of the Second “Whisker-Independent” Task**

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

V.B. Shvyrkov Laboratory of Neural Bases of Mind, Institute of Psychology, Russian Academy of Sciences, Neuroscience Department, Kurchatov Nano-bio-info-cogno-sociohumanitarian (NBICS) Center, Moscow,

e-mail: olgasva@psychol.ras.ru

In this work we aimed to create a controlled history of two sequential trainings in order to find out activation patterns of “the first task” neurons during the second task learning. Rats were first trained to perform instrumental water rewarded behavior that required using left or right whiskers (a conditioned “whisking” task), and then to perform food-acquisition task of pedal pressing (not a conditioned “whisking” task). We found that food-acquisition task learning is accompanied by c-Fos induction in the barrel cortex neurons in animals that learned previously a conditioned “whisking” task. These data suggest that c-Fos induction during the second training took place in neurons that were specialized in relation to the first, “whisking” task.

*Keywords:* Fos, neuron, learning, water rewarded task, food-acquisition task, barrel cortex.

DOI: 10.7868/S0044467713060178

Многokратно было показано, что последовательное формирование нескольких навыков в определенном временном интервале может приводить к так называемой интерференции [12, 16], что свидетельствует в пользу наличия перекрывающихся на одном и том же нейронном субстрате молекулярных процессов. Можно предположить, что многие (если не все) виды обучения связаны по крайней мере с реактивацией предыдущего опыта [7, 13]. Однако экспериментальные исследования нейронных механизмов обучения и формирования индивидуального опыта чаще всего включают в себя только обучение одному навыку и, таким образом, не имеют контролируемой или учитываемой истории формирования данного опыта. В настоящей работе создавалась контролируемая история последовательного обучения двум различным навыкам для выявления закономерностей активации нейронов первого навыка при формировании второго.

## МЕТОДИКА

Эксперименты с животными проводили в соответствии с нормами Этической комиссии Института психологии РАН. Мы последовательно обучали крыс (самки Long-Evans,  $n = 11$ , возраст 6–8 мес.) двум видам поведения: сначала инструментальному питьевому поведению, требовавшему использования вибрисс, а затем пищедобывательному поведению, не требовавшему использования вибрисс. Инструментальное питьевое поведение заключалось в том, что животное проводило вибриссной подушкой (либо левой, либо правой) по краю рычага для получения порции воды в размере 20–30 мкл (группа “инструментальное питьевое”,  $n = 7$ ). Обучение данному виду поведения проходило поэтапно в течение пяти дней в течение 30-минутных ежедневных сессий: на первом этапе порция воды выдавалась в случае, если животное находилось рядом с поилкой; на втором этапе — животное отворачивалось от поилки; на третьем — животное подходило к середине клетки; на четвертом этапе — подходило к рычагу; на пятом этапе — крыса осуществляла контакт с рычагом (контролировалось визуально). В качестве контрольной группы мы обучали в течение такого же времени другую группу животных неинструментальному питьевому навыку, который заключался в том, что животное обучалось находить воду на

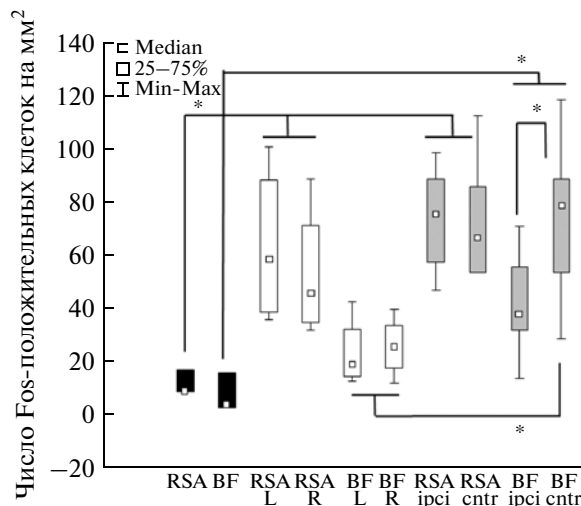
полке, где была расположена поилка (колодец с водой диаметром 3 см, группа “неинструментальное питьевое”,  $n = 4$ ). В этой ситуации от животных не требовалось выполнения инструментального акта использования вибрисс как условия доступа к порции воды. Животные обеих групп осуществляли приобретенные виды питьевого поведения в течение еще шести дней. Обучение животных проводилось на фоне питьевого депривации: животные получали свободный доступ к воде в домашней клетке только в течение 30 мин ежедневно после сессии обучения. После каждого сеанса обучения животных помещали на 5 мин в экспериментальную клетку пищевого навыка (где в дальнейшем они обучались пищедобывательному навыку) для привыкания к данной обстановке. За 24 ч до сессии пищевого обучения у животных забирался корм из домашней клетки для создания пищевой мотивации в последний экспериментальный день обучения пищевому навыку. В последний экспериментальный день животных помещали на 30 мин в экспериментальную клетку пищевого навыка, содержащую педаль и кормушку, для обучения пищедобывательному навыку нажатия на педаль (размеры педали позволяли осуществлять нажатие любым способом, в том числе путем залезания на педаль). Нажатие на педаль приводило к появлению порции пищи в кормушке (кубик сыра размером  $3 \times 3 \times 3$  мм). Данное пищевое поведение не требовало использования вибрисс как условия достижения результата (в отличие от питьевого поведения, приобретенного ранее). Через 75 мин после окончания сессии обучения пищедобывательному навыку животных усыпляли ингаляционным наркозом (эфиром) и декапитировали. Непосредственно после этого мозг животных извлекали и замораживали в жидком азоте. Животные группы пассивного контроля ( $n = 3$ ) были взяты из домашней клетки непосредственно перед декапитированием.

Вовлечение нейронов в формирование пищедобывательного навыка оценивали по индукции экспрессии транскрипционного фактора *c-Fos*, поскольку известно, что индукция экспрессии гена *c-fos* происходит при обучении, и распределение *Fos*-положительных нейронов зависит от того поведения, которое приобретается [2]. Для анализа распределения *c-Fos*-положительных нейронов в головном мозге были выбраны бочонковое поле соматосенсорной коры, поскольку из-

вестно, что нейроны данной области активируются при использовании грызунами вибрисс [10], и ретроспленальная кора, в которой большой процент нейронов у крыс специализирован относительно второго, пищедобывательного поведения нажатия на педаль [15]. Выявление индукции экспрессии c-Fos проводили иммуногистохимически в соответствии с протоколом стрептавидин-биотин-пироксидазного иммуногистохимического набора (Vectastain Elite ABC KIT, “Vector”, США). Для реакции были использованы поликлональные кроличьи антитела к c-Fos (AB-5, “Oncogene Science”, США) в разведении 1 : 2000. Оценку количества Fos-положительных клеток проводили на каждом из 10 срезов мозга каждого животного в прямоугольном поле, вписанном в каждую из выбранных областей. Для каждого животного осуществляли усреднение по всем срезам. Для анализа изображений срезов мозга использовали программу ImageProPlus (“Media Cybernetics”, США). Для оценки разницы между полушариями использовали критерий Вилкоксона, для оценки межгрупповых различий – критерий Манна–Уитни в программе Statistica 6.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Число Fos-положительных нейронов у животных контрольной группы из домашней клетки равнялось  $12 \pm 5$  в  $1 \text{ мм}^2$  (среднее  $\pm$  стандартная ошибка, здесь и далее) для ретроспленальной коры и  $8 \pm 7$  в  $1 \text{ мм}^2$  для бочонкового поля соматосенсорной коры (рисунки). Было установлено, что приобретение элемента опыта, связанного с выполнением пищедобывательного поведения нажатия на педаль после опыта питьевого “вибриссного” навыка, связано с индукцией экспрессии c-Fos как в нейронах ретроспленальной коры, так и в нейронах бочонкового поля соматосенсорной коры по сравнению с контрольной группой из домашней клетки (критерий Манна–Уитни,  $z = -2.39$  и  $z = -2.32$  соответственно,  $p = 0.02$ ). Однако у животных группы “инструментальное питьевое” число Fos-положительных нейронов в бочонковом поле соматосенсорной коры оказалось достоверно больше в контралатеральном полушарии (по отношению к вибриссной подушке, использованной при предварительном обучении питьевого навыку) –  $3 \pm 11$  клеток в  $1 \text{ мм}^2$ , чем в ипсилатеральном полушарии, –  $41 \pm 7$  клеток



Число Fos-положительных клеток на  $1 \text{ мм}^2$  в ретроспленальной коре (RSA) и бочонковом поле соматосенсорной коры (BF) у контрольных животных из домашней клетки (темные столбики), а также у групп животных при обучении пищедобывательному навыку после предварительного обучения “неинструментальному питьевому” навыку (светлые столбики) и после предварительного обучения “инструментальному питьевому” навыку (серые столбики). L – левое полушарие, R – правое полушарие, ipci – ипсилатеральное полушарие по отношению к вибриссной подушке, использованной при выполнении первого питьевого навыка, cntr – контралатеральное полушарие по отношению к вибриссной подушке, использованной при выполнении первого питьевого навыка. \* –  $p < 0.05$

The number of Fos-positive neurons in  $1 \text{ мм}^2$  of the retrosplenial cortex (RSA) and of the barrel cortex (BF) in control animals from home cages (dark bars), in animals during food-acquisition learning after previous non-instrumental water-acquisition task (light bars) and after previous instrumental water-acquisition task (grey bars). L – the left hemisphere, R – the right hemisphere, ipci – ipsilateral hemisphere in relation to the vibrissal pad used during water-acquisition task, cntr – contralateral hemisphere in relation to the vibrissal pad used during water-acquisition task. \* –  $p < 0.05$ .

в  $1 \text{ мм}^2$  (критерий Вилкоксона,  $z = 2.20$ ;  $p = 0.03$ ). При этом число Fos-положительных нейронов в ретроспленальной коре достоверно не различалось между полушариями (критерий Вилкоксона,  $z = 0$ ,  $p > 0.05$ ) и в среднем составило  $74 \pm 7$  клеток в  $1 \text{ мм}^2$ .

Достоверных различий в числе Fos-положительных нейронов между правым и левым полушарием у животных группы “неинстру-

ментальное питьевое” не было обнаружено ни в ретроспленальной коре (критерий Вилкоксона,  $z = 1.83$ ,  $p > 0.05$ ), ни в бочонковом поле соматосенсорной коры (критерий Вилкоксона,  $z = 0.37$ ,  $p > 0.05$ ). У животных данной группы число Fos-положительных нейронов в ретроспленальной коре составило  $59 \pm 14$  в  $1 \text{ мм}^2$ , а число таких нейронов в бочонковом поле соматосенсорной коры —  $25 \pm 5$  в  $1 \text{ мм}^2$ . Число Fos-положительных нейронов в ретроспленальной коре у животных группы “неинструментальное питьевое” превышало число Fos-положительных нейронов у контрольных животных из домашней клетки (критерий Манна–Уитни,  $z = -2.12$ ,  $p = 0.03$ ). Для бочонкового поля соматосенсорной коры таких различий обнаружено не было (критерий Манна–Уитни,  $z = -1.76$ ,  $p = 0.07$ ). У животных данной группы число Fos-положительных нейронов в бочонковом поле не отличалось достоверно от числа Fos-положительных нейронов в бочонковом поле ипсилатерального (по отношению к вибриссной подушке, использованной при предварительном обучении питьевому навыку) полушария животных группы “инструментальное питьевое” (критерий Манна–Уитни,  $z = -1.3$ ,  $p > 0.05$ ). Однако и в левом бочонковом поле, и в правом было найдено достоверно меньше Fos-положительных нейронов, чем в бочонковом поле контралатерального (по отношению к вибриссной подушке, использованной при предварительном обучении питьевому навыку) полушария животных группы “инструментальное питьевое” (критерий Манна–Уитни,  $z = -2.35$  и в первом, и во втором случае,  $p = 0.02$ ). Достоверных различий по числу Fos-положительных нейронов в ретроспленальной коре не было обнаружено между группой “неинструментальное питьевое” и группой “инструментальное питьевое” (критерий Манна–Уитни,  $z = -0.85$ ,  $p > 0.05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе нами было показано, что при формировании пищедобывательного навыка (без использования вибрисс как условия получения пищи) происходит индукция экспрессии транскрипционного фактора *c-Fos* в нейронах бочонкового поля соматосенсорной коры в том случае, если в предварительном опыте у этих животных было обучение инструментальному питьевому навыку,

требовавшему использования вибрисс. Причем оказалось, что индукция *Fos* наиболее выражена в нейронах того полушария, которое являлось контралатеральным по отношению к вибриссной подушке, использованной при предварительном обучении питьевому навыку животными группы “инструментальное питьевое”. Использованная в исследовании контрольная группа животных с “невибриссным” навыком, уравниваемая по всем параметрам с экспериментальной группой и отличающаяся от нее только отсутствием предварительного опыта “вибриссного поведения”, показывает, что само по себе приобретение пищевого навыка не вызывает индукцию экспрессии *Fos* в нейронах бочонкового поля соматосенсорной коры.

Полученные результаты позволяют предположить, что распределение вовлекаемых в формирование пищедобывательного, второго навыка нейронов зависит от предварительно сформированного первого навыка. При изучении нейронного обеспечения уже сформированного индивидуального опыта было показано, что разная история предварительного обучения приводит к различающимся структурам индивидуального опыта, выявляемым при внешне неразличимом выполнении одного и того же навыка [3, 5]. Такие данные позволяют предполагать, что предыдущая история обучений имеет значение для текущего обучения. В пользу такого предположения, хотя и косвенно, говорят и данные о влиянии предварительной истории обучения на текущие нейрогенетические модификации в головном мозге при переучивании навыка [1, 4].

В настоящее время все большую актуальность приобретает сопоставление двух и более нейронных популяций, обеспечивающих разные поведенческие навыки или разные реализации одного и того же навыка. Так, при регистрации нейронной активности было показано, что в миндалине есть специфические нейронные группы для двух разных видов поведения [11]. Также было показано по активации экспрессии раннего гена *arc*, что при исследовании двух разных контекстов у животных активируются две разные нейронные популяции [8]. В то же время при последовательном формировании двух разных навыков у мышей было продемонстрировано, что формирование нового навыка обеспечивается реорганизацией своего набора дендритных шипиков; при этом вовлекаемые в эти два ви-

да обучения нейроны, по-видимому, являются одними и теми же [17, 18].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что при последовательном формировании второго навыка активируются нейроны первого навыка, даже если навыки относятся к разным мотивационным доменам. В этом случае можно говорить о дополнительных модификациях нейронов, уже специализированных относительно первого навыка, т.е. претерпевающих процессы аккомодационной реконсолидации при формировании второго навыка [6]. Возможно, вовлечение нейронов в новое обучение зависит от предыдущей истории его электрической активности [9] и связано с повышенной возбудимостью мембраны [14]. Закономерности вовлечения нейронов предыдущего опыта в формирование нового требуют дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-06-00363а) и Совета по грантам Президента РФ для поддержки ведущих научных школ России (грант НШ 3010.2012.6).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амельченко Е.М., Зворыкина С.В., Безряднов Д.В., Чехов С.А., Анохин К.В. Восстановление нарушенной памяти и экспрессия гена *c-fos* в мозге амнестичных животных в ответ на напоминающие воздействия. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2012. 153(5): 698–702.
2. Анохин К.В. Молекулярные сценарии консолидации долговременной памяти. Журн. высш. нерв. деят. 1997. 47(2): 261–279.
3. Горкин А.Г., Шевченко Д.Г. Отражение истории обучения в активности нейронов лимбической коры кроликов. Журн. высш. нерв. деят. 1993. 43(1): 172–175.
4. Сварник О.Е., Булава А.И., Фадеева Т.А., Александров Ю.И. Закономерности реорганизации опыта, приобретенного при одно- и многоэтапном обучении. Эксперим. психология. 2011. 4(2): 5–13.
5. Созинов А.А., Лаукка С., Аверкин Р.Г., Александров Ю.И. Условия и мозговое обеспечение интерференции при формировании системной структуры индивидуального опыта. Тенденции развития современной психологической науки. Ч. 2. Отв. ред. Журавлев А.Л., Кольцова В.А. М.: Ин-т психологии РАН, 2007: 343–346.
6. Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu.V., Shevchenko D.G., Averkina R.G., Matz V.N., Laukka S., Korpusova A.V. A subset of cingulate cortical neurons is specifically activated during alcohol-acquisition behavior. Acta Physiol. Scand. 2001. 171: 87–97.
7. Dudai Y. The restless engram: consolidations never end. Annu Rev Neurosci. 2012. 35: 227–247.
8. Guzowski J.F., McNaughton B.L., Barnes C.A., Worley P.F. Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. Nat. Neurosci. 1999. 2: 1120–1124.
9. Guzowski J.F., Miyashita T., Chawla M.K., Sander-son J., Maes L.I., Houston F.P., Lipa P., McNaughton B.L., Worley P.F., Barnes C.A. Recent behavioral history modifies coupling between cell activity and Arc gene transcription in hippocampal CA1 neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. 103(4): 1077–1082.
10. Harris J.A., Petersen R.S., Diamond M.E. Distribution of tactile learning and its neural basis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. 96: 7587–7591.
11. Herry C., Ciocchi S., Senn V., Demmou L., Müller C., Lüthi A. Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. Nature. 2008. 454(7204): 600–606.
12. Martínez M.C., Alen N., Ballarini F., Moncada D., Viola H. Memory traces compete under regimes of limited Arc protein synthesis: implications for memory interference. Neurobiol. Learn. Mem. 2012. 98: 165–173.
13. McKenzie S., Eichenbaum H. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? Neuron. 2011. 71: 224–233.
14. Silva A.J., Zhou Y., Rogerson T., Shobe J., Balaji J. Molecular and cellular approaches to memory allocation in neural circuits. Science. 2009. 326(5951): 391–395.
15. Svarnik O.E., Alexandrov Yu.I., Gavrilov V.V., Grinchenko Yu.V., Anokhin K.V. Fos expression and task-related neuronal activity in rat cerebral cortex after instrumental learning. Neuroscience. 2005. 136: 33–42.
16. Wixted J.T. On Common Ground: Jost’s (1897) law of forgetting and Ribot’s (1881) law of retrograde amnesia. Psychol. Rev. 2004. 111: 864–879.
17. Xu T., Yu X., Perlik A.J., Tobin W.F., Zweig J.A., Tennant K., Jones T., Zuo Y. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. Nature. 2009. 462: 915–919.
18. Yang G., Pan F., Gan W.B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. Nature. 2009. 462: 920–924.