

**ФИЗИОЛОГИЯ ПОВЕДЕНИЯ;  
ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ**

УДК 612.821.6

**АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ РЕТРОСПЛЕНИАЛЬНОЙ КОРЫ КРЫС  
НА РАННИХ И ПОЗДНИХ ЭТАПАХ КОНСОЛИДАЦИИ ПАМЯТИ**

© 2015 г. Е. А. Кузина, А. Г. Горкин, Ю. И. Александров

*Институт психологии РАН,*

*e-mail: ehofir@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.11.2014 г.

Принята в печать 22.12.2014 г.

Проводилась регистрация активности одиночных нейронов ретросплениальной коры при реализации инструментального пищедобывательного поведения в двух группах крыс: в первые шесть дней сразу после обучения этому поведению (1-я группа) и спустя неделю, в течение которой животные не выполняли выученный навык (2-я группа). В то время как у этих групп не было обнаружено значимых различий в процентном соотношении нейронов, специализированных относительно выученного поведения, в 1-й группе у 40% клеток этой категории наблюдались активации, появляющиеся при реализации специфического акта только в 80–90%, а не при каждой его реализации (в 100% случаев), что достоверно отличалось от доли таких клеток (4%) у животных 2-й группы. Все нейроны с не-100%-ми активациями на ранних этапах после обучения были специализированы относительно последнего в истории обучения акта: подхода и нажатия на педаль. Предполагается, что на первых этапах консолидации инструментального навыка его реализация может обеспечиваться переменным составом клеток ретросплениальной коры, специализированных относительно систем новых поведенческих актов.

*Ключевые слова: консолидация, крысы, ретросплениальная кора, обучение, инструментальное поведение, активность специализированных нейронов, вероятность активации.*

**Activity of Retrosplenial Neurons during the First Days and after  
a Week Following the Learning of the Operant Food-Acquisition Task**

**E. A. Kuzina, A. G. Gorkin, Yu. I. Alexandrov**

*Laboratory of Neural Bases of Mind, Institute of Psychology,*

*Russian Academy of Sciences, Moscow,*

*e-mail: ehofir@mail.ru*

Activity of single neurons in the retrosplenial cortex of rats during realization of the operant food-acquisition behavior was recorded. In the first group of rats the recordings were made in the first six days after learning of the task and in the second group – following a week of a rest after learning. There were no significant differences in proportion of neurons specialized in relation to the learned behavior; however in the first group 40% of these cells had specific activations only in 80–90%, but not in all (100%) realizations of their specific behavioral acts, while in the second group there were much less relative numbers (4%) of such cells. All neurons with not-100% activations on the early stages after the learning were specialized in relation to acts of approaching and pressing the pedal that rats acquired on the last session of learning. It could be supposed that during the first stages of consolidation of the operant skill some variable set of retrosplenial cortex neurons specialized to new behavioral acts can be involved.

*Keywords: Consolidation, rats, retrosplenial cortex, learning, instrumental behavior, activity of specialized neurons, probability of activation.*

DOI: 10.7868/S0044467715020082

В многочисленных исследованиях консолидации памяти было показано, что характеристики активности разных структур мозга и особенности выполнения выученного поведения зависят от периода времени между его формированием и началом воспроизведения [Dudai, 2004; Созинов и др., 2013]. При регистрации активности отдельных нервных клеток во время продолжительного обучения новому навыку была обнаружена динамика частотных и количественных показателей вовлечения клеток разных областей на разных этапах обучения и повторения [Jog et al., 2007; Smith et al., 2012; Weible et al., 2009]. В то же время в дефинитивном пищедобывательном поведении, как правило, наблюдается стабильность специфической активности нейронов и состава активирующихся клеток при повторных реализациях [Швырков, 2006; Горкин, Шевченко, 1990; Gavrilov et al., 1998; Thompson, Best, 1990; Greenberg, Wilson, 2004; и др.]. Поскольку консолидация является одним из аспектов процесса системной дифференциации индивидуального опыта [Александров и др., 2014], включающим в себя описание процесса специализации нейронов относительно новой системы и реорганизацию систем предшествующего опыта, вовлекающихся в новое поведение [Сварник и др., 2013; Александров и др., 2014], то наличие или отсутствие повторной актуализации сформированного навыка сразу после обучения может по-разному отражаться на этих процессах. Для проверки этого предположения проводили регистрацию активности отдельных нейронов ретросплениальной коры (РК) крыс в течение первых 6–7 дней после обучения или через неделю (7–15 дней после обучения), что соответствует стандартным срокам, на которых были получены данные о стабильности активации нейронов разных поведенческих специализаций [Горкин, Шевченко, 1990; Gavrilov et al., 1998].

## МЕТОДИКА

Были использованы капюшонные крысы линии Long-Evans в возрасте от 8 до 12 месяцев и массой 250–350 г. Во время обучения и эксперимента они были помещены в индивидуальные клетки и находились на частичной пищевой депривации. Потеря веса за все время исследования не превышала 10–15%.

Всех животных поэтапно обучали нажимать на педаль для получения сыра из кор-

мушки. Этапами обучения были: подход к кормушке, отход от нее, подход к педали, нажатие на педаль. Длительность каждой сессии (этапа) обучения составляла 20–30 мин в день. Подробно последовательность обучения и устройство экспериментальной клетки описаны ранее [Кузина, 2013]. Регистрация активности нейронов у первой группы животных ( $n = 5$ ) проводилась в течение первых шести дней сразу после обучения нажатием на педаль, а у животных второй группы ( $n = 7$ ) — спустя неделю, в течение которой животные не выполняли выученный навык.

Все обученные животные были прооперированы под наркозом из смеси золетила (Zoletil, Вирбак Санте Анималь, Франция, 25 мг/кг) и рометара (Rometar 2%, СПОФА, Чехия, 10 мг/кг), вводимых внутримышечно. Над ретросплениальной агранулярной корой ( $P = 4.5–5$ ;  $L = 1.1–1.2$ ) в черепе было просверлено отверстие диаметром около 2 мм, над которым была размещена и зафиксирована зубным пластиком (Paladur, HeraeusKulzer, США) платформа для съемного микроманипулятора. Для регистрации активности отдельных нейронов применялись стеклянные микроэлектроды, заполненные изотоническим раствором NaCl с сопротивлением 3–7 МΩ на частоте 1 кГц. Параллельно с записью нейронной активности проводилась видеозапись и запись поведенческих отметок. После окончания экспериментов проводилась морфологическая реконструкция места регистрации. Все опыты проводились в соответствии с директивой Евросоюза № 86/609 ЕС о гуманном обращении в экспериментальными животными.

Обработка нейронной активности и поведенческих характеристик проводилась с использованием программы DMain (Ю. Райгородский). Для подсчета отбирались только те записи, где животное осуществляло не менее 10 успешных поведенческих циклов с нажатием на педаль и побегом к кормушке. Для каждого нейрона подсчитывалась средняя частота активности за все время его регистрации. За активацию в одном или нескольких актах принималось превышение частоты активности в этих актах над средней за все время регистрации не менее чем в 1.5 раза. “Специализированными” относительно определенных систем тех или иных актов репертуара в настоящей работе назывались клетки с вероятностью активации в этих актах, равной не только 1, как это делалось нами ранее при

Классификация активности нейронов ретроспленальной коры крыс в пищедобывательном поведении на ранних и поздних этапах консолидации навыка

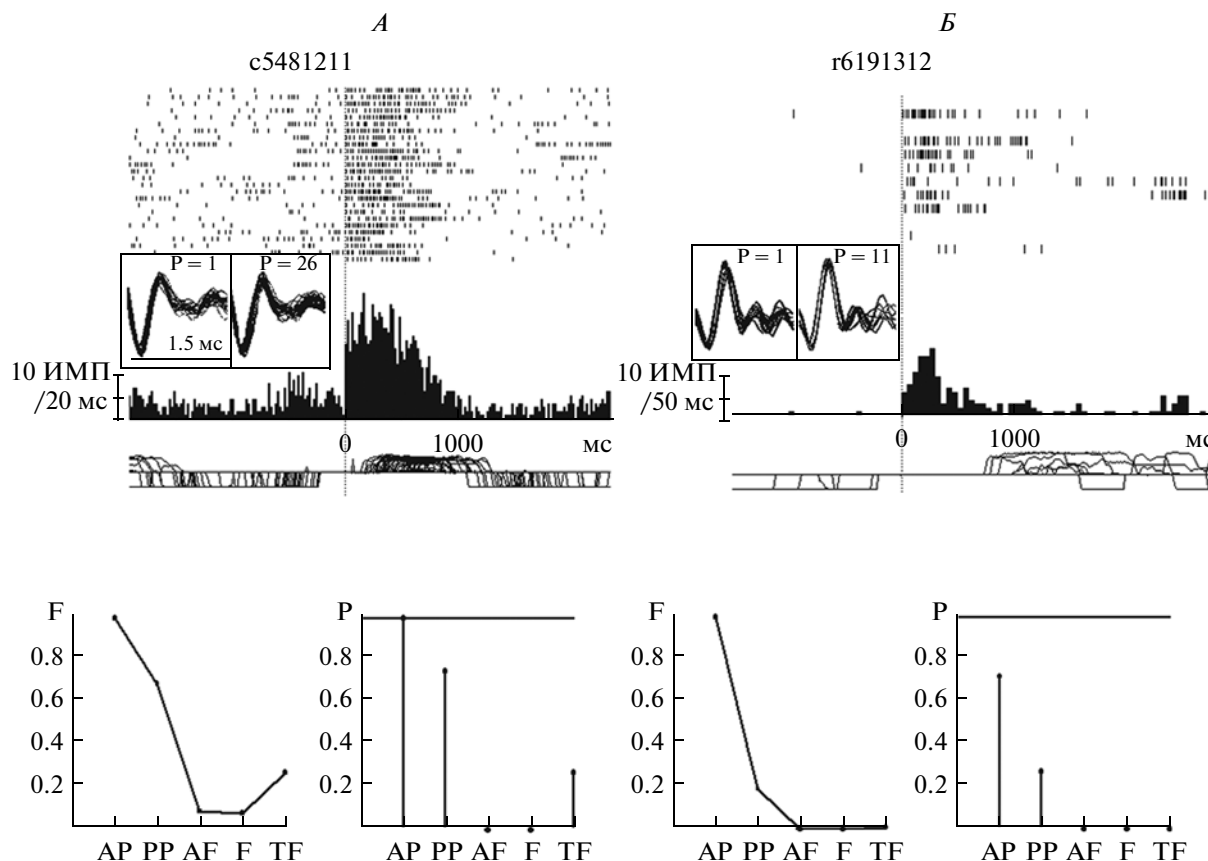
Groups of retrosplenial cortex's neurons with different behavioral specializations during early and late stages of consolidation of the food-acquisition operant skill in rats

Группа животных		1–6 дней после обучения $n = 6$			7–15 дней после обучения $n = 5$		
		педаль	кормушка	всего	педаль	кормушка	всего
Группа нейронов	специализация						
Н-нейроны							
Вероятность активации	100%	11	4	15	13	9	24
	Менее 100%	10	0	10	0	1	1
Д-нейроны			25			28	
НС			150			126	
Всего			200			179	

изучении дефинитивного поведения [Горкин, Шевченко, 1990; Gavrilov et al., 1998; Александров и др., 2014], но и 0.75–0.9, учитывая, что в настоящем исследовании регистрация проводилась на ранних этапах формирования поведения. Для сравнения особенностей распределения активности нейронов в двух группах крыс все клетки были отнесены к одной из трех категорий: 1) нейроны, специализированные относительно актов выученного в экспериментальной клетке поведения (“новые”, Н); 2) с активациями как в актах выученного поведения, так и вне его, которые выглядят как связь с определенными движениями (налево–направо, вверх–вниз и т.п.) в какое бы поведение эти движения ни были включены (“старые”, Д), и 3) клетки, не имеющие постоянных активаций в циклическом поведении (нейроны с не идентифицированной специализацией, НС) [Александров, 2012; Горкин, Шевченко, 1990; Gavrilov et al., 1998]. Для оценки статистической достоверности различий доли нейронов разных специализаций в двух группах животных использовали точный критерий Фишера (Fisher's exact). Для сравнения частотных параметров активности нейронов и поведенческих характеристик применялся непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0.05$  (односторонний критерий отклонения нулевой гипотез). Все расчеты проводились с помощью программы Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Наборы нейронов.* В таблице приведены данные классификации всех зарегистрированных нейронов ( $n = 379$ ) в двух группах животных. Для обеих групп был характерен одинаково высокий процент НС нейронов (Fisher exact,  $p = 0.18$ ), по количеству Д-нейронов они также значимо не отличались (Fisher exact,  $p = 0.23$ ). Но, при сравнении доли Н-нейронов со стабильными (100%-ми) активациями в выученном поведении, оказалось, что в первые дни после обучения таких клеток было меньше, чем через неделю после завершения обучения (Fisher exact,  $p = 0.042$ ). Для этой категории нейронов были также подсчитаны средняя частота за все время регистрации, частота в специфическом акте и отношение частоты во время активации к средней. Соотношение частот в специфическом и остальных актах поведенческого цикла была значимо больше у специализированных нейронов в первые дни после обучения (в 3.5 раза), чем на более поздних сроках (в 2.5 раза) регистрации ( $M-W(U) = 2.22, p = 0.026$ ). Ранее нами было обнаружено, что в первые дни после обучения можно выделить группу клеток, специфически активных не во всех, а только в 75–90% актах [Кузина, 2013] выученного поведения – примеры активности нейронов со 100% и не-100% вероятностями активаций приведены на рисунке. В группе “неделя после обучения” было достоверно меньше ( $n = 1$ ) новых нейронов с не-100% вероятностью активации, по сравнению с группой “первые дни после обучения” ( $n = 10$ ) (Fisher exact,  $p = 0.01$ ). Все нейроны новых специализаций с



*Вверху:* Растрсы и гистограммы активности нейронов: *А.* Нейрон, у которого активация при подходе к педали (с5481211, средняя фоновая частота – 9.35 Гц, частота в специфическом акте – 33 Гц) появлялась с вероятностью 100%. *Б.* Нейрон, у которого активация при подходе к педали появлялась только в 75% актов (r6191312, средняя фоновая частота – 1.9 Гц, частота в специфическом акте – 9.45 Гц). Усредненные перестимульные гистограммы активности нейронов. По оси абсцисс – время в мс; “0” соответствует началу подхода к педали. По оси ординат – число спайков в канале гистограммы. Над гистограммой – растрсы активности: строка – отдельная реализация, точка – спайк нейрона. В рамках в левом нижнем углу каждого растра приведены примеры формы спайков соответствующих нейронов в первых и последних реализациях (P) актов подхода к педали. Под гистограммой – актограмма поведения (суперпозиция); отклонение вверх – нажатие на педаль, вниз – опускание морды в кормушку. Ширина канала гистограммы нейрона r6191312 – 50 мс, нейрона с5481211 – 20 мс. *Внизу:* Ордината: F – нормализованная средняя частота, P – вероятность активации нейронов в актах циклического поведения. Абсцисса – обозначения актов: AP – подход к педали, PP – нажатие на педаль, AF – подход к кормушке, F – захват пищи в кормушке, TF – отход от кормушки.

*On the top:* Raster plots and peri-event cumulative histograms for two neurons: *A.* c5481211 (mean background frequency – 9.35 Hz, activity during activation – 33 Hz) with 100% probability of activation during approaching the pedal, and *B.* r6191312 (mean background frequency – 1.9 Hz, activity during activation – 9.45 Hz) with 75% probability of activation during approaching the pedal. Neurons’ spike forms in the first and last realization (P) are shown in the left bottom corner of each plot. The lowest plots indicate behavior actograms (superposition) for all cycles of the food-acquisition behavior performed by animals during the recording of spike activity from the corresponding neuron. Channel width of the histograms for neuron c5481211 is 20 ms and for neuron r6191312 – 50 ms. *On the bottom:* F – normalized mean frequency, P – probability of activation in the following behavioral acts: AP – approaching to the pedal, PP – pressing the pedal, AF – approaching to the feeder, F – lowering the head and seizing a food from the feeder, TF – turn away from the feeder.

не-100% активациями в первые дни после обучения имели повышенную частоту активности в актах подхода и нажатия на педаль ( $n = 10$ ), тогда как все клетки ( $n = 4$ ), специализированные относительно “кормушечных”

актов имели 100% активации (Fisher exact,  $p = 0.003$ ). Объединение групп Н-нейронов с разной вероятностью активации в первые дни после обучения привело к тому, что процент Н-нейронов стал одинаковым на двух

временных этапах (13 и 13.96%). Тем не менее, соотношение доли “педальных” и “кормушечных” нейронов значительно поменялось: в первые дни нейронов “педальных” актов было значительно больше, чем “кормушечных” (Fisher exact,  $p = 0.0003$ ), а через неделю – поровну (Fisher exact,  $p = 0.28$ ). Также, хотя не было обнаружено значимых различий в частоте встречаемости всех Н-нейронов в нижних и верхних слоях коры (Fisher exact,  $p = 0.233$  (1 группа);  $p = 0.5$  (2 группа)), в первые дни после обучения у клеток верхних слоев была выше средняя частота активности ( $F_{cp} = 3.8 \pm 1.9$  Гц), чем в нижних  $F_{cp} = 1.78 \pm 1$  Гц ( $M-W = 2$ ,  $p = 0.045$ ), и больше отношение специфической к фоновой частоте у нейронов нижних слоев ( $M-W = -2$ ,  $p = 0.045$ ). При анализе процента активных нейронов в треке (отношения числа встреченных нейронов за одну проходку электрода вниз к длине трека) оказалось, что число активных нейронов в проходках с числом Н-нейронов  $\geq 1$  было больше у крыс через неделю после обучения 1.5% – через неделю, 1.1% – в первые дни ( $M-W(U) = -2.22$ ,  $p = 0.026$ ).

**Поведение.** В первые дни после обучения нажатия на педаль у крыс происходило уменьшение длительности ( $t$ ) и вариативности ( $v$ ) выполнения поведенческого цикла по мере ежедневного повторения навыка (у разных животных от 5 до 10 дней), в отличие от группы “неделя после обучения” (сравнение средней длительности и стандартного отклонения времени цикла в первой половине регистрации (1–5 дни) и во второй (6–10 дни): группа “первые дни”  $M-W(t, v) = 2.61$ ,  $p = 0.009$ ; группа “неделя”  $M-W(t) = 0.57$ ,  $p = 0.56$ ;  $M-W(v) = 0.28$ ,  $p = 0.77$ ). В группе крыс через неделю после первоначального обучения, наоборот, происходило увеличение длительности и вариативности реализации к третьему дню повторения (наименьшие значения критерия при попарных сравнениях:  $M-W(t) = -3.28$ ,  $p = 0.0011$ ;  $M-W(v) = -2.37$ ,  $p = 0.017$ ), а к седьмому ( $M-W(t) = 3.93$ ,  $p < 0.0001$ ;  $M-W(v) = 2.08$ ,  $p = 0.036$ ) – уменьшение.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнении процентного соотношения нейронов РК разной поведенческой специализации у животных в первые дни и через неделю после формирования циклического пищедобывательного навыка нажатия на педаль

оказалось, что в первые дни после обучения достоверно больше клеток (40% – первые дни и 4% – неделя), специализированных относительно подхода и нажатия на педаль, имели нестабильные (не-100%-ые) активации в специфических актах. Поскольку через неделю и в первые дни после обучения *между* сравнимыми выборками нейронов не было выявлено достоверных различий по частотным характеристикам и распределению в нижних и верхних слоях коры, поэтому нестабильность специфических активаций части этих клеток в дефинитивном поведении может отражать как процессы реорганизации систем предшествующего по времени обучения [Сварник и др., 2014] и по последовательности в поведенческом континууме акта (подхода к педали) [Александров и др., 2014], так и особенности формирования новой системы [например, Smith et al., 2012; Weible et al., 2012], в том числе процессов формирования межсистемных связей между ней и другими элементами опыта, т.е. процессов “вписывания” данной системы в целостную структуру опыта, ведущих к дальнейшей дифференциации структуры. У животных, которые после обучения в течение недели находились в домашней клетке, в первые дни тестирования время и вариативность выполнения циклического поведения не отличались от группы животных сразу после обучения; в то время как у крыс первой группы наблюдалось плавное снижение времени и вариативности цикла по мере ежедневного повторения, во второй группе, наоборот, длительность увеличивалась. Наряду с достоверным увеличением доли активных нейронов в треке, по сравнению с выборкой на ранних этапах после обучения, обнаруженные различия показывают, что при актуализации опыта, по крайней мере, через неделю после его формирования процессы аккомодационной реконсолидации [Александров, 2012] могут протекать не в меньшем объеме, чем в первые дни после обучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не было обнаружено достоверных различий в паттернах специализации нейронов ретроспленальной коры на ранних и поздних этапах консолидации инструментального навыка. Однако характеристики активности внутри группы нейронов, специализированных относительно выученного поведения, различаются. На ранних этапах после обуче-

ния 40% нейронов, специализированных относительно систем выученных актов, вовлекались в новое поведение не в 100% реализаций поведения. Все эти клетки имели повышенную частоту активности в актах подхода и нажатия на педаль, которым животные обучались непосредственно перед экспериментом. На поздних этапах доля таких клеток достоверно уменьшалась (до 4%). Предполагается, что эти факты, а также достоверные различия в скорости выученного поведения и доле активных нейронов в треке на сравниваемых этапах могут свидетельствовать о том, что системная дифференциация, сопровождающая консолидационные модификации нейронального обеспечения поведения, в ретроспленальной области коры может протекать по-разному, в зависимости от периода времени между обучением и началом реализации выученного поведения.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грантРНФ № 14-28-00229).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров Ю.И.* Психофизиологические закономерности научения и методы обучения. Психологический журн. 2012. 33(6): 5–19.
- Александров Ю.И., Горкин А.Г., Созинов А.А., Сварник О.Е., Кузина Е.А., Гаврилов В.В.* Нейронное обеспечение научения и памяти. Когнитивные исследования: сб. науч. тр. Вып. 6. / Под ред. Величковского Б.М., Рубцова В.В., Ушакова Д.В. М.: Изд. ГБОУ ВПО МГППУ, 2014. С. 130–169.
- Горкин А.Г., Шевченко Д.Г.* Стабильность поведенческой специализации нейронов. Журн. высш. нерв. деят. 1990. 40(2): 291–300.
- Кузина Е.А.* Особенности паттернов специализации задней цингулярной коры на трех последовательных стадиях консолидации инструментального пищедобывательного поведения. Эволюционная и сравнительная психология в России: традиции и перспективы. М.: Изд-во “Институт психологии РАН”, 2013. С. 113–121.
- Сварник О.Е.* Опыт первого, “вибрисного”, навыка влияет на индукцию экспрессии c-fos в нейронах бочонкового поля соматосенсорной коры крыс при обучении второму, “невибрисному”, навыку. Журн. высш. нерв. деят. 2014. 64(1): 77–83.
- Созинов А.А., Крылов А.К., Александров Ю.И.* Эффект интерференции в изучении психологических структур. Экспериментальная психология. 2013. 6(1): 5–48.
- Швырков В.Б.* Введение в объективную психологию: Нейрональные основы психики [1995]. Избранные труды. М.: Изд. “Институт психологии РАН”, 2006. С. 427–582.
- Dudai Y.* The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? Annu. Rev. Psych. 2004. 55: 51–86.
- Gavrilov V.V., Grinchenko Yu.V., Alexandrov Yu.I.* Behaviorally specialized limbic cortex neurons in rats and rabbits: comparative study. International J. Psychophysiology. 1998. 30: 130.
- Greenberg P.A., Wilson F.A.* Functional stability of dorso-lateral prefrontal neurons. J. Neurophysiol. 2004. 92(2): 1042–55.
- Jog M.S., Aur D., Connolly C.I.* Is there a tipping point in neuronal ensembles during learning? Neurosci. Lett. 2007. 412(1): 39–44.
- Smith D.M., Barredo J., Mizumori S.J.Y.* Complementary roles of the hippocampus and retrosplenial cortex in behavioral context discrimination. Hippocampus. 2012. 22(5): 1121–1133.
- Thompson L.T., Best P.J.* Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats. Brain Res. 1990. 509(2): 299–308.
- Weible A.P., Rowland D.C., Pang R., Kentros C.* Neural correlates of novel object and novel location recognition behavior in the mouse anterior cingulate cortex. J. Neurophysiol. 2009. 102(4): 2055–68.