

УДК 612.822

ОДНОКРАТНОЕ ОБУЧЕНИЕ УСЛОВНО-РЕФЛЕКТОРНОМУ ЗАМИРАНИЮ НА ЗАПАХ У МЫШЕЙ: НОВАЯ ПОВЕДЕНЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ И ИЗВЛЕЧЕНИЯ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ПАМЯТИ

© 2019 г. А. В. Кедров^{1,*}, К. В. Анохин^{1,2,3,**}

¹ Лаборатория нейробиологии памяти, НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, Москва, Россия

² Лаборатория нейронаук, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³ Институт перспективных исследований мозга, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* e-mail: dr.kedrov@mail.ru

** e-mail: k.anokhin@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.2018 г.

После доработки 11.01.2019 г.

Принята к публикации 11.02.2019 г.

Обонятельная память представляет собой одну из древнейших когнитивных систем в мозге млекопитающих, имеющую свои собственные нервные структуры и механизмы. Большинство поведенческих моделей обонятельной памяти на лабораторных животных включают несколько сессий обучения, что значительно затрудняет выявление и исследование нейрональных сетей мозга, вовлеченных в приобретение такой памяти и нарушающихся при ее патологии. Нами была разработана модель выработки у мышей условно-рефлекторного замирания на запах амилацетата, время обучения в которой составляет 40–80 с, а ассоциативная память является долговременной и сохраняется на протяжении как минимум двух недель. Предложенная модель позволяет точно идентифицировать момент формирования обонятельной памяти с целью последующего исследования нейрональных сетей, вовлеченных в этот процесс в норме и при патологии.

Ключевые слова: обоняние, обучение, память, условно-рефлекторное замирание, мыши

DOI: 10.1134/S0044467719040063

Обоняние является одной из наиболее древних сенсорных систем млекопитающих [Eisthen, 1997], а обонятельная память — одной из наиболее ярких и глубоких, опирающейся на собственные нервные структуры и механизмы [Tong et al., 2014]. Эти механизмы одними из первых нарушаются при развитии нейродегенеративных заболеваний [Doty, 2017], что обуславливает актуальность их изучения в экспериментальных моделях обонятельного обучения и памяти у животных. По современным представлениям, клеточным субстратом памяти являются распределенные популяции нейронов мозга, составляющих так называемую энграмму, или след памяти [Tonegawa et al., 2015]. Изучение механизмов формирования и эволюции энграммы требует возможности выявления нейронов активных

как в ситуации обучения, так и в момент извлечения памяти. Этим условиям удовлетворяет модель условно-рефлекторного замирания (УРЗ) у грызунов, основанная на быстрой и однократном запоминании животным ассоциации между исходно нейтральным (условным) стимулом или обстановкой и аверсивным воздействием (безусловным стимулом) [Maren, 2001]. Модели однократного обучения УРЗ широко используются для идентификации нейронов, входящих в соответствующую энграмму, и дальнейших с ними манипуляций, включая оптогенетическое ингибирование или активацию [Liu et al., 2012; Tayler et al., 2013; Denny et al., 2014]. Однако существующие протоколы обучения УРЗ на запах, которые могли бы стать основой сходных исследований обонятельной эн-

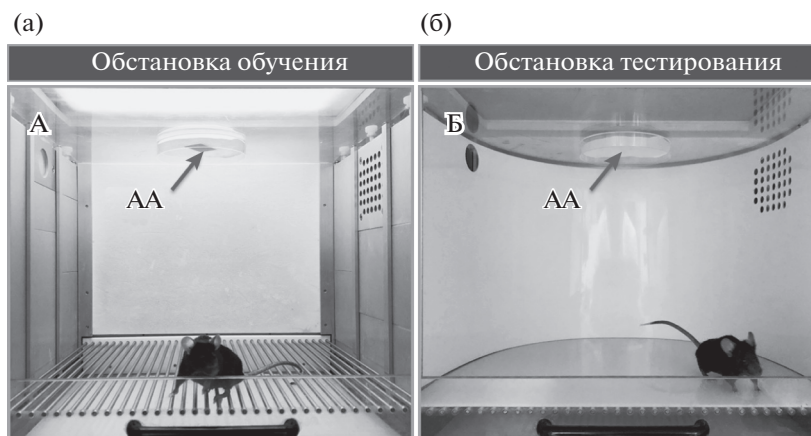


Рис. 1. Экспериментальные обстановки. (а) Обстановка обучения (обстановка А): электродный пол, включенное внутреннее освещение. (б) Обстановка тестирования (обстановка Б): наличие изогнутой пластиковой стенки, электродный пол закрыт пластиковой пластиной, выключенное внутреннее освещение. АА – источник запаха амилацетата.

Fig. 1. Experimental contexts. (a) training context (context A): the electrode floor, internal lighting is switched on. (б) testing context (context Б): smooth plastic wall, the electrode floor is covered with the plastic panel, internal lighting is switched off. AA – odor source (Amyl Acetate).

граммы, требуют многократного повторения процедуры обучения [Jones et al., 2005, Valley et al., 2009; Pavese et al., 2011; Kass et al., 2013; Gore et al., 2015]. Целью настоящей работы являлись разработка и апробация поведенческой модели однократного обучения УРЗ на запаховый условный сигнал, обонятельная память в которой была бы долговременной и сохранялась бы как минимум в течение двух недель.

МЕТОДИКА

Исследования выполнены на мышах-самцах с генетическим бэкграундом С57В1/6, в возрасте 3 мес. Животных содержали в стандартных условиях вивария по 4–5 в клетке со свободным доступом к пище и воде, в условиях стандартного 12-часового цикла смены освещенности. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), а также “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН, протокол № 1 от 3.09.2005 г.).

За 3 дня до обучения мышей подвергали процедуре хэндлинга в течение 3 мин 2 дня. В первый день после хэндлинга мыши были ознакомлены с обстановкой обучения (обстановка А) в течение 10 мин, на второй день – с обстановкой теста (обстановка Б) в течение

такого же времени (рис. 1). Обстановка А представляла собой стандартную камеру обучения мышей УРЗ (Med Associates Inc, USA) с электродным полом, внутреннее освещение в камере было включено (рис. 1 (а)). Обстановка Б отличалась от обстановки А по следующим параметрам: была помещена изогнутая белая пластиковая задняя стенка, электродный пол накрыт белой пластиковой панелью, внутреннее освещение выключено (рис. 1 (б)). Обстановки обучения и тестирования выбраны отличными друг от друга, для того чтобы исключить извлечение сформированной обстановочной памяти во время тестирования мышей. Запах амилацетата отсутствовал во время сессий ознакомления животных с обстановками. Процедуры хэндлинга и ознакомления проводили для снижения у животных страха, вызванного экспериментальными манипуляциями, не являющимися непосредственно обучением/тестом. За день до обучения с мышами отсутствовали все экспериментальные манипуляции.

Мы использовали различное число нанесений электрокожных раздражений (ЭКР), от 1 до 3, с одинаковыми параметрами стимуляции: 0.75 мА, 2 с. Во время обучения животное помещали в обстановку А, спустя 18 с наносили первое ЭКР, интервал между ЭКР всегда составлял 20 с, после последнего ЭКР животное оставляли в экспериментальной камере на 20 с. В качестве обонятельного сти-

мула был выбран амилацетат — одорант, широко используемый в поведенческих моделях на грызунах [Paschall, Davis 2002; Jones et al., 2005; Valley et al., 2009; Pavese et al., 2011]. Запах амилацетата присутствовал все время нахождения животного в экспериментальной камере. Источник запаха (чашка Петри 100 мм диаметром с закрепленной в ней фильтровальной бумаге такого же размера; рис. 1, АА) располагался на потолке экспериментальной камеры в недосягаемости для мышей и содержал 250 мкл амилацетата (99+ %, Vekton). Источник запаха целиком обновляли через каждое второе животное. Экспериментальную камеру очищали с использованием 70% этанола перед помещением каждой мыши. Долговременную ассоциативную обонятельную память на запах амилацетата тестировали в обстановке Б спустя 3 или 14 дней после обучения, регистрируя время замирания животного. Оба теста имели продолжительность по 180 с (рис. 2). Нанесение ЭКР и видеорегистрацию поведения осуществляли с помощью программного пакета VideoFreeze (Med Associates Inc.).

Статистический анализ данных проводили с помощью теста Манна–Уитни в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего, различия считали достоверными при $p < 0.0005$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования использовали три модификации модели однократной выработки обонятельного УРЗ, различающиеся длительностью пребывания животного в обстановке обучения в присутствии запаха амилацетата и числом наносимых ЭКР. Группы ОО (Обонятельное Обучение) I, ОО II и ОО III с однократным нанесением ЭКР в сеансе продолжительностью 40 с, с двукратным за 60 с и с трехкратным за 80 с соответственно. Активными контролями выступали группы НС (Неспецифический Страх) I, НС II и НС III (к группам ОО I, ОО II и ОО III соответственно). Во всех группах, за исключением ОО III, где $n = 7$, было по 8 мышей. Животных из групп “Неспецифический страх” обучали точно таким же образом, как и животных из соответствующих групп “Обонятельное обучение”, но тестировали в отсутствие запаха амилацетата в измененной обстановке (обстановке Б). Уровень замирания этих кон-

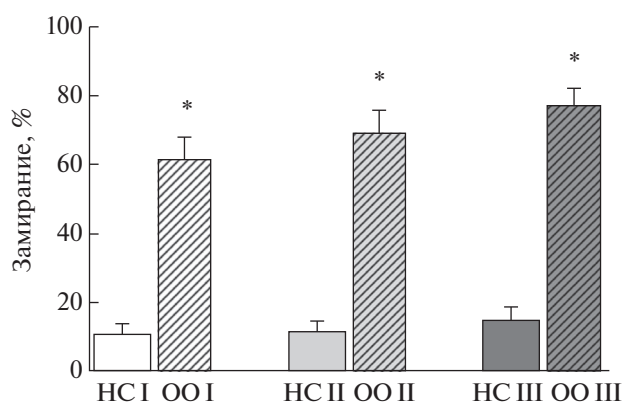


Рис. 2. Время замирания в тестах на третий день после обучения. Все экспериментальные группы были обучены в обстановке А (запах амилацетата, нанесение ЭКР). Группы ОО (Обонятельное обучение) тестировали в обстановке Б в присутствии запаха амилацетата, группы НС (Неспецифический страх) тестировали в обстановке Б в отсутствие запаха амилацетата. Во всех группах было по 8 мышей, за исключением ОО III, где $n = 7$, * — статистически значимое различие между соответствующими группами ОО и НС, $p < 0.0005$, *U*-тест Манна–Уитни. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Fig. 2. Freezing time on the third day after training. All experimental groups were trained in the similar conditions (context A, amyl acetate odor, footshocks). ОО (Olfactory Learning) groups were tested in the context B in the presence of amyl acetate odor, НС (Unspecific Fear) groups were tested in the context B without amyl acetate odor. In each group, there were 8 mice, except for the group ОО III where $n = 7$. * — significant differences between ОО groups and appropriate НС groups, $p < 0.0005$, Mann–Whitney U test. Data are shown as mean \pm SEM.

трольных животных в тесте демонстрирует сформировавшуюся ассоциацию, неспецифическую по отношению как к условному стимулу (запаху амилацетата), так и к обстановке обучения (обстановке А) (рис 2). По результатам теста на третий день после обучения все группы ОО статистически значимо отличались по уровням замирания от соответствующих контрольных групп (рис. 2, ОО I vs. НС I: 62.6 ± 6.47 vs. 10.75 ± 3.18 ; ОО II vs. НС II: 70.19 ± 6.98 vs. 11.64 ± 2.87 ; ОО III vs. НС III: 78.02 ± 5.22 vs. 14.73 ± 3.85).

Далее отдельные группы ОО II и НС II, обученные по протоколу с нанесением двух ЭКР, были протестированы спустя 3 и 14 дней после обучения. Также были введены дополнительные группы АА (Амилацетат), где жи-

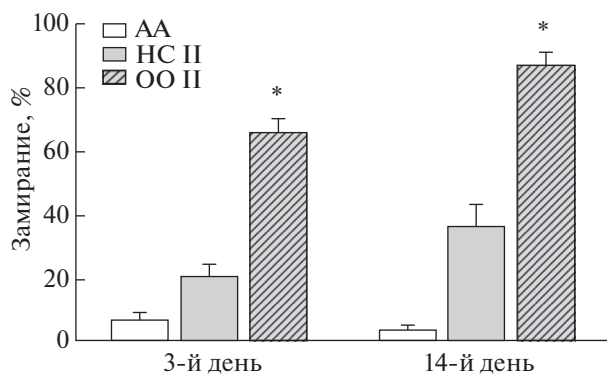


Рис. 3. Время замирания в тесте на 3-й и 14-й дни после обучения. Все экспериментальные группы, за исключением групп **АА** (Амилацетат), которым не наносили ЭКР в присутствии запаха, были обучены в одинаковых условиях (обстановка А, запах амилацетата, нанесение 2-х ЭКР 0,75 мА 2 с). Группы **ОО II** (Обонятельное обучение) тестировали в обстановке Б в присутствии запаха амилацетата, группы **НС II** (Неспецифический страх) тестировали в обстановке Б в отсутствие запаха амилацетата. В каждой группе было по 8 мышей, за исключением группы **ОО II** в тесте на 3-й день, где $n = 9$. * – статистически значимое различие групп **ОО II** от соответствующих групп **НС II**, $p < 0.0005$, U-тест Манна–Уитни. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Fig. 3. Freezing time on the third and fourteenth days after training. All experimental groups, excluding **AA** (Amyl Acetate) groups, were trained in the similar conditions (context A, amyl acetate odor, two foot-shock 0.75 mA, 2 sec). **ОО II** (Olfactory Learning) groups were tested in the context Б in the presence of amyl acetate odor, **НС II** (Unspecific Fear) groups were tested in the context Б without amyl acetate odor. In each group, there were 8 mice, except for the group **ОО II** in the test on the 3rd day where $n = 9$. * – significant differences between **ОО II** groups and appropriate **НС II** groups, $p < 0.0005$, Mann–Whitney U test. Data are shown as mean \pm SEM.

вотные в обстановке обучения не получали ЭКР, для оценки общего уровня страха, который могли вызвать у животного какие-либо экспериментальные манипуляции за исключением нанесения ЭКР (рис. 3).

По результатам теста на третий день после обучения группа **ОО II** статистически значимо отличалась по уровню замирания от группы **НС II** (рис. 3, **ОО II** vs. **НС II**: 66.74 ± 4.31 vs. 20.03 ± 3.92). На 14-й день после обучения замирание в тесте у группы **ОО II** было также статистически значимо выше по сравнению с соответствующей группой **НС II** (рис. 3, **ОО II**

vs. **НС II**: 87.74 ± 3.85 vs. 36.09 ± 6.78). Повторное предъявление амилацетата, не сочетанного с нанесением электрокожного раздражения при первом предъявлении, не вызывало у мышей реакцию страха как на третий (рис. 3, **АА**: 6.43 ± 2.52), так и на 14-й день (рис. 3, **АА**: 3.49 ± 1.2) день после обучения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкий арсенал современных методов клеточной нейробиологии [Рощина и др., 2017; Саидов, Анохин, 2017] позволяет с высокой точностью идентифицировать популяции нейронов, активные в определенный момент времени. Однако большинство моделей обонятельного обучения требуют многократного повторения процедуры обучения [Jones et al., 2005; Valley et al., 2009; Pavesi et al., 2011; Kass et al., 2013; Gore et al., 2015], что существенно затрудняет идентификацию популяций нейронов, активных на самых ранних этапах формирования обонятельной энграммы. Разработанная нами модель однократного обучения условной реакции замирания на запаховый сигнал позволяет преодолеть этот недостаток, т.к. время обучения животного в ней составляет 40–80 с. Это дает возможность точно локализовать во времени и исследовать клеточные процессы не только при извлечении, но и при формировании обонятельной памяти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами была разработана и апробирована модель однократного обучения условной реакции замирания на запаховый сигнал, время обучения в которой составляет 40–80 с, а сформированная память является долговременной и сохраняется на протяжении как минимум 2 нед. Таким образом, предложенная поведенческая модель служит удобным инструментом для изучения клеточных механизмов формирования и динамики энграммы, включая самые ранние этапы, происходящие непосредственно в момент обучения животного.

Работа выполнена в рамках тематического плана государственного задания ФГБУ НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Рощина М.А., Ивашкина О.И., Анохин К.В. Новые подходы в когнитивной нейробиологии: ме-

- тоды двухфотонной *in vivo* визуализации когнитивно активных нейронов. Журн. высш. нерв. деят. 2017. 62 (2): 141–149.
- Саидов Х.М., Анохин К.В. Новые подходы в когнитивной нейробиологии: методы молекулярного маркирования и *ex vivo* визуализации когнитивно активных нейронов. Журн. высш. нерв. деят. 2017. 67 (3): 259–272.
- Denny C.A., Kheirbek M.A., Alba E.L., Tanaka K.F., Brachman R.A., Laughman K.B., Tomm N.K., Turi G.F., Losonczy A., Hen R. Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron*. 2014. 83 (1):189–201.
- Doty R.L. Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: is there a common pathological substrate? *Lancet Neurol*. 2017. 16 (6): 478–488.
- Eisthen H.L. Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain Behav Evol*. 1997. 50 (4): 222–233.
- Gore F., Schwartz E.C., Brangers B.C., Aladi S., Stujenske J.M., Likhtik E., Russo M.J., Gordon J.A., Salzman C.D., Axel R. Neural Representations of Unconditioned Stimuli in Basolateral Amygdala Mediate Innate and Learned Responses. *Cell*. 2015. 162 (1): 134–145.
- Jones S.V., Heldt S.A., Davis M., Ressler K.J. Olfactory-mediated fear conditioning in mice: simultaneous measurements of fear-potentiated startle and freezing. *Behav Neurosci*. 2005. 119 (1): 329–335.
- Kass M.D., Rosenthal M.C., Pottackal J., McGann J.P. Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. *Science*. 2013. 342 (6164): 1389–92.
- Liu X., Ramirez S., Pang P.T., Puryear C.B., Govindarajan A., Deisseroth K., Tonegawa S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*. 2012. 484 (7394): 381–5.
- Maren S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci*. 2001. 24: 897–931.
- Paschall G.Y., Davis M. Second-Order Olfactory-Mediated Fear-Potentiated Startle. *Learn Mem*. 2002. 9 (6): 395–401.
- Pavesi E., Canteras N.S., Carobrez A.P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. *Neuropsychopharmacology*. 2011. 36 (5): 926–39.
- Taylor K.K., Tanaka K.Z., Reijmers L.G., Wiltgen B.J. Reactivation of neural ensembles during the retrieval of recent and remote memory. *Curr Biol*. 2013. 23 (2): 99–106.
- Tonegawa S., Liu X., Ramirez S., Redondo R. Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*. 2015. 87 (5): 918–31.
- Tong M.T., Peace S.T., Cleland T.A. Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. *Front Behav Neurosci*. 2014. 8: 238.
- Valley M.T., Mullen T.R., Schultz L.C., Sagdullaev B.T., Firestein S. Ablation of mouse adult neurogenesis alters olfactory bulb structure and olfactory fear conditioning. *Front Neurosci*. 2009. 3: 51.

SINGLE-TRIAL ODOR FEAR CONDITIONING: A NEW BEHAVIORAL MODEL FOR STUDYING CELLULAR MECHANISMS OF OLFACTORY MEMORY FORMATION AND RETRIEVAL

A. V. Kedrov^{a,#} and K. V. Anokhin^{a,b,c,##}

^a Laboratory for Neurobiology of Memory, P.K. Anokhin Research Institute of Normal Physiology, Moscow, Russia

^b Laboratory of Neuroscience, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

^c Institute for Advanced Brain Studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: dr.kedrov@mail.ru

e-mail: k.anokhin@gmail.com

Olfactory memory is among the oldest mammalian cognitive systems, based on its own neural structures and mechanisms. A majority of behavioral models for olfactory memory in laboratory rodents require several training sessions, which makes difficult to identify and study neuronal populations active at the acquisition of such memory and disrupted by its pathology. We have developed the olfactory fear conditioning model in mice, training time in which is 40–80 seconds, and the associative memory is maintained for least two weeks. This model allows to identify the moment of olfactory memory acquisition for the subsequent study of neuronal circuits involved in this process in both normal states and pathology.

Keywords: olfaction, learning, memory, fear conditioning, mice