

На правах рукописи



Лебедев Илья Владимирович

**ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ КАУДАЛЬНОЙ ЧАСТИ ГИПОКАМПА У
МЫШЕЙ И ПОЛЕВОК**

03.03.01. – Физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории физиологии и генетики поведения кафедры Высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент
Плескачева Марина Григорьевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
кафедры физиологии человека и животных
биологического факультета МГУ
им. М.В.Ломоносова.
Дубынин Вячеслав Альбертович

доктор биологических наук, профессор
института высшей нервной деятельности
РАН
Раевский Владимир Вячеславович

Ведущая организация:

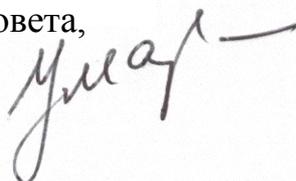
Отдел исследований мозга ФГБУ
"Научного центра неврологии" Российской
академии медицинских наук

Защита диссертации состоится 24 декабря 2012 года в 15:30
на заседании диссертационного ученого совета Д 501.001.93 при
биологическом факультете МГУ им. М.В.Ломоносова.
Адрес: Москва, Воробьевы горы, д.1, стр. 12.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке МГУ
им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан 23 ноября 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Умарова Б.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Гиппокамп — часть переднего мозга, давно привлекающая внимание исследователей в связи с важной ролью, которую она играет в контроле различных форм поведения. Неоспорима роль гиппокампа в механизмах памяти (в частности, пространственной памяти) и контроле пространственного обучения (Scoville, Milner, 1957; Виноградова, 1975; Olton *et al.*, 1978; O'Keefe, Nadel, 1978; Morris *et al.*, 1982, Morris, 2007, Bast *et al.*, 2007, Moser *et al.*, 2008). Кроме того, гиппокамп, являясь частью лимбической системы, участвует в регуляции эмоций, мотиваций и тревожного поведения (Bannerman *et al.*, 2004, Morris, 2007, Royer *et al.*, 2010 и др.). Исследования гиппокампа имеют большое прикладное значение, так как нарушением функционирования этой структуры сопровождаются такие заболевания человека как височная эпилепсия, болезнь Альцгеймера, шизофрения, (Walker, Chan, Thom, 2007).

Несмотря на длительный период изучения, особенности функционирования гиппокампа постоянно уточняются, и их трактовка часто является предметом дискуссии. Особенно это касается специфических особенностей ее полей и субрегионов. В настоящее время имеются многочисленные доказательства функциональной гетерогенности гиппокампа вдоль его оси, от септального до темпорального полюса, как у человека (Strange *et al.*, 1999), так и у животных (Moser, Moser, 1998; Bannerman *et al.*, 2004, Купцов и др., 2005; Bast *et al.*, 2007, Morris, 2007, Fanselow, Dong, 2010, Battaglia *et al.*, 2011, Foster, 2012; Купцов, Плескачева, Анохин, 2012).

У грызунов область, прилегающая к септуму, расположена дорзально, в ростральной части гиппокампа. Каудальная его часть, заканчивающаяся темпоральным полюсом, находится вентральнее, в более глубоких слоях переднего мозга. Эта область в большей степени, чем ростральная, связана проекциями с префронтальной корой (Hок *et al.*, 2007), амигдаллярным комплексом ядер (Pikkarainen *et al.*, 1999), прилежащим ядром переднего мозга (Gasbarri *et al.* 1993). В то же время, каудальная часть гиппокампа получает меньше зрительной сенсорной информации, чем ростральная (Bast *et al.*, 2007). Выявлены различия нейрогенеза во взрослом мозге в зубчатой фасции этих субрегионов (Snyder *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2012).

Функции каудальной части гиппокампа, по сравнению с ростральной, исследованы меньше. Активное их изучение началось лишь с середины 90-х годов прошлого века. В настоящее время имеющиеся трактовки функций каудальной части гиппокампа немногочисленны и часто противоречивы. Так, ряд исследователей (Moser *et al.*, 1993; Moser *et al.*, 1995; Kjelstrup *et al.*, 2002; Czerniawski *et al.*, 2009; McHugh *et al.*, 2011; см. также обзоры Bannerman *et al.*, 2004 и Fanselow, Dong, 2010) полагают, что каудальный гиппокамп практически не вовлекается в процессы, контролируемые пространственное обучение. Эта точка зрения опирается на эксперименты, в которых удаление каудальной части гиппокампа не повлияло на обучение лабораторных крыс в водном тесте Морриса и радиальном лабиринте.

В то же время, другие исследователи (de Hoz *et al.*, 2003; Ferbinteanu *et al.*, 2003; Bast, 2009; Loureiro *et al.*, 2012) приводят данные, свидетельствующие об участии каудальной части гиппокампа в контроле пространственного обучения: удаление этой области ухудшает обучение в некоторых версиях водного теста Морриса. Активацию каудальной части гиппокампа наблюдали у крыс при обучении в восьмирукавном лабиринте (Vann *et al.*, 2000).

Гораздо чаще исследователи отмечают роль каудальной части гиппокампа в контроле процессов, связанных с тревожным поведением (обзор Bannerman *et al.*, 2004; Adhikari *et al.*, 2010) у крыс и у мышей. Встречаются так же сходные трактовки, согласно которым эта часть гиппокампа является "регулятором" тревожности (Fanselow, Dong, 2010), стресса (Tanaka *et al.*, 2012), эмоций и аффективных состояний (Kenney *et al.*, 2012).

Проведенные в нашей лаборатории эксперименты (Купцов и др., 2005; Купцов, 2006; Купцов *и др.*, 2012) с использованием метода картирования активации гиппокампа по экспрессии *c-Fos* позволяют предположить участие каудального гиппокампа не только в процессах пространственного обучения, но и в базовых механизмах контроля исследовательской активности и передвижения животных в пространстве. Эта область очень активно функционирует в случае передвижения мышей и полевок даже по знакомой арене «открытого поля». Контрольные выпуски, в которых подвижность животных ограничивали, а все остальные компоненты эксперимента сохраняли, не вызывали высокой экспрессии *c-Fos*.

Вовлечение каудальной части гиппокампа в контроль пространственного поведения при передвижении животных в аренах подтверждается еще и тем, что характерные для рострального гиппокампа клетки места (нейроны, активизирующиеся в момент нахождения животного в определенном месте пространства) были обнаружены и в каудальной его части (Jung *et al.*, 1994; Poucet *et al.*, 1994; Maurer *et al.*, 2005; Kjelstrup *et al.*, 2008). Поля разрядов клеток в этой области больше, чем в ростральной части. Это привело к предположению о том, что каудальная часть гиппокампа важна для кодирования пространства с «низким разрешением», которое необходимо, в частности, и для кодирования больших пространств (Kjelstrup *et al.*, 2008).

На наш взгляд, имеющиеся данные не позволяют исключить участие каудальной части гиппокампа в контроле пространственного поведения животных. Однако возможно, что ростральная и каудальная часть гиппокампа контролируют разные его аспекты.

Большинство работ, в которых исследовали функциональные особенности каудального гиппокампа были выполнены на лабораторных крысах. Чтобы уточнить трактовки, основанные только на оценке поведения крыс, необходимо изучение функций данной области на других грызунах.

Задача данного исследования состояла в оценке функций каудальной части гиппокампа у других видов с помощью батареи тестов, включающих в том числе тесты, оценивающие успешность пространственного обучения и характеристики освоения нового пространства.

Эксперименты проводили на животных, которых крайне редко используют при оценке функций каудальной части гиппокампа: на лабораторных мышях линии C57BL/6 и европейских рыжих полевках *Clethrionomys (Myodes) glareolus*. Полевки демонстрируют признаки высокой тревожности в ситуациях повышенной опасности (Плескачева и др., 2007), а также успешно обучаются в тесте Морриса (Pleskacheva *et al.*, 2000) и в других пространственных задачах (Купцов и др., 2006). В то же время мыши линии C57BL/6 очень подвижны, имеют низкие показатели тревожности (Crusio *et al.*, 1989), высокий уровень исследовательской активности (Crusio *et al.*, 1989) и более слабые, чем полевки, характеристики пространственного обучения. Использование таких разных по поведению животных позволит дополнить данные, полученные на крысах и оценить, связаны ли выявленные эффекты с видоспецифическими особенностями животных или имеют более общий характер.

Выявление в батарее тестов изменений поведения животных после избирательного удаления каудальной части гиппокампа дополнили оценкой функционирования интактного гиппокампа при освоении новых арен разного размера путем оценки уровня экспрессии *c-Fos*, что позволит изучить особенности активации полей CA1 и CA3 гиппокампа и зубчатой фасции в ростральной и каудальной его части.

Цель и задачи работы.

Цель. Экспериментальное изучение функций каудальной части гиппокампа у мышей и полевок.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. У мышей и у полевок провести сравнение эффектов удаления каудальной части гиппокампа в экспериментальных установках, имеющих разные размеры и другие

структурные характеристики. Оценить изменения показателей исследовательской активности и тревожности.

2. Исследовать влияние размера пространства на поведение животных в норме и при удалении гиппокампа.

3. Методом картирования экспрессии гена c-Fos оценить активацию полей CA1, CA3 и зубчатой фасции каудального и рострального гиппокампа после однократного или двукратного тестирования в аренах разного размера.

4. Оценить влияние удаления каудальной части гиппокампа на пространственное обучение.

5. Сравнить влияние эффектов удаления каудальной части гиппокампа на исследование нового пространства у мышей и у полевок.

Основные результаты и их научная новизна

Использованный нами комплекс методик позволил детально проанализировать разные аспекты поведения грызунов и оценить вовлеченность каудальной части гиппокампа в контроль разных компонентов их активности.

В отличие от результатов, полученных на лабораторных крысах, удаление каудальной части гиппокампа практически не повлияло на поведение полевок и мышей в тестах, предназначенных для оценки тревожности. Наши эксперименты позволяют предположить, что наличие эффекта такого удаления на показатели тревожности может зависеть от вида животных. Видовые особенности последствий повреждения данной области гиппокампа ранее никем не рассматривались.

Разрушение структуры привело к нарушению нормальной исследовательской активности, особенно в аренах большого размера. И у мышей, и у полевок снижалось количество стоек и изменялась структура траектории. Подобные нарушения исследовательского поведения ранее исследователями не отмечались, вероятно, из-за использования экспериментальных установок небольшого размера и ограниченного набора регистрируемых параметров поведения, в частности, игнорирования показателя количества стоек. Применение нами современных методов видеотрекинга, сегментации треков и разработка подхода к оценке результатов сегментации позволило провести детальный анализ и сравнение структуры траекторий передвижения в аренах разного размера у контрольных и оперированных животных. Такой подход применяется впервые.

Удаление каудальной части гиппокампа приводило к заметному нарушению пространственного обучения в водном тесте Морриса у рыжих полевок. У крыс такие нарушения обучения были менее выражены или не отмечались авторами. В сочетании с выявленными нарушениями организации исследовательского поведения в незнакомых аренах, полученные результаты позволяют предположить, что дефекты обучения могут быть связаны с нарушением как процессов кодирования пространства, так и планирования пути.

Впервые проведена оценка активации (по уровню экспрессии c-Fos) полей каудальной и ростральной части гиппокампа у мышей, которые осваивали арены разного размера. Показано, что каудальная часть гиппокампа была более активна у мышей, которые осваивали арены большого размера. Обнаружены специфические особенности экспрессии для полей CA1, CA3 и зубчатой фасции в разных субрегионах. При повторном тестировании в поле CA3 и зубчатой фасции обнаружено влияние изменения размера арены.

Результаты поставленных на двух видах грызунов экспериментов во многом совпадают, что может указывать на то, что они, вероятно, носят общий характер, а не являются проявлением видоспецифических особенностей объектов исследования.

Наше исследование позволило нам предложить более широкую трактовку функций каудальной части гиппокампа, чем обычно дается в современной литературе.

Научно-практическое значение

Полученные нами данные расширяют и уточняют существующие представления о функциях малоизученной каудальной части гиппокампа грызунов. В ходе проведенного исследования обнаружен принципиально новый аспект функционирования каудальной части гиппокампа: его участие в контроле исследовательского поведения, особенно проявлявшееся в экспериментальных установках большого размера. В то же время, проведенное исследование логично встраивается в существующие современные представления о функции целого гиппокампа и его ростокаудальной функциональной гетерогенности. Между настоящим исследованием и работами, которые ранее выполнялись в нашей лаборатории, прослеживается преемственность: ранее обнаруженные факты сыграли решающую роль в трактовке полученных нами результатов экспериментов. Мы полагаем, что сделанные нами выводы будут полезны для планирования последующих экспериментов по уточнению функциональных особенностей гиппокампа. Полученные результаты будут использованы для спецкурсов кафедры, посвященных изучению функций лимбической системы. Кроме того, фундаментальные знания, касающиеся функционирования каудального гиппокампа грызунов могут быть важны для изучения гомологичной области гиппокампа человека («переднего» гиппокампа), с которой связывают такие заболевания как височная эпилепсия (Blumcke et al., 2002; Cendes, 2005), болезнь Альцгеймера (Qui et al., 2009; Costafreda et al., 2011), и шизофрения (Schobel et al., 2009).

Сравнение результатов, полученных на диких полевках и лабораторных мышах может быть полезно с точки зрения изучения влияния процессов доместикации и лабораторного разведения на поведение животных.

Разработанные нами поведенческие методики, подходы к детальному анализу поведения и сам подбор тестов может быть полезен другим исследователям, изучающим физиологию поведения животных. Предлагаемые нами методы позволяют получить результаты, которые невозможно получить с использованием более традиционных подходов.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на всероссийской конференции с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» (Пушино, 2009), на II-й науч. конф. «Поведение и поведенческая экология млекопитающих» (Черноголовка, 2009), на XXI съезде Физиологического общества им. И.П.Павлова (Калуга, 2010), на 8-м международном конгрессе общества IBRO (Флоренция, Италия, 2011), на 8-м Форуме европейского общества нейрофизиологов (FENS, Барселона, Испания, 2012).

Материалы диссертации были апробированы на заседании кафедры высшей нервной деятельности Биологического ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова 28 сентября 2012 г.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, глав с изложением методов, результатов и их обсуждения, выводов, и списка литературы. Работа включает 161 страницу машинописного текста, содержит 29 рисунков и 13 таблиц. Список литературы содержит 150 источников.

МЕТОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты исследования. Взрослые самцы рыжей полевки *Clethrionomys (Myodes) glareolus* (n = 72) отловленные в летний период в местах обитания на Звенигородской биостанции МГУ и взрослые самцы (3-5 мес.) лабораторных мышей линии C57BL/6 (n = 113) (табл. 1). Животных содержали в виварии в условиях естественного освещения не менее одной недели до начала опытов. Эксперименты проводились с 8 до 20 ч., работу с животными разных групп чередовали. Опыты производили в соответствии с Директивой 2010/63/EU.

Удаление каудальной части гиппокампа. Животных наркотизировали с помощью раствора нембутала в дозе 40 мг/кг, и транквилизатора хлордиазепоксида в дозе

20–30 мг/кг, вводимых внутривенно. Производили по одной инъекции *NMDA* (*N*-метил-*D*-аспартат) в концентрации 10 мг/мл с каждой стороны (Для полевок: ростокаудально +0.16 см от брегмы, латерально +0.3 см от средней линии, дорзовентрально –0.4 см от поверхности черепа на уровне лямбды; объем инъекции 0.4 мкл. Для мышей: ростокаудально +0.15 см от брегмы, латерально +0.2 см от средней линии, дорзовентрально –0.5 см от поверхности черепа на уровне лямбды; объем инъекции 0.3 мкл). Контрольных животных подвергали ложным операциям, включавшим наркоз, вскрытие скальпа и введение инъекционной иглы в мозг. В тексте животные с удаленной каудальной частью гиппокампа называются оперированными животными, а животные, подвергшиеся ложной операции – контрольными.

Морфологический контроль. Оценку степени разрушения гиппокампа проводили по окрашенным по Нисслю фронтальным срезам (толщина 20 мкм) замороженного в парах азота мозга, извлеченного у животных после транскардиальной перфузии раствором формальдегида (4%). Границы гиппокампа определяли по атласам мозга рыжих полевок (Vandebroek *et al.*, 1999) и лабораторных мышей (Paxinos, Franklin, 2001). С помощью программы *Image Pro ver. 3.00.* по цифровому изображению среза определяли общую площадь структуры и площадь удаления на каждом 10-м срезе. Вычисляли общий объем гиппокампа и объем удаления.

Статистическая обработка данных. Значимость выявленных различий определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых и зависимых выборок, *U*-критерия Манна-Уитни, дисперсионного факторного анализа ANOVA для повторяющихся измерений и независимых факторов.

Результаты. И у мышей, и у полевок удаления избирательно охватывали каудальный гиппокамп, включая поля аммонова рога и зубчатую фасцию. Ростральная его часть была сохранна во всех случаях. Объем разрушения: в среднем 30.2±3.1 % от общего объема всей структуры у полевок, в среднем 31.7±1.9 % у мышей.

Последовательность тестов

Тесты первой серии проводили в следующей последовательности: малое прямоугольное открытое поле, черно-белая камера, тест с убежищем, тест на гипонеофагию, Т-образный лабиринт, туннельный тест, открытое поле с предметами, водный тест Морриса. В эксперименте с аренами разного размера тестировались отдельные группы оперированных и контрольных животных.

Состав экспериментальных групп (число и вид животных) представлен в табл. 1.

Батарей тестов включала эксперименты, оценивающие показатели тревожности (черно-белая камера, тест с убежищем, тесты на гипонеофагию, туннельный тест, открытое поле), исследовательскую активность (открытое поле; знакомое открытое поле с новыми предметами), рабочую память (спонтанное чередование в Т-образном лабиринте), референтную пространственную память (водный тест Морриса, пространственная версия), способность к непространственному обучению, поиску скрытой платформы по расположенному на ней видимому ориентиру (водный тест Морриса, сигнальная версия).

Черно-белая камера. *Установка.* Прямоугольная камера (45 см х 20 см х 20 см), имела темный отсек (длиной 15 см), закрытый непрозрачной крышкой, и светлый (30 см), закрытый прозрачной крышкой. Светлая часть освещалась лампой 40 Вт.

Процедура. Животных высаживали в светлую часть установки, ориентируя головой в сторону торца камеры. Длительность тестирования 10 минут. *Анализ.* Оценивали латентный период первого захода в темную часть камеры и длительность пребывания.

Результаты. Большинство полевок замирали на старте и не перемещались внутри установки. Тест оказался неподходящим для диких грызунов. В связи с этим был разработан аналог черно-белой камеры (**тест с убежищем**), адекватный для исследования на полевках реакции избегания освещенного пространства.

Тест с убежищем. *Установка.* В камеру (40 см х 20 см х 15 см) помещали убежище из толстых веток, приподнятых над дном камеры. Установка равномерно

освещена четырьмя лампами дневного света, расположенными потолке на высоте 2.5 м от пола. *Процедура.* Животное высаживали в открытую часть установки, ориентируя головой в направлении дальней от убежища стенки. Длительность тестирования 10 минут. *Анализ.* Оценивали латентный период первого захода в убежище и время, проведенное там.

Результаты. Полевки опытной и контрольных групп быстро заходили в убежище, статистически значимых различий не обнаружено.

Тесты на гипонеофагию. Тест позволяет оценивать степень тревожности, используя характеристики поведения, не связанные с передвижением животных в экспериментальном пространстве. Гипонеофагией называют характерную особенность поведения животных, заключающуюся в осторожном отношении к новой пище в новой обстановке. Четыре эксперимента проводили в четырех разных помещениях, одинаково освещенных (четыре лампы дневного света на высоте 2.5 м). *Установка 1.* Стекланный цилиндр диаметром 10 см, высотой 20 см. На дне выложены два раздробленных плода миндаля. *Установка 2.* Прямоугольный пластиковый контейнер (20 см x 10 см x 20 см). На дно выложено несколько фрагментов сушеных бананов. *Установка 3.* Стекланный цилиндр диаметром 14 см, высотой 23 см, дно покрыто песком. На дно выложено несколько зерен сладкой кукурузы. *Установка 4.* Прямоугольный пластиковый контейнер (20 см x 10 см x 20 см). На дно выложено два раздробленных плода кешью. *Процедура.* Животное высаживали в установку. Тестирование продолжалось до трех подходов животного к пище или до истечения 5 мин. *Анализ.* Регистрировали латентный период начала поедания пищи и общее время кормления.

Результаты. Не выявлено статистически значимых различий между группами.

Туннельный тест. *Установка.* Состоит из узкой центральной камеры размером 5.5x30 см, высотой 30 см. и двух прикрепленных к ней снаружи с разных сторон непрозрачных трубок. Каждая трубка соединяет два отверстия диаметром 4 см, расположенных на длинной стороне камеры. Через эти отверстия животные могли переходить из центральной камеры в трубки и обратно. Помещение освещено (четыре лампы дневного света на высоте 2.5 м). *Процедура.* Животное выпускали в центральную камеру. Длительность тестирования 15 минут. *Анализ.* Регистрировали латентный период захода в трубки лабиринта и время, проведенное в трубках.

Результаты. Не выявлено статистически значимых различий между группами.

Малое открытое поле. *Установка.* Прямоугольная камера с прозрачными стенками размером 18 см x 36 см с высотой стенок 24 см, окруженный шатром из черной ткани. На высоте 60 сантиметров от пола на внутренней стороне шатра вывешены ориентиры – 3 ряда листов бумаги (формат А4) с контрастными изображениями кругов, треугольников и крестов. На каждый тип ориентиров приходилось по трети окружности. На высоте 110 см расположена лампа мощностью 40 Вт. Здесь и в других экспериментах по методике «открытое поле» и в водном тесте Морриса использовали систему автоматической регистрации траектории Noldus EthoVision 3.0 (Нидерланды). *Процедура.* Животное высаживали в центр открытого поля. Длительность тестирования 15 минут. *Анализ.* Регистрировали длину пройденного пути, скорость передвижения, количество стоек, длительность и частоту груминга, длительность и частоту реакции замирания, количество болюсов.

Результаты. Не выявлено статистически значимых различий между группами. Наблюдали тенденцию к снижению количества стоек как у полевок, так и у мышей (рис. 4).

Большое открытое поле. *Установка.* Круглая арена диаметром 150 см, высота стенок 75 см, окруженная шатром из черной ткани. На высоте 150 см от пола на внутренней стороне шатра вывешены ориентиры, организованные так же, как в предыдущем эксперименте. На высоте 2 м расположена лампа мощностью 40 Вт. *Процедура.* Животное выпускали в арену на 15 минут. *Анализ.* Регистрировали скорость

передвижения и длину пройденного пути, длительность и частоту груминга и замирания, количество стоек

Результаты.

Полевки. У оперированных полевок заметна тенденция к более активному передвижению по арене (длина пути в среднем 6325 ± 490 см, скорость 39.1 ± 9.2 см/с, против 4911 ± 445 см и 26 ± 7.7 см/с у контрольной группы). Распределение активности по пространству арены у обеих групп было сходным: большую часть пути животные проходили в пристеночной зоне арены (оперированные: 87.4 ± 7.2 %; контрольные: 89.3 ± 5.8 %), то есть имели сходный уровень тигмотаксиса. Важен тот факт, что удаление значительно снижало общее количество стоек – до 10.1 ± 4.1 против 31.8 ± 8.7 у контрольных животных ($t=2.35$, $p<0.05$). Различался также и характер корреляции между длиной пути и количеством стоек: у оперированных животных корреляция отсутствует, а у контрольных она выражена (коэффициент корреляции Спирмена $R=0.59$, $p<0.05$).

Мыши. Оперированные мыши проходили в арене в среднем 12234 ± 1521 см, передвигаясь со скоростью 15.2 ± 1.3 см/с, а контрольные – 10537 ± 1257 см со скоростью 12.3 ± 4.4 см/с. Так же как и у полевок распределение активности по пространству арены у всех животных было одинаковым, удаление части гиппокампа не влияло на степень выраженности тигмотаксиса. Как и у полевок, удаление значительно снижало общее количество стоек мышей – до 19.2 ± 7.1 против 65.8 ± 10.4 у контрольных животных ($t=2.76$, $p<0.01$).

Открытое поле с новыми предметами. На следующий день в знакомое по предыдущему опыту поле помещали два предмета – деревянных столбика высотой около 10 см, диаметром 2-3 см на подставках. *Анализировали* количество подходов к предметам и их характеристики, количество стоек и около предметов.

Результаты.

Полевки. И оперированные и контрольные животные, посещали зоны, в которых располагались предметы. Однако это происходило не сразу, а по прошествии определенного времени (в среднем через 173 ± 40 с к предметам подходили оперированные полевки, через 230 ± 32 с контрольные). Прооперированные животные посещали выставленные в арену предметы чаще, чем контрольные (в среднем 14.2 ± 2.2 раза против 9 ± 1.1 раз у контрольных; $t=2.88$, $p<0.05$). При этом частота посещения симметричных зон без предметов не отличалась у прооперированных и контрольных животных. Доля времени, проводимого в зонах с предметами по сравнению с симметричными пустыми зонами была снижена у прооперированных животных (83.3 ± 2.2 %) по сравнению с контрольной группой (93.0 ± 3.5 %, $t=2.02$, $p=0.053$). Средняя длительность одного посещения зоны, в которой располагался предмет, была снижена у полевок с удаленным каудальным гиппокампом (4.7 ± 0.4 с против 10 ± 1.1 с у контрольных; $t=2.9$, $p<0.01$). Удаление части гиппокампа приводило к уменьшению количества стоек в зонах предметов (4.0 ± 1.5 против 9.5 ± 3.5 у контрольных; не значимо: $t=2.03$, $p=0.059$) и к снижению доли подходов, сопровождаемых стойками (8.5 ± 2.0 против 27.1 ± 5.5 у контрольных; $t=2.06$, $p=0.058$).

Мыши. Животные активно подходили к предметам, однако удаление изменяло направленную на них активность. Удаление снижало латентный период подхода к предметам (оперированные: 94.3 ± 11.1 с; контрольные: 129.9 ± 13.3 с; $t=2.61$, $p<0.05$). При этом и оперированные, и контрольные мыши проводили около предметов много времени (оперированные: 80.4 ± 8.9 с контрольные: 57.5 ± 6.3 с; различия между группами значимы: $t=3.23$, $p<0.01$). Активность оперированных животных была в меньшей степени сосредоточена в зонах с предметами, чем в симметричных пустых зонах, чем активность контрольных животных (оперированные мыши проводили в зонах с предметами 83.9 ± 2.1 % от общего времени, проведенного в зонах, контрольные мыши – 88.9 ± 3.2 %, $t=1.52$, $p<0.12$; у оперированных мышей на зоны с предметами приходилось 69.7 ± 3.0 % дистанции, к контрольных – 78.2 ± 2.2 %, $t=2.01$, $p<0.051$). Как и у полевок, удаление

приводило к снижению количества стоек в зонах предметов (11.3 ± 2.4 против 22.7 ± 4.4 у контрольных; $t=2.02$, $p<0.05$) и к уменьшению доли подходов, сопровождаемых стойками (20.5 ± 5.7 против 37.4 ± 7.0 у контрольных; $t=2.3$, $p<0.05$).

По большинству показателей, позволяющих оценивать тревожность, не выявлено эффектов удаления каудальной части гиппокампа. Ни в одном из экспериментов не было получено отличий в показателях дефекации, уринации, груминга, замирания.

Т-образный лабиринт, реакция спонтанного чередования.

Установка. Ширина рукавов – 10 см, длина рукавов – 30 см, высота стенок – 20 см. Установка освещена (четыре лампы дневного света на высоте 2.5 м). *Процедура.* Животное высаживали в стартовый рукав, и ожидали его перехода в один из боковых рукавов. По истечении 30 с животное пересаживали в стартовый рукав, и повторно ожидали перехода в один из боковых рукавов. Проводили три таких попытки, интервал между попытками 30 мин. *Анализ.* Регистрировали процент попыток, в которых во время двух выпусков были посещены разные рукава. **Результаты.** Не выявлено статистически значимых различий между группами. И контрольные, и экспериментальные полевки в среднем в 80 % случаев чередовали рукава лабиринта.

Водный тест Морриса. *Установка.* Бассейн диаметром 130 см, высота стенок 30 см, заполненный водой до высоты 20 см. Температура воды $+23...+25^{\circ}\text{C}$. В помещении находились различные предметы обстановки, мебель, на стенах висели постеры. Помещение освещено (четыре лампы дневного света на высоте 2.5 м).

Процедура. Эксперимент проводили в течение пяти дней. В первые четыре дня животных обучали находить скрытую под водой платформу (9x9 см). Расположение платформы не изменяли (хотя оно могло быть разным у разных животных). Место выпуска от попытки к попытке изменяли в исходно заданной случайной последовательности. На третий и на пятый день эксперимента перед началом обучения были проведены тестовые попытки продолжительностью 60 с, для чего платформу из бассейна убрали. В последний, пятый день для выявления возможных мотивационных, моторных или сенсорных нарушений эксперимент проводили, применяя “сигнальную” версию теста. В этом случае платформа была скрыта под водой, но ее положение обозначали “сигналом” – флажком, расположенным выше уровня воды. В этом случае местоположение платформы и место выпуска животных изменяли от попытки к попытке. *Анализ.* С помощью программы WinTrack (Wolfer et al., 2001) для каждой попытки вычисляли следующие показатели: длина пройденного пути (м), время поиска платформы (с), индекс эффективности пути (%; доля пути, отличающегося менее чем на 15° от направления на цель). Для тестовых попыток оценивали долю времени, проведенного в четырех квадрантах бассейна (целевом, в котором ранее располагалась платформа, двух соседних и противоположном), а также количество пересечений целевой зоны (диаметр 30 см), в которой располагалась платформа во время обучения, а также аналогичных зон в других квадрантах.

Результаты. И оперированные, и контрольные полевки обучались в тесте Морриса, хотя и с разным успехом. Длина пути и время поиска платформы снижались от начала к концу эксперимента у полевок обеих групп (рис. 2). Дисперсионный анализ динамики обучения (ANOVA для повторных измерений, факторы «номер попытки» и «группа») по фактору «номер попытки» подтвердил значимость различий для этих показателей (для общей длины пути $F_{(19,460)} = 12.7$, $p<0.001$, времени поиска платформы $F_{(19,460)} = 18$, $p<0.001$). Изменялся и показатель, характеризующие целенаправленность поиска: индекс эффективности пути увеличивался (табл. 2). Дисперсионный анализ по фактору «номер попытки» подтвердил значимость и этих различий ($F_{(19,460)} = 6.02$, $p<0.001$). Оперированные полевки, по сравнению с контролем, больше времени затрачивали на поиск платформы и проходили при этом больший путь (рис. 2). Поиск платформы был у них менее целенаправленным. Дисперсионный анализ по фактору

“группа” подтвердил значимость различий для показателей времени поиска платформы ($F_{(1,460)} = 4.6, p < 0.05$) и индекса эффективности пути ($F_{(1,460)} = 7.5, p < 0.05$). Взаимодействия факторов “группа” и “номер попытки” не обнаружено. Во время первой тестовой попытки полевки обеих групп предпочитали искать платформу в целевом квадранте (рис. 3) Однако удаление гиппокампа уменьшало точность поиска. У оперированных животных, по сравнению с контролем, снижалось количество пересечений менее обширной целевой зоны вокруг платформы (рис. 3). Ко второй тестовой попытке это различие сохранялась лишь в виде тенденции. В сигнальной версии теста Морриса никаких отличий между группами не обнаружено.

Табл. 2. Динамика изменения показателя целенаправленности поиска в водном тесте Морриса.

Группа	Дни				
	1	2	3	4	5
Оперир.	13.6 ± 0.8	21.1 ± 1.7*	25.2 ± 2.3	27.2 ± 2.4*	44.4 ± 2.7
Контроль	15.2 ± 1.4	31.6 ± 2.3	31.7 ± 2.2	35.4 ± 1.9	40.8 ± 2.2

В водном тесте Морриса удаление ухудшило обучение и снизило точность поиска платформы в задаче на референтную пространственную память. В то же время, разрушение не повлияло на непространственное обучение поиску скрытой платформы, если ее положение обозначали флажком и изменяли от попытки к попытке.

Проведенные эксперименты показали, что нарушения поведения после удаления каудальной области выявлены там, где животные передвигались в больших аренах, а не в узких, небольших боксах. Для того, чтобы оценить зависимость эффекта удаления каудальной части гиппокампа от размеров экспериментального пространства был поставлен следующий эксперимент.

Оценка влияния размера арен на поведение животных. *Установка.* Использовали арены открытого поля четырех диаметров (35, 75, 150 и 220 см), окруженные черным шатром. Ориентиров на внутренней поверхности шатра не было. На высоте 2 м расположена лампа мощностью 40 Вт.

Для того, чтобы иметь возможность трактовать изменения поведения, вызванные удалением каудальной части гиппокампа, сначала провели **контрольный эксперимент на интактных лабораторных мышах**. Задача эксперимента – выявление особенностей влияния размера арены на поведенческие показатели.

Процедура. Мышь высаживали в центр арены. Время тестирования составляло 20 минут. В арене каждого диаметра тестировали отдельную группу мышей. Часть мышей, освоивших арены диаметром 75 и 150 см повторно тестировали во второй день. При этом некоторых мышей тестировали в той же арене, что и в первый день (75 см – 75 см, 220 см – 220 см), а некоторых – в арене другого диаметра (75 см – 220 см, 220 см – 75 см) Результаты 2-го дня эксперимента приведены ниже в разделе, посвященном оценке активации гиппокампа. *Анализ.* Оценивали длину пройденного пути, скорость передвижения, распределение активности по пространству арены, показатель кривизны пути (траектория разбивается на участки, каждый из которых животное проходит за 0.5 с; для каждого участка рассчитывается угол между касательными траектории, построенными с интервалом 0.5 с), рассчитанный с помощью программы WinTrack (Wolfer et al., 2001). С помощью программы Segment Analyzer (©Anokhin, Mikhina) вычисляли характеристики сегментов траектории – участков непрерывного движения, отделенных друг от друга остановками. Вычисляли длину, длительность и максимальную скорость сегментов. Оценивали количество стоек с опорой на борт, количество стоек без опоры на борт, длительность и частоту груминга, реакции замиранья.

Результаты. Мыши по-разному передвигались в открытом поле разного размера. Пройденный путь и скорость увеличивались с увеличением размера арен (рис. 5 А, Б), но медленнее, чем увеличивался диаметр и тем более площадь. В больших аренах мыши

большее число раз поднимались в стойки, и это обусловлено главным образом увеличением количества стоек без опоры на борт (рис. 5 В). При этом число стоек в аренах 35 и 75 см не различалось, но скачкообразно увеличивалось в больших аренах, где характеристики аренах 150 и 220 см также не различались.

Сегментный анализ (программа Segment Analyser) показал, что увеличение размера арен привело к некоторому снижению сегментированности траекторий, животные реже останавливались. На пространственное распределение остановок влиял размер арены: если в арене 35 см оно было равномерным, то в больших аренах от 65 до 86 % остановок располагалось в пристеночной зоне по всему периметру арены. В больших аренах сегменты в среднем имели большую длительность, длину и максимальную скорость, причем скорость сегментов была близкой в аренах 35 и 75 см и скачком увеличивалась в больших аренах, достигая максимума в арене 220. Анализ сегментов в различных скоростных диапазонах показал, что при увеличении размера пространства увеличивается количество сегментов с высокими максимальными скоростями и соответственно их доля в общем числе сегментов.

Изучение влияния удаления каудальной области гиппокампа на поведение животных в незнакомых аренах разного размера. Процедура. Аналогична той, что была в контрольном эксперименте, но использовали только арены диаметром 75 и 220 см.

Результаты. *Полевки.* Удаление каудальной части гиппокампа изменяло поведение рыжих полевок, причем преимущественно в большой, но не в малой арене. В большой арене удаление значимо снижало количество стоек. Уменьшилось как число стоек с опорой на борт (у оперированных: 10.3 ± 1.5 ; у контрольных: 17.0 ± 2.1 ; $t=2.51$, $p<0.05$), так и без нее (у оперированных: 5.1 ± 1.7 ; у контрольных: 6.5 ± 1.1 ; $t=2.25$, $p<0.05$). В малой арене снижение носило характер тенденции (рис. 4).

Повреждение гиппокампа привело к уменьшению количества остановок в большой (оперированные: 50.0 ± 8.8 ; контрольные: 70.9 ± 8.7 ; $t=5.72$, $p<0.01$), но не в малой арене (оперированные: 72.3 ± 9.1 ; контрольные: 75.0 ± 8.0). Показатель кривизны пути так же был снижен в большой (оперированные: 87.4 ± 10.9 %/м; контрольные: 100.7 ± 3.0 %/м; $t=1.98$, $p<0.05$), но не в малой арене (оперированные: 87.6 ± 11.0 ; контрольные: 95.1 ± 8.5). Удаление изменяло сегментную структуру траектории животных, причем преимущественно в большой арене: у оперированных полевок наблюдали увеличенную долю высокоскоростных длинных сегментов в общем их числе. На рис. 6 А показаны множества сегментов траекторий в аренах диаметром 75 и 220 см. Каждая точка на плоскости соответствует одному сегменту. Точки, соответствующие оперированным и контрольным животным по-разному распределяются на плоскости. Желтым цветом на графике показана 95 % перцентиль для контрольной группы. В арене диаметром 220 см количество сегментов вне этой области превышает их количество у контрольных животных ($U=11.2$; $p<0.05$) В особенности этот эффект заметен в арене большого размера. На рис. 6 Б показано соотношение средней длины сегмента от его максимальной скорости. В арене большого диаметра сегменты, средняя максимальная скорость которых превышала 60 см/с имели большую длину у полевок с удаленной каудальной частью гиппокампа. Удаление увеличивало долю, которую такие сегменты составляли в общей длине пути (оперированные: 21.2 ± 2.6 %; контрольные: 13.3 ± 1.0 %; $U=12.0$, $p<0.05$, критерий Манна-Уитни). Статистически значимые изменения сегментной структуры траектории наблюдали несмотря на отсутствие значимых различий в суммарных и усредненных показателях локомоторной активности.

Мыши. Удаление значительно снижало количество стоек без опоры на борт до 4.6 ± 0.9 против 39.0 ± 4.7 у контрольных мышей в большой арене ($t=6.8$, $p<0.001$) и до 3.5 ± 1.2 против 11 ± 1.6 у контрольных мышей в малой арене ($t=2.22$, $p<0.05$). Количество стоек с опорой на борт у оперированных и контрольных животных не различалось. Выраженность эффекта удаления каудальной части гиппокампа зависела от размера

Табл. 1. Количество мышей и полевок в экспериментальных группах. Всего в экспериментах участвовало 72 рыжие полевки и 113 лабораторных мышей.

Вид	Серия	Метод	Группы	N
Рыжая полевка (Clethrionomys glareolus Schreb)	Удаление каудальной части гиппокампа	Черно-белая камера	Контроль	12
			Оперированные	10
		Тест с убежищем	Контроль	12
			Оперированные	10
		Тест на гипонеофагию	Контроль	12
			Оперированные	10
		Т-образный лабиринт	Контроль	25
			Оперированные	20
		Туннельный лабиринт	Контроль	25
			Оперированные	20
		Малое открытое поле	Контроль	24
			Оперированные	24
		Открытое поле с предметами	Контроль	17
			Оперированные	17
		Открытое поле двух разных размеров	Контроль	В малом: 8 В большом: 8
			Оперированные	В малом: 10 В большом: 8
Водный тест Морриса	Контроль	11		
	Оперированные	14		
Мышь C57BL/6	Удаление каудальной части гиппокампа	Малое открытое поле	Контроль	10
			Оперированные	10
		Т-образный лабиринт	Контроль	19
			Оперированные	22
		Туннельный лабиринт	Контроль	19
			Оперированные	22
		Открытое поле с предметами	Контроль	11
			Оперированные	10
		Открытое поле двух разных размеров	Контроль	В малом: 10 В большом: 11
			Оперированные	В малом: 10 В большом: 12
Мышь C57BL/6	Оценка экспрессии c-Fos в каудальной и ростральной частях гиппокампа	Тестирование в аренах разного размера	арена 35 см	9
			арена 75 см	10
			арена 150 см	10
			арена 220 см	10
			75-75 см	4
			220-220 см	5
			75-220 см	5
			220-75 см	4

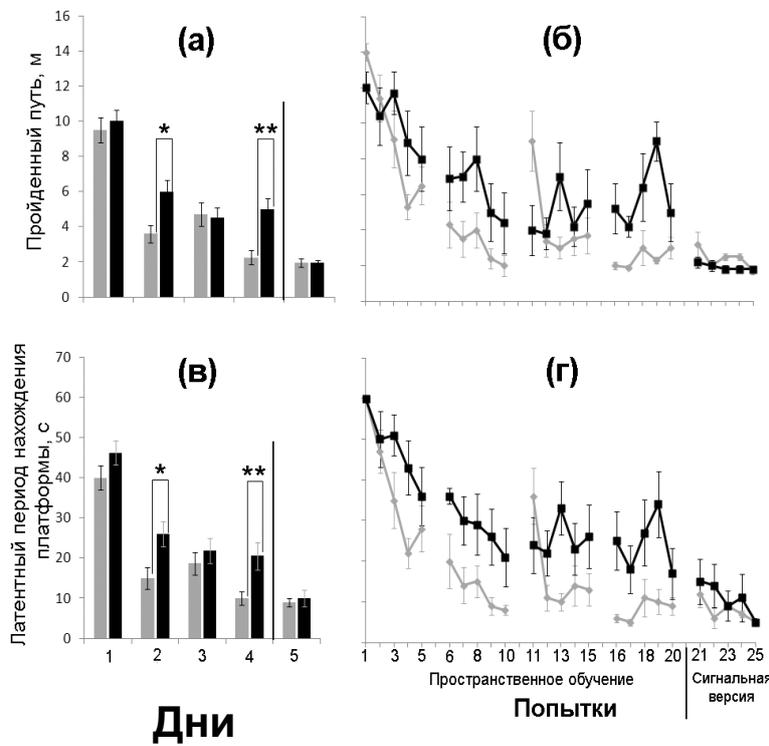


Рис. 2. а, в – изменение показателей обучения по дням эксперимента (1-4 – пространственное обучение, 5 – сигнальная версия). б, г – изменение показателей по попыткам Отличия по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$. Серый цвет – контрольные животные, черный цвет – оперированные, разбросы здесь и далее показывают ошибки средних.

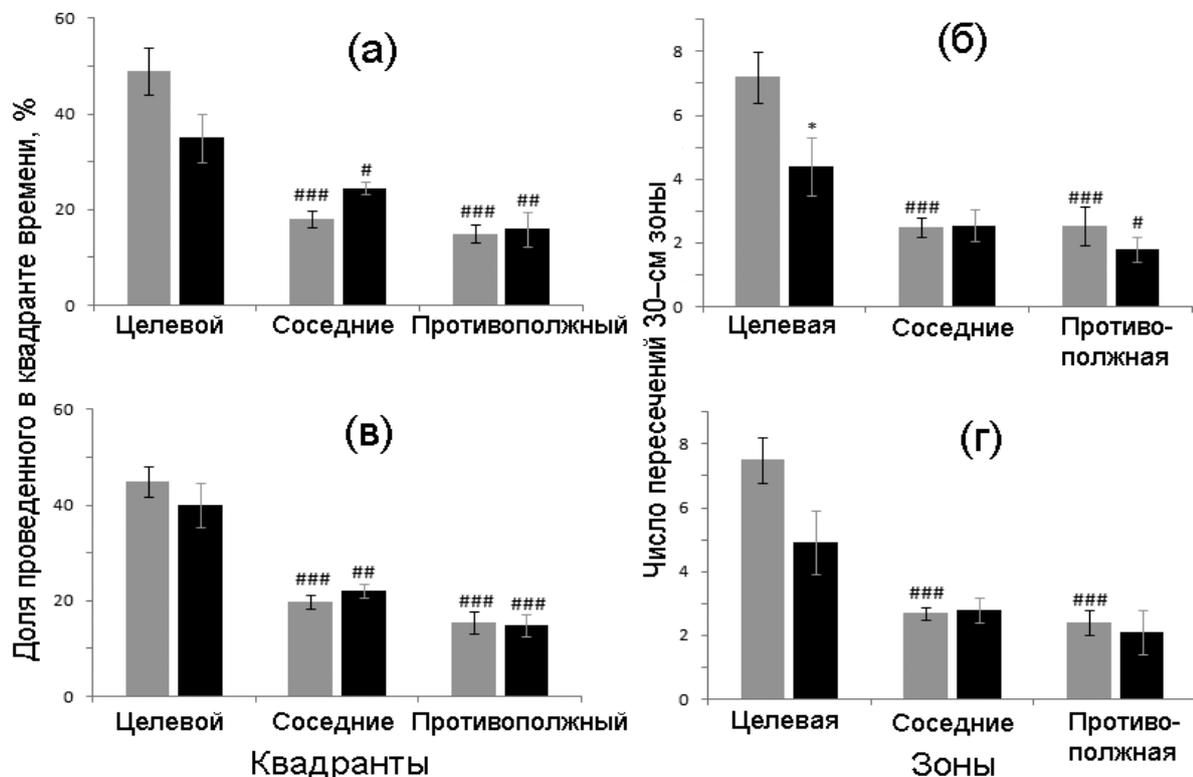


Рис. 3. Показатели тестовых попыток. а, в – доля времени, проведенного в целевом квадранте в первую и вторую тестовую попытку; б, г – число пересечений 30-см зоны в первую и вторую тестовую попытку. Отличия по сравнению с контрольной группой по t-критерию Стьюдента: * – $p < 0.05$. Отличия по сравнению с целевым квадрантом по парному t-критерию Стьюдента: # – $p < 0.05$, ## – $p < 0.01$, ### – $p < 0.01$.

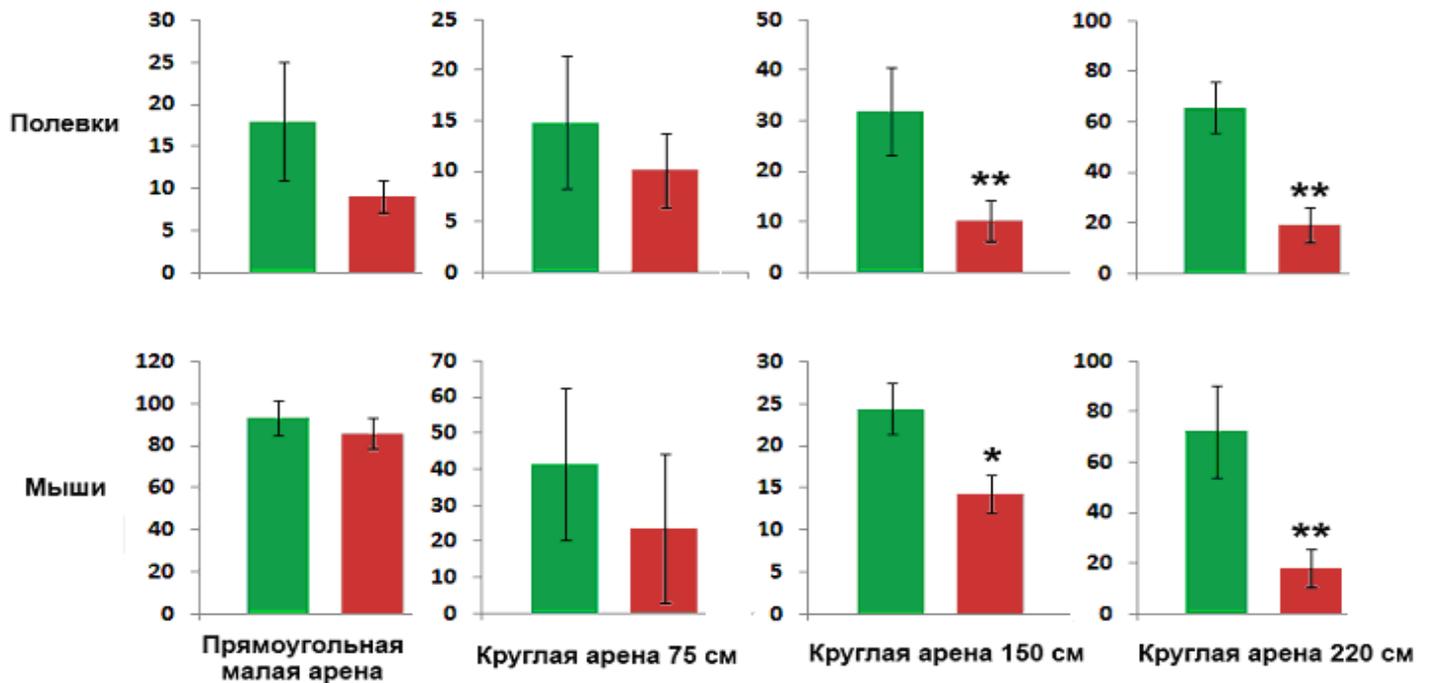


Рис. 4. Влияние удаления на количество стоек полевки и мышей в аренах разного диаметра. Звездочками показан уровень значимости между группами по критерию Стьюдента для независимых выборок (* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$). Зеленым цветом показан контроль, коричневым – оперированные животные.

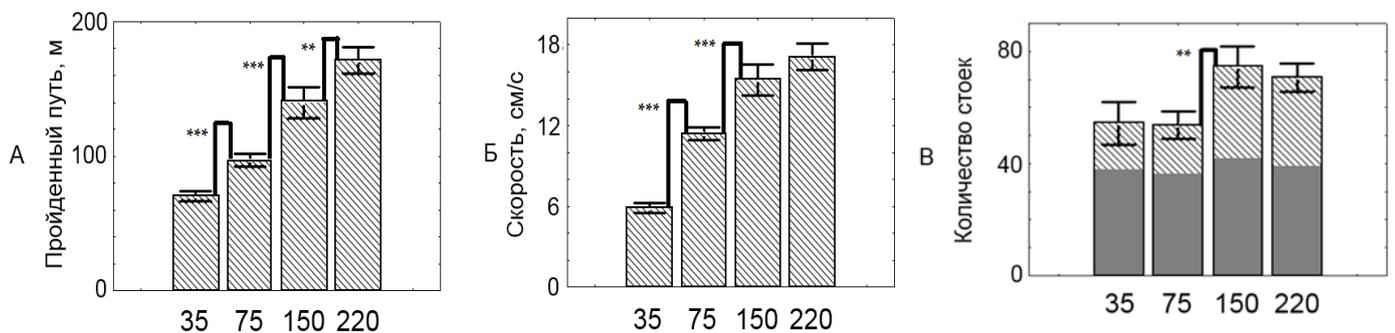


Рис. 5. Основные характеристики активности мышей в аренах разного размера. По оси х указан диаметр арены в см. А. Длина пути, м. Б. Скорость, см/с. В. Общее количество стоек. На графике сплошной серой заливкой обозначено количество стоек с опорой на борт. Звездочками указаны уровни значимости различий по t-критерию Стьюдента (** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$)

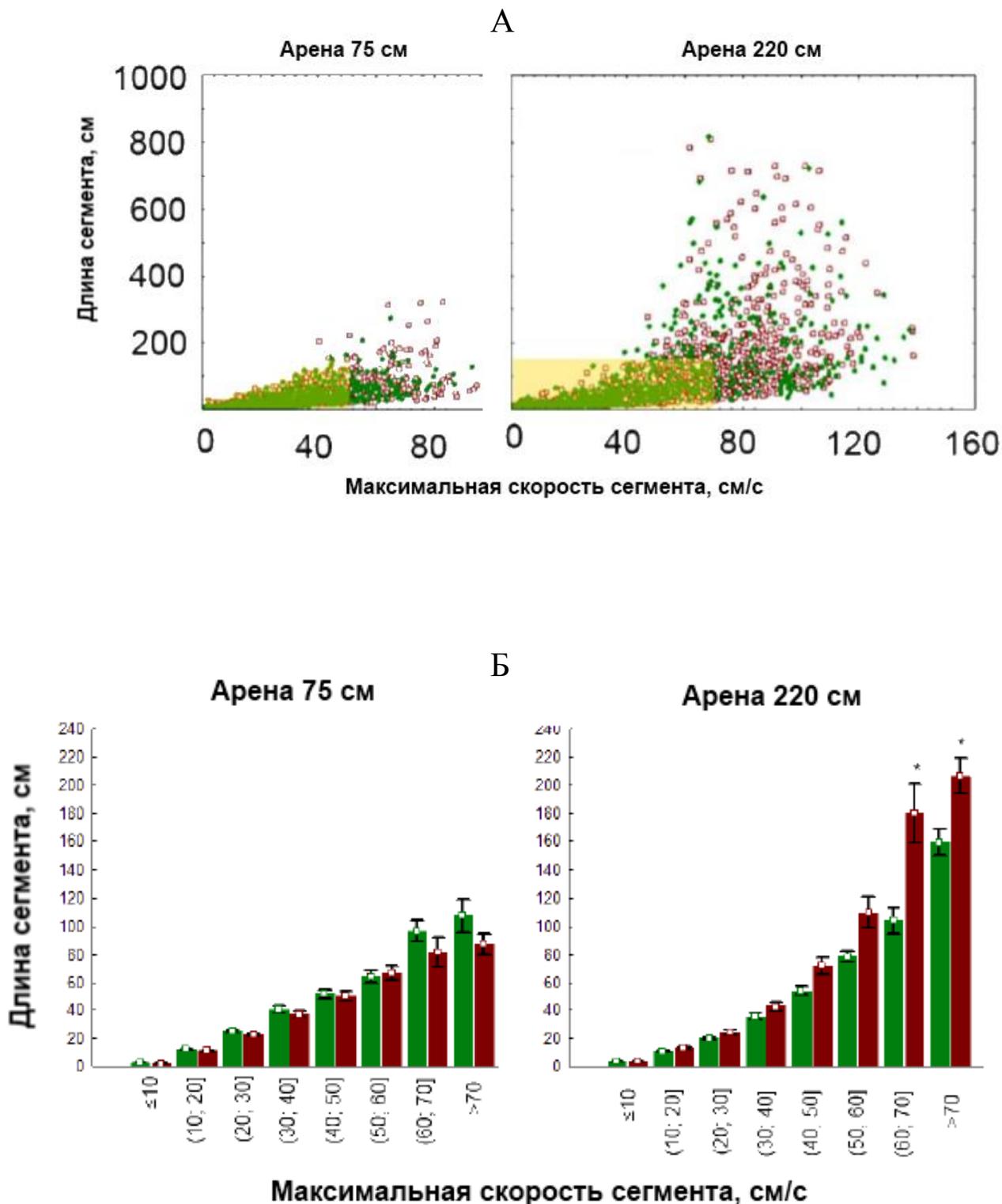


Рис. 6. Характеристики сегментов траекторий полевок. А. Распределение сегментов по максимальной скорости и длине. Желтым цветом показана 95 % перцентиль для контрольной группы. В арене диаметром 220 см количество сегментов вне этой области превышает их количество у контрольных животных ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни). Б. Зависимость усредненных длин сегментов от их скорости. * - различия статистически значимы при $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни. Коричневым цветом показаны данные по оперированным животным.

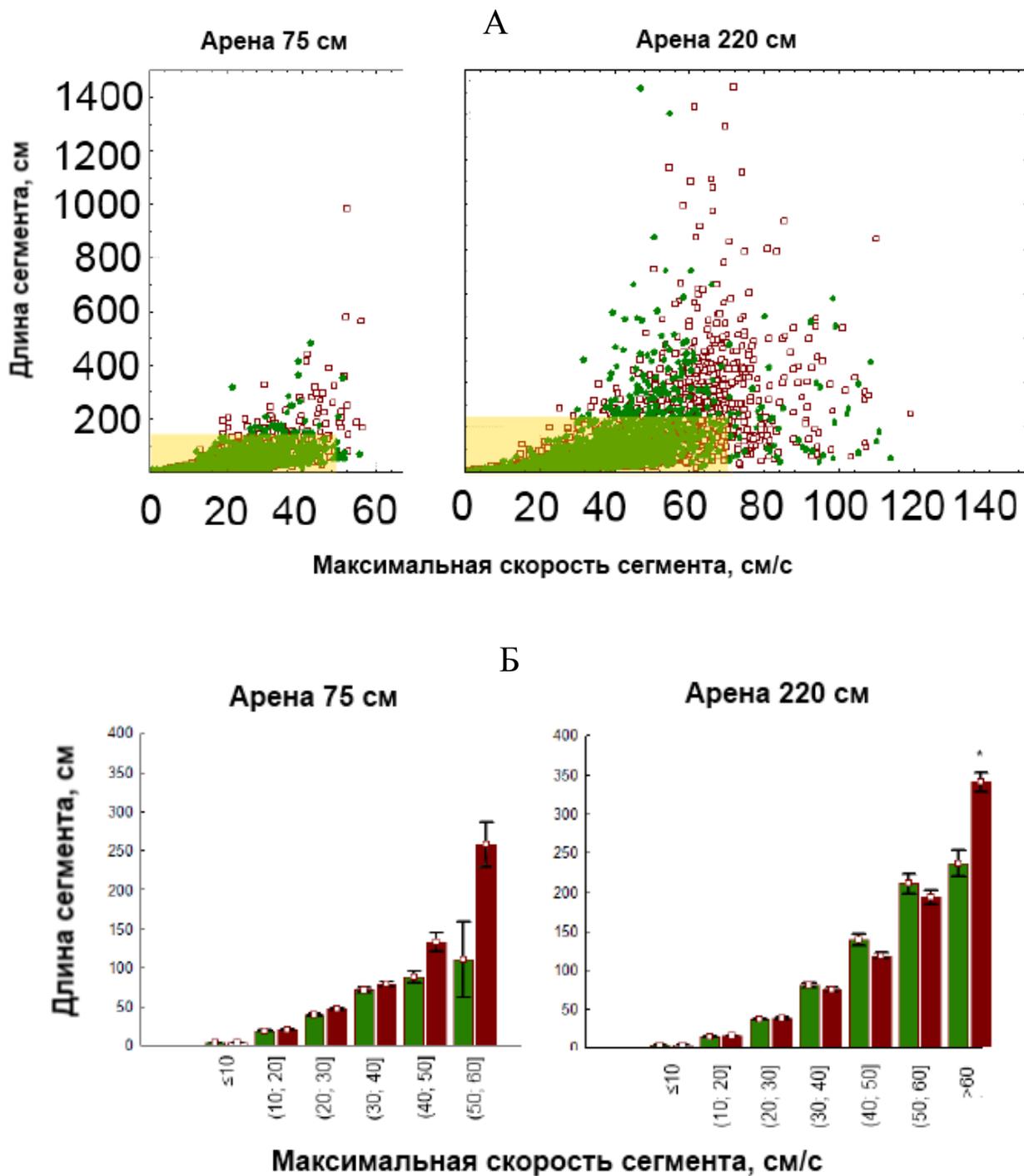
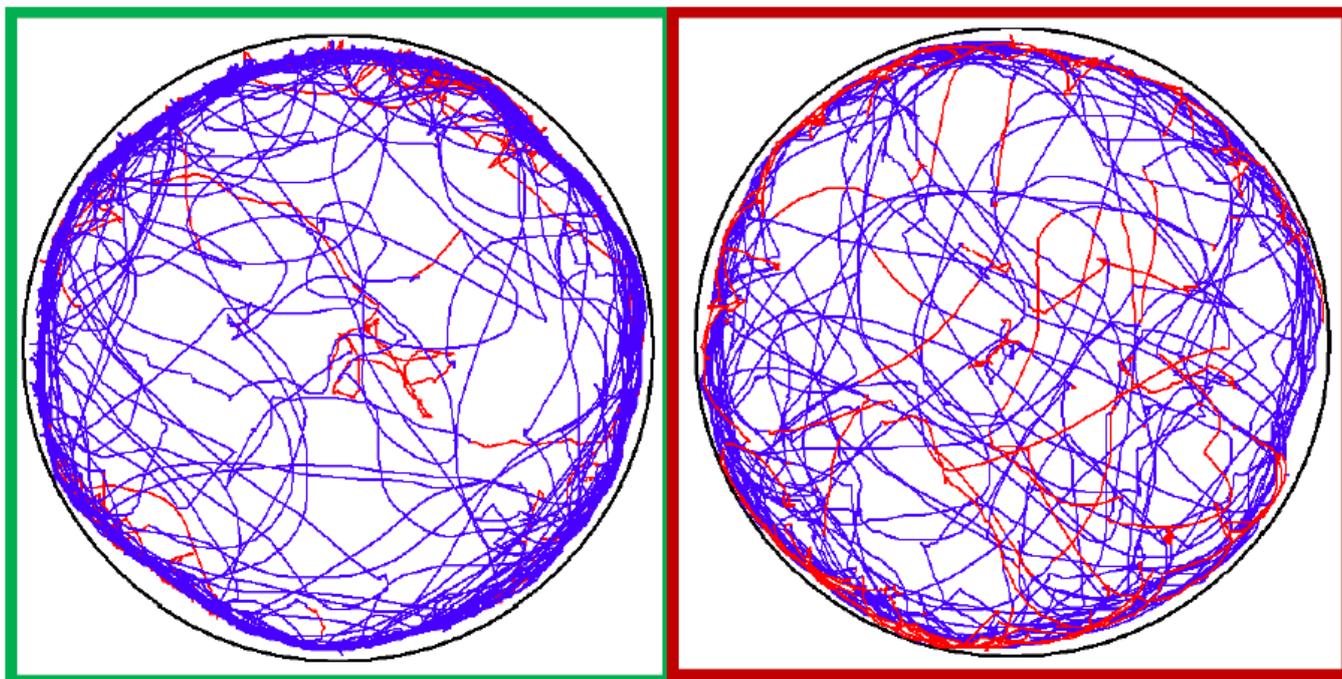


Рис. 7. Характеристики сегментов траекторий мышей. А. Распределение сегментов по максимальной скорости и длине. Желтым цветом показана 95 % перцентиль для контрольной группы. В арене диаметром 220 см количество сегментов вне этой области превышает их количество у контрольных животных ($p < 0.05$, критерий Манна-Уитни). Б. Зависимость усредненных длин сегментов от их скорости. * - различия статистически значимы при $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни. Коричневым цветом показаны данные по оперированным животным.

А



Б

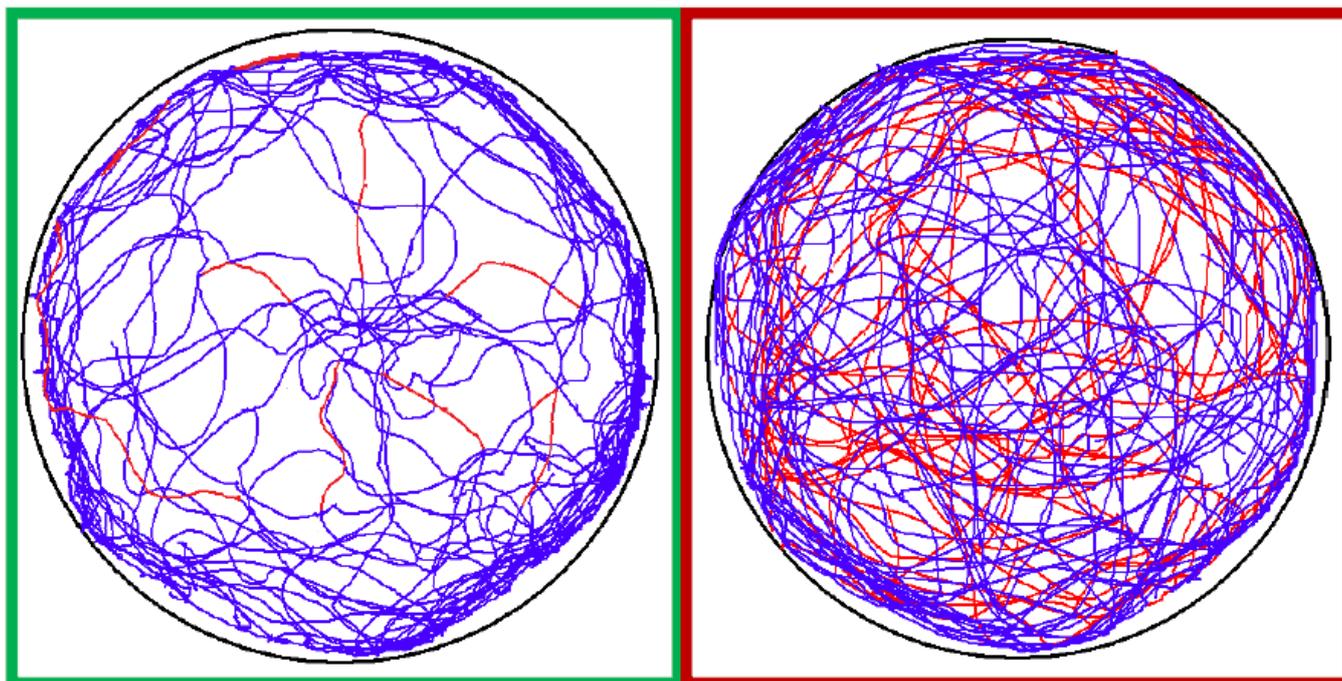


Рис. 8. Примеры траекторий контрольных (в зеленых рамках) и оперированных (в коричневых рамках) полевок (А) и мышей (Б) в арене диаметром 220 см. Красным цветом обозначены высокоскоростные протяженные сегменты (см. пояснение в тексте).

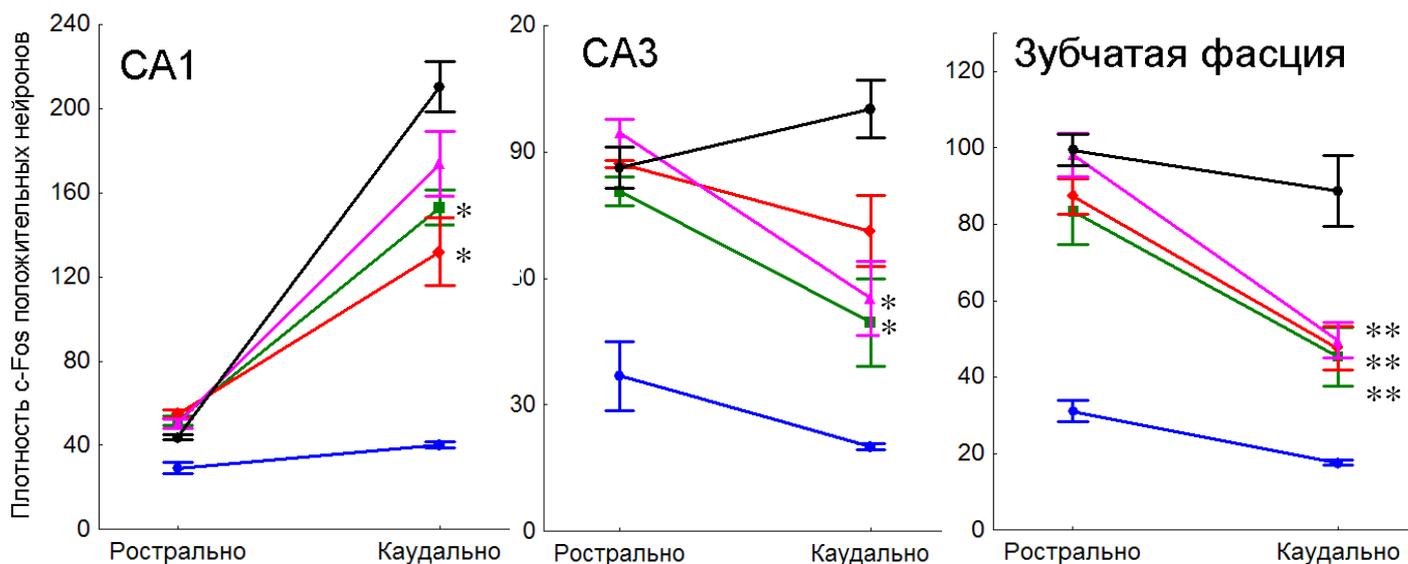


Рис. 9. Активация полей гиппокампа после однократного высаживания мышей в незнакомую арену открытого поля. * – Сравнение с уровнем активации в арене 220 см: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

■ Арена 220 см
 ■ Арена 150 см
 ■ Арена 75 см
 ■ Арена 35 см
 ■ Пассивный контроль

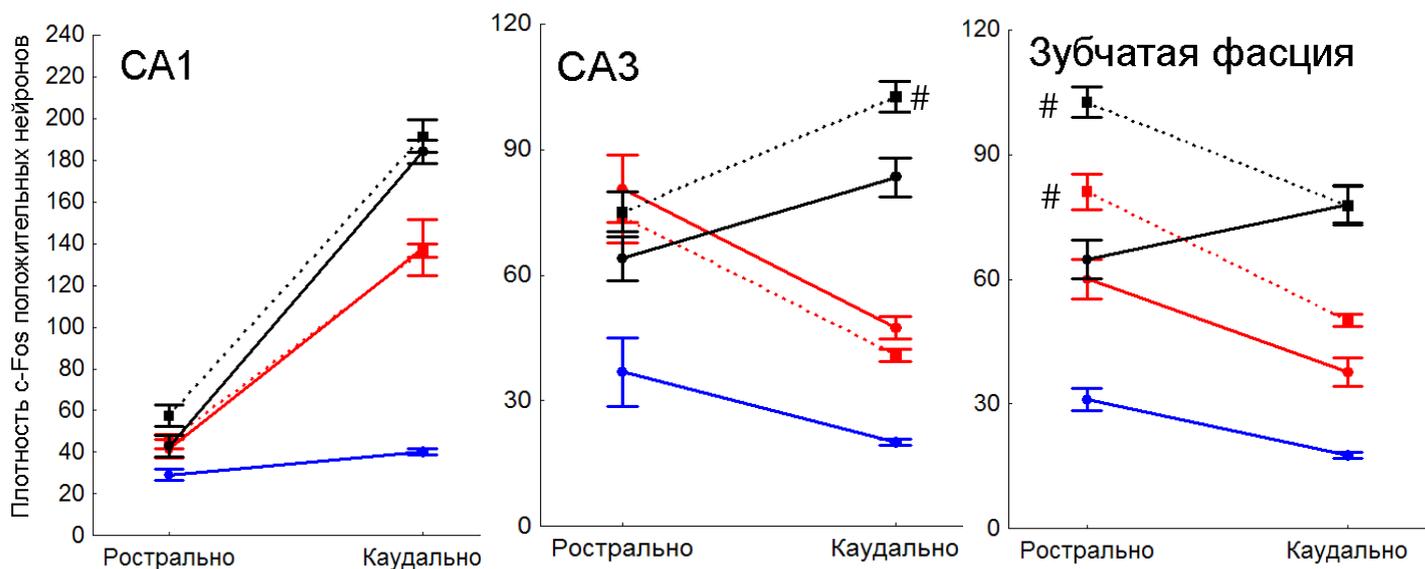


Рис. 10. Активация полей гиппокампа после второго высаживания мышей в арену открытого поля. Сравнение «220-220 см» с «75-220» см и сравнение «75-75 см» с «220-220 см»: # – $p < 0.05$; ## – $p < 0.01$. Пунктирными линиями обозначены показатели мышей, тестируемых в разные дни в разных аренах.

■ 220-220 см
 ■ 75-220 см
 ■ 75-75 см
 ■ 220-75 см
 ■ Пассивный контроль

арены. Так, операция уменьшала количество остановок в большой (оперированные: 63.0 ± 2.4 ; контрольные: 82.5 ± 3.7 ; $t=7.21$, $p<0.001$), но не в малой арене (86.3 ± 7.3 и 83.9 ± 7.0). Показатель кривизны пути так же был снижен в большой (оперированные: 83.7 ± 5.8 %/м; контрольные: 94.7 ± 4.2 %/м; $t=2.03$, $p<0.05$), но не в малой арене (73.5 ± 7.5 и 60.0 ± 7.2). Кроме того, только в арене большого диаметра удаление снижало тигмотаксис мышей. Анализ сегментов траектории показал, что удаление изменяло ее сегментную структуру (рис 7 А). Как и у полевок, возрастает доля сегментов, находящихся за границей 95-% перцентили ($U=11.7$, $p<0.05$). Сегменты со средней максимальной скоростью более 60 см/с становятся длиннее (рис. 7 Б), и вносят больший вклад в общую длину пути (оперированные: 14.2 ± 1.6 %; контрольные: 8.4 ± 1.8 %; $U=15.3$, $p<0.05$). Примеры траекторий мышей и полевок приведены на рис. 8.

Удаление каудальной части гиппокампа практически не сказалось на показателях тревожности в открытом поле. Однако оно нарушало проявление исследовательской активности животных, причем этот эффект был выражен преимущественно в арене большого диаметра.

Для того, чтобы оценить степень вовлеченности разных отделов гиппокампа при обследовании арен разного размера мы провели дополнительное исследование, где активацию полей CA1, CA3 и зубчатой фасции ростральной и каудальной области гиппокампа мышей оценивали по уровню экспрессии белка c-Fos.

Анализ активации каудальной и рострального гиппокампа.

Активацию рострального и каудального гиппокампа, исследовали у животных протестированных в контрольном эксперименте (см. выше). Из замороженных образцов мозга на криостате «Microm» приготавливали фронтальные срезы толщиной 20 мкм. Экспрессию гена *c-fos* определяли иммуногистохимически, авидин-биотин-пероксидазным методом с использованием первичных поликлональных кроличьих антител к белку c-Fos (AB-5, Calbiochem, США) и вторичных биотинилированных антител Vector laboratories Inc. (США). Границы полей CA1, CA3 и зубчатой фасции определяли по атласу (Franklin, Paxinos 1984). Обработку цифровых изображений проводили с помощью программы Image Pro ver. 3.00. Подсчет клеток проводили по всей площади структур. Анализ осуществляли на одном ростральном и одном каудальном уровне, каждый из которых оценивали по трем точкам. Точки рострального уровня соответствовали расстояниям от брегмы в 1.58, 1.64 и 1.7 мм, точки каудального уровня – -3.16, -3.28 и -3.4 мм от брегмы.

Результаты. Обследование незнакомой арены. Обнаружен высокий уровень экспрессии во всех полях как рострального, так и каудального гиппокампа (рис. 9). Активация гиппокампа зависела от размера арены, в которую было помещено животное, причем характер этой зависимости был разным в разных частях структуры. В каудальной области поля CA1 наибольшую экспрессию c-Fos наблюдали у мышей, осваивавших арену большого размера. При этом активация ростральной части гиппокампа была значительно ниже и практически не различалась у животных разных групп. В каудальной части поля CA3 и зубчатой фасции особенно высокая экспрессия наблюдалась у мышей, которых тестировали в самой большой арене (рис. 9). Значения экспрессии c-Fos у мышей других групп были сходными. Активация ростральной части поля CA3 и зубчатой фасции была одинаково высокой у всех групп мышей и не зависела от размеров пространства. Двухфакторный дисперсионный анализ (независимый фактор "размер арены" и повторяющееся измерение "уровень срезов") показал значимый эффект размера арены во всех трех полях гиппокампа (CA1: $F_{(3,70)}=7.5$, $p<0.01$; CA3: $F_{(3,70)}=6.6$, $p<0.01$; зубчатая фасция: $F_{(3,70)}=17.3$, $p<0.001$). Кроме того, во всех трех полях показан значимый эффект уровня срезов (CA1: $F_{(1,70)}=188.0$, $p<0.001$; CA3: $F_{(1,70)}=16.4$, $p<0.01$; зубчатая фасция: $F_{(1,70)}=11.6$, $p<0.01$). Поле CA1 было в большей степени активировано в каудальной части, а поле CA3 и зубчатая фасция – в ростральной части. Для полей CA1 и CA3 было кроме того показано значимое взаимодействие факторов «размер арены» и «уровень срезов»

(CA1: $F_{(3,1,70)}=9.5$, $p<0.01$; CA3: $F_{(3,1,70)}=7.4$, $p<0.05$). Таким образом дисперсионный анализ подтвердил, что каудальный и ростральный гиппокамп по-разному реагировали на размер арены открытого поля.

Повторное тестирование в арене того же или измененного размера.

Поведение мышей определялось главным образом размером той арены, в которой животное находилось в настоящий момент. Однако показатель количества стоек зависел также от того, в какой арене животное тестировалось накануне. Дисперсионный двухфакторный анализ количества стоек (факторы «смена арены», «размер арены») показал различия по взаимодействию факторов ($F_{(1,1,28)}=5.7$, $p<0.05$). Для группы мышей, которых тестировали по схеме «220-75 см», на второй день было показано большее число стоек, чем у мышей, осваивавших арену повторно. Для животных, осваивавших большую арену после знакомства с малой ареной, было характерно меньшее число стоек, чем для животных, исследующих ее во второй раз.

В поле CA1 (рис. 10) уровень активации был сходен с уровнем, показанным после однократного помещения в арену открытого поля. При этом активация не зависела от того, в какой арене мышей тестировали в первый день. В ростральной части поля CA1 у всех мышей наблюдали одинаковый уровень экспрессии. В каудальной части поля CA3 уровень активации определялся размерами арены: наибольшие значения наблюдались у мышей, которые осваивали арену большего диаметра. При этом у мышей, которые попадали в арену диаметром 220 см впервые уровень активации каудальной части поля CA3 был несколько выше, чем у мышей, которые оказывались в ней повторно. Ростральная часть поля CA3 была активирована сходным образом у мышей всех групп (рис. 10). Уровень активации каудальной части зубчатой фасции тоже зависел от размера пространства, и был выше у животных, которых тестировали в больших аренах. В ростральной части зубчатой фасции более высокие значения активации наблюдались у животных, которых на второй день тестировали в другой арене, по сравнению с животными, которых высаживали дважды в одну и ту же арену (рис. 10). Как и в первом случае, данные были проанализированы с помощью дисперсионного факторного анализа (фактор «размер арены», повторяющееся измерение «уровень срезов» и фактор «смена арены»). Эффект размера арены показан для всех трех исследуемых полей гиппокампа (CA1: $F_{(1,28)}=44.0$, $p<0.001$; CA3: $F_{(1,28)}=26.6$, $p<0.001$; зубчатая фасция: $F_{(1,28)}=56.4$, $p<0.001$). Эффект уровня срезов был значим для поля CA1 и зубчатой фасции (CA1: $F_{(1,28)}=721.6$, $p<0.001$; ЗФ: $F_{(1,28)}=26.8$, $p<0.001$). Взаимодействие этих двух факторов значимо также во всех трех полях (CA1: $F_{(1,1,28)}=25.8$, $p<0.001$; CA3: $F_{(1,1,28)}=50.6$, $p<0.001$; зубчатая фасция: $F_{(1,1,28)}=11.0$, $p<0.01$), что подтверждает описанное выше наблюдение: активация разных области гиппокампа по-разному зависит от размера пространства. Эффект смены арены показан только для зубчатой фасции ($F_{(1,28)}=31.9$, $p<0.001$), что также согласуется с приведенным выше описанием ее активации. Для зубчатой фасции показано также значимое взаимодействие факторов «уровень срезов» и «смена арены» ($F_{(1,1,28)}=13.8$, $p<0.001$). Действительно, на рис. 10 видно, что на смену арены реагировала главным образом ее ростральная часть.

Уровень активации каудальной, но не ростральной части гиппокампа зависел от размеров арены, в которой тестировали животное: наиболее сильно каудальный гиппокамп был активирован у мышей, осваивавших большую арену.

ОБСУЖДЕНИЕ

Влияния удаления каудальной области гиппокампа не было нами обнаружено ни в одном из тестов, предназначенных для оценки тревожности животных, что не согласуется с данными, полученными другими авторами на крысах (Kjelstrup et al., 2002, Bannerman et al., 2003; McHugh et al., 2004; Bannerman et al., 2004). В экспериментах с использованием методики «открытое поле» нами также не выявлены различия по большинству показателей, используемых для оценки тревожности животных. Отметим, однако, что мыши с удаленной каудальной частью гиппокампа имели сниженный уровень тигмотаксиса в большой арене, но это изменение может быть объяснено и с других позиций – например, как проявление гиперактивности, часто наблюдаемой у животных с обширным разрушением гиппокампа. Влияние удаления на показатели открытого поля, связанные с тревожностью, ранее не оценивалось. Возможно, выявленные другими исследователями изменения характеристик тревожности могут быть обусловлены видоспецифическими и линейными особенностями лабораторных крыс, но имеющих на данный момент фактов недостаточно для всесторонней интерпретации данного аспекта функций каудальной части гиппокампа.

«Открытое поле» является универсальным тестом и наряду с оценкой тревожности позволяет охарактеризовать исследовательское поведение животных. Авторы работ, посвященных каудальной части гиппокампа, как правило, не рассматривают его связи с исследовательским поведением. Между тем роль целого гиппокампа в контроле такого поведения давно активно обсуждается исследователями (Виноградова, 1975; O'Keefe, Nadel, 1978; Andersen et al., 2007).

Одним из показателей, характеризующих исследовательскую активность в открытом поле является число стоек на задних лапах (Walsh, Cummins, 1976; Мешкова, Федорович, 1996; Lever et al., 2006). На обоих видах грызунов нами показан сходный эффект удаления каудального гиппокампа: число стоек в открытом поле заметно понижается. Выраженность эффекта усиливается в больших аренах. В немногочисленных работах, выполненных с использованием методики открытого поля, оценивали только изменение горизонтальной активности (Bannerman et al., 2003), не регистрируя стойки животных. Результаты наших экспериментов указывают не только на снижение числа стоек при передвижении по арене, но также и на изменение характера активности, направленной на предметы. Продолжительность каждого отдельного посещения предметов была снижена, и такие посещения сопровождалось меньшим числом стоек. Таким образом, мы можем говорить скорее о нарушении организации нормального исследовательского поведения, в том числе и в ситуации, провоцирующей тревожность.

Проведение контрольного эксперимента с интактными мышами позволило разработать новые подходы к детальному анализу траектории с помощью современных методов регистрации и обработки треков. К сожалению, отсутствие подобных подходов у других авторов затрудняет обсуждение полученных нами данных. Обнаружены различия в количестве стоек без опоры на борт, изменение характера распределения траектории животных по пространству арены, а также особенности сегментных характеристик траектории в малых и больших аренах. Все это позволило предположить различия в организации исследовательской активности в аренах диаметром менее 75 см и более 150 см. Наблюдаемый комплекс изменений в характере передвижения животных при увеличении размера арены очевидно отражает адаптацию нормального исследовательского поведения животного к обширной неоднородной с точки зрения биологической значимости среде. Возможно, важными компонентами адаптации являются, в частности, увеличение числа стоек, неоднородности распределения активности по пространству арены и изменение сегментной структуры траектории: увеличение доли протяженных высокоскоростных сегментов.

Наши эксперименты впервые показали, что удаление каудальной области гиппокампа значительно нарушает характеристики поведения в больших аренах. Причем

изменены именно те компоненты поведения, которые, как мы предположили, отражают проявление адаптации исследовательской активности к обширному пространству. У оперированных животных в больших аренах не увеличивалось, как у контрольных количество стоек и нарушалась сегментная структура траектории. Из описанного эксперимента можно вывести следующее предположение. Возможно, обширная неоднородная по биологической значимости среда создает дополнительную нагрузку именно на каудальную часть гиппокампа. Дополнительное подтверждение этому предположению мы нашли, оценив активацию каудальной и роstralной части гиппокампа у мышей, которые тестировались в аренах разного диаметра.

Нами впервые показано, что именно каудальная часть гиппокампа реагирует на размер обследуемого животным открытого поля. Увеличение его размера ведет к повышению уровня активации c-Fos в каудальной области гиппокампа. Ранее в нашей лаборатории обнаружено, что уровень экспрессии в этой области определялся главным образом передвижением животного в пространстве, и не изменялся, в отличие от роstralной части, при добавлении новых дистантных зрительных стимулов и убежища на арене. (Купцов, 2006, Kuptsov, Pleskacheva, 2011). Это вполне согласуется с нашими данными: в больших аренах животные проходили большой путь, обследовали большее пространство, что, возможно, и привело к дополнительной активации каудального гиппокампа. В то же время эксперимент был поставлен так, что во всех аренах животным был доступен один и тот же объем зрительной информации, что может объяснить сходный уровень активации роstralного гиппокампа.

Большой отдельный интерес с точки зрения оценки функциональной специфики полей гиппокампа (не только каудального, но и роstralного) представляют данные, полученные нами во второй день эксперимента, когда одних мышей высаживали в арену иного размера, а других - в ту же арену, что и в первый день. Показано, что изменение размера арены влияет уровень активации поля СА3 и зубчатой фасции. был снижен по сравнению с теми мышами, для которых арены была незнакомой. Этот эффект нов и требует дальнейшего изучения. Однако полученные данные подтверждают и дополняют существующие представления (Schmidt, Marrone, Markus, 2012) о роли зубчатой фасции в процессах, обеспечивающих контрастирование, различения сходных событий (pattern separation). Отметим, что исследователи часто отмечают, что зубчатая фасция функционально обособлена, и функционирует не так, как поля аммонова рога (Touzani et al., 2003; Schrafman ed., 2007). С другой стороны, имеются сведения о функциональной специфике поля СА1 (напр., Lacy et al., 2011). Это согласуется с нашими данными. Нами впервые показано, что каудальные части полей СА3 и зубчатой фасции в большей степени реагируют на изменение размера арены, чем поле СА1. Это согласуется с представлениями О.С.Виноградовой, которая отводила полю СА3 ключевую роль в исполнении компараторной функции гиппокампа (Виноградова, 1976, Vinogradova, 2001). Мы можем заключить, что полученные нами данные согласуются с имеющимися в литературе представлениями о различиях функциях полей гиппокампа, подтверждают и расширяют их.

Нами не обнаружено нарушения реакции спонтанного чередования в Т-образном лабиринте при удалении каудальной области гиппокампа у мышей и полевок, что отчасти подтверждает данные других авторов, полученных на крысах, но с использованием модели подкрепляемого чередования (Bannerman et al., 2003). По мнению некоторых авторов, это методическое различие, не имеет существенного значения для оценки гиппокампальных функций (Deacon, Rawlins, 2006). Известно, что обширное удаление гиппокампа вызывает нарушение реакции спонтанного чередования у мышей (Deacon et al., 2002), крыс (Morris et al., 1982; Lalonde, 2002) и полевок (Pleskacheva et al., 2008). Такой же эффект оказывает удаление роstralного гиппокампа крыс (Hock, Bunsey, 1998; Bannerman et al., 1999; Bannerman et al., 2002). Таким образом, сохраненной части

рострального и среднего гиппокампа было достаточно для выполнения реакции чередования.

В нашем эксперименте контрольные полевки успешно обучились в водном тесте Морриса, что соответствует данным, полученным ранее (Pleskacheva et al., 2000). Удаление каудальной области гиппокампа замедляло обучение, полевки дольше, чем контрольные, искали платформу, пользуясь неоптимальным маршрутом. Сходный характер нарушений показан на крысах с полным удалением гиппокампа (Morris et al., 1982), хотя в этом случае ухудшение было значительнее. В тестовых попытках полевки с частичным удалением гиппокампа демонстрировали меньшую точность поиска платформы, тогда как у крыс с полным его удалением не наблюдали предпочтения квадранта, в котором ранее располагалась платформа. Полученные нами данные свидетельствуют об ухудшении пространственного обучения при удалении каудальной области гиппокампа, что не соответствует выводам авторов, не выявивших подобных нарушений у крыс с аналогичным частичным удалением (Moser et al., 1993; Moser et al., 1994; Bannerman et al., 1999; Richmond et al., 1999). Однако необходимо отметить, что в нашем эксперименте в тестовой попытке нарушения выявляются лишь при оценке поиска в ограниченной зоне вокруг платформы, а не по целому квадранту. Возможно, что такой подход выявил бы нарушения и у крыс. Нами выявлено ухудшение именно процессов пространственного обучения. В опыте, где положение платформы отмечалось флажком, не обнаружено нарушения поведения, что свидетельствует о сохранении мотивационных, сенсорных и моторных компонентов обучения. Наши данные подтверждают результаты других авторов, обнаруживших после удаления каудальной области гиппокампа крыс нарушения референтной (de Hoz et al., 2003; Loureiro et al., 2012) и рабочей пространственной памяти в водном тесте (Ferbinteanu et al., 2003; Bast et al., 2009).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Объяснение полученным данным можно дать, совместив имеющиеся в литературе данные о физиологии каудального гиппокампа с результатами настоящей работы. С одной стороны, известно, что каудальная часть гиппокампа участвует в регуляции эмоций, мотиваций и тревожного поведения (см. обзоры Bannerman et al., 2004, Morris, 2007). В нашей работе многие описываемые другими авторами эффекты воспроизведены не были, однако было обосновано предположение, что удаление каудальной части гиппокампа приводит к нарушению адаптации поведения к неоднородной по биологической значимости среде.

Разрушая каудальную область гиппокампа, мы разрушаем клетки места с большими рецептивными полями. Такие клетки, предположительно, обеспечивают кодирование информации о пространстве в низком разрешении (Kjelstrup et al., 2008; Moser et al., 2008) и, как предполагают авторы, могут участвовать в процессах кодирования информации о пространствах больших размеров. Кроме того, в каудальной части гиппокампа обнаружены нейроны, которые специфически активируются в областях пространства, имеющих определенную биологическую значимость – например, только в открытых рукавах радиального лабиринта или в местах, где располагается пищевое подкрепление (Royer et al., 2010).

Мы предполагаем, что каудальная часть гиппокампа участвует в создании пространственной карты обширного и неоднородного с точки зрения биологической значимости пространства. Удаление этой области гиппокампа может нарушать полноценное картирование, что, по-видимому, вызывает нарушение характера передвижения в пространстве, которое у интактных животных зависит от видеспецифических особенностей и индивидуального опыта животных. Такие нарушения могли оказать влияние и на скорость обучения в водном тесте Морриса. Кроме того, повреждение каудальной области ослабляет связи гиппокампа с префронтальной корой (Ferino et al., 1987), что может затруднить функционирование механизмов планирования траектории передвижения животного (см., например, Hok et al., 2007; Bast et al., 2009).

ВЫВОДЫ

1. При исследовании функций каудальной части гиппокампа с использованием батареи тестов показано, что удаление этой структуры нарушает поведение мышей и полевок при освоении новых арен и новых предметов, практически не влияя на показатели тревожности.
2. На степень выраженности нарушений, вызванных удалением, влиял размер пространства, в котором животное находилось во время эксперимента. Наибольший эффект выявлен в аренах большого размера и был сходен у двух видов грызунов.
3. Размеры экспериментального пространства влияли на уровень активации c-Fos в каудальной, но не в роstralной части гиппокампа мышей. Она была максимальной у животных, тестируемых в аренах наибольшего размера.
4. Влияние размеров пространства на активацию нейронов полей CA1, CA3 и зубчатой фасции различалось, что предполагает наличие функциональных особенностей полей каудальной области гиппокампа.
5. Удаление каудальной части гиппокампа ухудшало пространственное обучение в тесте Морриса, снижая точность поиска целевой платформы.
6. Предполагается участие каудальной области гиппокампа в освоения новой среды и пространственном обучении.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- Лебедев И.В., Плескачева М.Г., Анохин К.В. Анализ поведения мышей линии C57BL/6 в аренах открытого поля разных размеров. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 62(4):485–496. 2012. (рекоменд. ВАК)
- Лебедев И. В., Безряднов Д. В., Дикон Р. М. Д., Купцов П. А., Малыгин В. М., Плескачева М. Г. Влияние удаления каудальной части гиппокампа рыжих полевок *Clethrionomys glareolus* на обучение в водном тесте Морриса. Известия Российской Академии Наук, сер. Биологическая. Принята к печати. 2013. (рекоменд. ВАК)
- Плескачева М.Г., Лучкина О.С., Купцов П.А., Огурцов С.В., Лебедев И.В., Малыгин В.М. Методы оценки начальной ориентации и поведения на старте у мелких млекопитающих при ближнем хоминге. В сборнике Труды Звенигородской биологической станции. 5: 232–238. Издательство Московского университета Москва. 2011.
- Лебедев И.В., Безряднов Д.В., Купцов П.А., Дикон Р., Плескачева М.Г. Особенности нарушения пространственного обучения и исследовательской реакции при удалении каудального гиппокампа у рыжих полевок. Тезисы всерос. конф. с международным участием «Гиппокамп и память: норма и патология» Пушкино, Россия. 2009. С. 58.
- Лебедев И.В., Купцов П.А., Безряднов Д.В., Малыгин В.М., Дикон Р., Плескачева М.Г. Исследование поведения рыжих полевок (*Clethrionomys glareolus*) в тестах на тревожность и пространственную память. Тезисы II-й науч. конф. «Поведение и поведенческая экология млекопитающих». Черноголовка, Моск. обл., Научный центр РАН. 2009. С.8
- Лебедев И.В., Купцов П.А., Плескачева М.Г., Анохин К.В. Зависимость активации каудальной части гиппокампа от поведения мышей в аренах разного размера. XXI Съезд Физиол. общества им. И.П.Павлова. Тезисы докладов. М. – Калуга. 2010. С. 345.
- Lebedev I., Kuptsov P., Deacon R. & Pleskacheva M. Size matters: exploration of larger arenas is preferentially reduced by caudal hippocampal lesions in mice. Abstract of 8th World Congress of IBRO. № D302 Florence. 2011.
- Lebedev I., Kuptsov P., Deacon R., Pleskacheva M. & Anokhin K. Segment analysis of motion trajectories reveals subtle impairments of exploratory behaviour After Lesions Of Caudal Hippocampus In Mice And Voles. Abstract of 8th Forum of European Neurosciences. Barselona. FENS Abstract, Volume 6, p115.01, 2012.
- Pleskacheva M, Kuptsov P, Lebedev I, Bezriadnov D, Malygin V, Deacon R and Anokhin K (2009). Functional specificity of caudal hippocampus in exploratory behaviour and spatial learning in bank voles. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Conference Abstract: 41st European Brain and Behaviour Society Meeting. doi: 10.3389/conf.neuro.08.2009.09.260