

Aktywności przyśrodkowej kory czołowej szczura podczas treningu dyskryminacji węchowej - rejestracja pojedynczych komórek

Ewa Kublik^{1,2}, Susan J.Sara²

¹Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M.Nenckiego

²Neuromodulation, Neuronal Plasticity and Cognition, Université Pierre and Marie Curie, Paris, France

Streszczenie

Po sesji doświadczalnej podczas której szczur uczy się kierować właściwym zapachem by odnaleźć nagrodę pokarmową, w przyśrodkowej korze czołowej (*medial frontal cortex*, mFCx) następuje istotny wzrost ekspresji *c-fos* [6]. W celu poznania dynamiki aktywacji mFCx podczas wykonywania tego zadania konieczne było zastosowanie metod elektrofizjologicznych. Dzięki chronicznej implantacji elektrod osadzonych na mikromanipulatorach rejestrowaliśmy aktywność pojedynczych komórek mFCx podczas kolejnych faz sesji treningowej. Około 35% badanych neuronów zaangażowanych było w samo wykonanie zadania - ich aktywność wzrastała w czasie trwania kolejnych prób równoległe ze skróceniem latencji poprawnych odpowiedzi. W przypadku 40% komórek zaobserwowaliśmy toniczny wzrost częstości wyładowań w 2-3minutowych okresach międzypróbowych. Sądzymy, że populacja aktywna pomiędzy próbami może być częścią systemu pamięci przechowującą świeżo zdobyte informacje do wykorzystania w bliższej i dalszej przyszłości.

Badania prowadzone w ostatnich latach pokazały, że obszar przyśrodkowej kory czołowej szczura (eng. *medial frontal cortex*, mFCx) zaangażowany jest w powstawanie długotrwałych śladów pamięciowych. Zablokowanie fosforylacji ERK [3], syntezy białek [4] lub kinazy MAP [2] w tej właśnie okolicy uniemożliwia powstanie pamięci długotrwałej po treningu warunkowania awersyjnego [2] lub po ekstynkcji [4, 2]. Prawidłowe działanie mFCx wydaje się niezbędne także w przypadku treningu ze wzmocnieniem pozytywnym [1,7]. Szczury bardzo szybko uczą się kierować właściwym zapachem by odnaleźć ukryty pokarm. Po sesji składającej się z 3-5 takich prób obserwuje się istotnie wzmożoną ekspresję *c-fos* między innymi w okolicy mFCx [6], a infuzja blokerów receptora NMDA w tym rejonie mózgu wykonana

po sesji wywołuje deficyt pamięci obserwowany w teście wykonywanym po dwóch dniach [7]. Wyniki te potwierdzają, że neurony mFCx są zaangażowane w uczenie asocjacyjne jednak nie pozwalają na określenie dynamiki ich aktywacji w czasie lub po treningu. Aby zbadać w jakich momentach sesji doświadczalnej komórki są aktywne konieczne jest zastosowanie metod elektrofizjologicznych. W tym celu do przyśrodkowej kory czołowej 16 szczurów zaimplantowaliśmy mikroelektrody i rejestrowaliśmy aktywność pojedynczych komórek podczas wszystkich faz sesji doświadczalnej gdy szczur uczył się odnajdywać nagrodę na podstawie informacji węchowych.

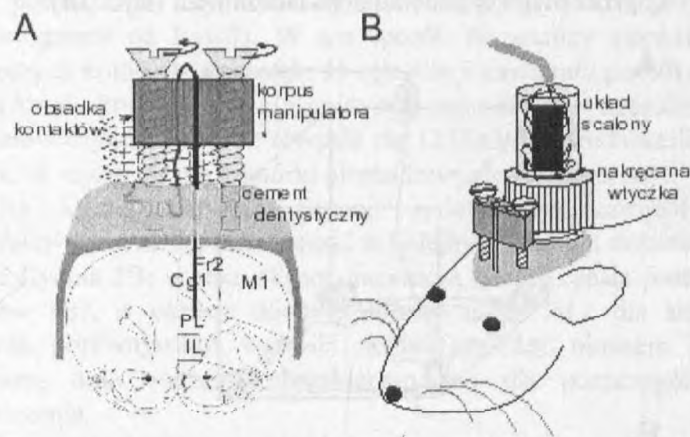
Metody

Doświadczenie przeprowadzono na dorosłych szczurach rasy Sprague-Dawley (Iffa Credo) ważących od 350 do 400g. Przed doświadczeniem przez kilka dni zwierzęta codziennie przyzwyczajano do przebywania w pomieszczeniu doświadczalnym, kontaktu z eksperymentatorem oraz zapoznano z przyszłą nagrodą pokarmowa (czekoladowe ryżowe chrupki śniadaniowe, Choco-Krispies, Kellogg).

Implantacja elektrod odbywała się w głębokim znieczuleniu ogólnym (Pentobarbital, 60mg/kg, roztwór 6%, zastrzyk dootrzewnowy). Elektrody (wolfram, FHC, 4M Ω) zamocowane na mikromanipulatorach wprowadzono do mózgu w okolicy przyśrodkowej kory czołowej (*prelimbic area, PL*, 3-4mm do przodu od Bregmy, 0.5-0.9 mm w bok od linii środkowej ciała) na głębokość około 2mm od powierzchni (Ryc.1). Kontakty elektrod mocowano w plastikowej gwintowanej obsadce (Plastics One). Całość przyklejano cementem dentystycznym a małe śrubki ze stali nierdzewnej wkręcone w kości służyły jako uziemienie i zapewniały mocne osadzenie całej konstrukcji na głowie szczura. Po operacji ranę przemywano środkiem antyseptycznym i miejscowym środkiem znieczulającym.

Sesja (Ryc.2) treningowa składała się z 7-12 prób w czasie których szczur uczył się odnajdować nagrodę pokarmowa. W narożnikach pudełka doświadczalnego (*PD*, 70x70x40cm, Ryc. 2A) umieszczano trzy prostokątne, nasączone trzema zapachami (miętowy, cytrynowy, migdałowy) gąbki (4x6x2,5cm) z wyciętymi w środku dziurami. W gąbce o zapachu migdałów ukryte były 2-3 peletki Choco-Krispies. Okresy między próbami (2-3 min) szczur spędzał w stojącym obok pudełku kontrolnym (*PK*, 20x20x35cm). W każdej kolejnej próbie zmieniano położenie gąbek w narożnikach *PD*. Za prawidłową odpowiedź behawioralną uznawano włożenie przez szczura pyska do właściwej gąbki (Ryc. 2B znacznik "p") i wyjęcie nagrody. Wsuniecie pyska do niewłaściwej gąbki traktowane było jako błąd ale nie przerywało trwania

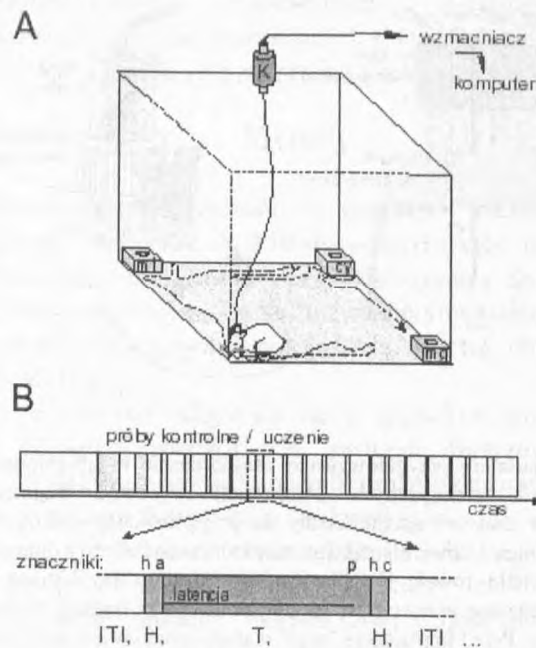
próby. Wyznacznikiem poziomu wyuczenia zadania było skrócenie czasu liczonego od momentu włożenia szczura do PD do momentu znalezienia przez niego nagrody (latencja odpowiedzi, Ryc.3A). W 12 przypadkach sesja treningowa poprzedzona była 3-6 próbami kontrolnymi w czasie których szczur eksplorował puste pudełko doświadczalne.



Ryc. 1. A. Mikromanipulatory przygotowywano własnoręcznie w laboratorium. Z plastikowej obsadki mikro-kontaktów elektrycznych (Amphenol) wycinano fragment (5x4x2.5mm) zawierający 4 kanały. W dwa zewnętrzne kanały tak przygotowanego korpusu wkręcano śruby (długość ok. 15mm, średnica 1.2mm, nierdzewna stal) którym uprzednio z dolnych 3 mm usuwano gwint i wycinano niewielki rowek. Do plastikowego korpusu przyklejano 1-2 elektrody a odchodzące od nich miedziane przewody w giętkiej silikonowej izolacji przeprowadzano przez środkowe kanały korpusu. Przed implantacją "nogi" manipulatora obficie pokrywano wazeliną, tak by po zamocowaniu ich cementem dentystycznym na czaszce szczura mogły się swobodnie obracać. Również trzony elektrod były natłuszczane a niewielkie odcinki ich przewodów pozostawały wolne (nie zalane cementem) aby elektrody mogły być w czasie późniejszego doświadczenia przesuwane w głąb mózgu. Śruby miały gwint o skoku równym 0.350, więc 1/8 obrotu w kierunku odwrotnym do wskazówek zegara przesuwała korpus manipulatora w dół o około 40-45µm. B. Kontakty elektrod umieszczone były w plastikowym gwintowanym cylindrze (Plastics One). Na czas rejestracji nakręcano na niego wtyczkę w której zainstalowany był układ scalony eliminujący zakłócenia. Drugi koniec kabla podłączało do komutatora (K) umieszczonego nad stanowiskiem doświadczalnym, a z niego sygnał przekazywany był do wzmacniacza i dalej do komputera.

Rejestracja sygnału. We wtyczce kabla odbierającego sygnał z kontaktów na głowie szczura znajdował się układ scalony (wzmacniacz operacyjny o wzmacnieniu 1) poprawiający jakość rejestrowanego sygnału (Ryc. 1B). Drugi koniec kabla połączony był z obrotowym przełącznikiem (komutator, Ryc 2A) zabezpieczającym go przed skręceniem i wyrwaniem. Z niego sygnał przesyłany był do wzmacniacza różnicowego (A-M Systems, wzmacnienie x10000, filtry

300-3000Hz). Do sterowania doświadczeniem oraz cyfrowania danych (częstość próbkowania 33kHz) służył przetwornik analogowo-cyfrowy (CED1401) oraz program Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Równoległe z sygnałem biologicznym, na oddzielnym kanale zapisywano znaczniki kodujące kolejne etapy sesji doświadczalnej oraz informacje o zachowaniu szczura i drodze przebytej przez niego w pudełku doświadczalnym (Ryc. 2B).



Ryc. 2. A. Pudełko doświadczalne (PD) z umieszczonymi w narożnikach gąbkami (*mi* – zapach mięty, *cy* – cytryny, *mg* – migdałów). Szczura sadzano w pustym narożniku PD (początek próby, znacznik "a"). Przykładowa trasa przebyta w poszukiwaniu nagrody zaznaczona przerywaną linią. K-komutator. B. Sesja składała się z 3-6 prób kontrolnych i 6-12 prób treningowych. Kolejne etapy sesji zapisywano na kanale ze znacznikami literowymi: a - początek próby, h - w ręku, p - znalezienie nagrody, c - początek okresu między próbami w pudełku kontrolnym. Na tej podstawie dzielono sesję na kolejne analizowane fragmenty (ITI - okres między próbami, T próba, H- okres w ręku eksperymentatora).

Bezpośrednio przed rozpoczęciem sesji elektrody zagłębiany w mózgu, aż w sygnale pojawiły się wyraźne potencjały czynnościowe. Elektroda na której nie stwierdzano aktywności komórkowej służyła jako referencja dla pozostałych kanałów. Sesja zaczynała się kilkuminutową rejestracją czynności spontanicznej w pudełku kontrolnym. W programie Spike, dla poszczególnych kanałów generowano wzorce potencjałów czynnościowych (tzw. *template matching*).

Rejestrację prowadzono w czasie trwania całej sesji doświadczalnej, we wszystkich jej kolejnych etapach (Ryc. 2B). W czasie późniejszej analizy z zarejestrowanych danych usuwano artefakty wynikające z ruchów zwierzęcia i powtarzano procedurę *template matching*. Aby separacja pojedynczych komórek (*single unit activity, SU*) uznana była za poprawną, w czasie całej sesji odstęp między potencjałami czynnościowymi nie mogły być krótsze niż 2ms (por. autokorelogramy na Ryc.3). W ten sposób do analizy zakwalifikowano 20 pojedynczych komórek. Pozostałe 15 rejestracji zawierały po kilka nie dających się odróżnić komórek (*multi-unit activity, MUA*). Szerokość podstawy potencjałów czynnościowych równała się $1276 \pm 30 \mu\text{s}$ (średnia \pm SEM, 20SU) co sugeruje, że rejestrowano komórki piramidowe nie interneurony.

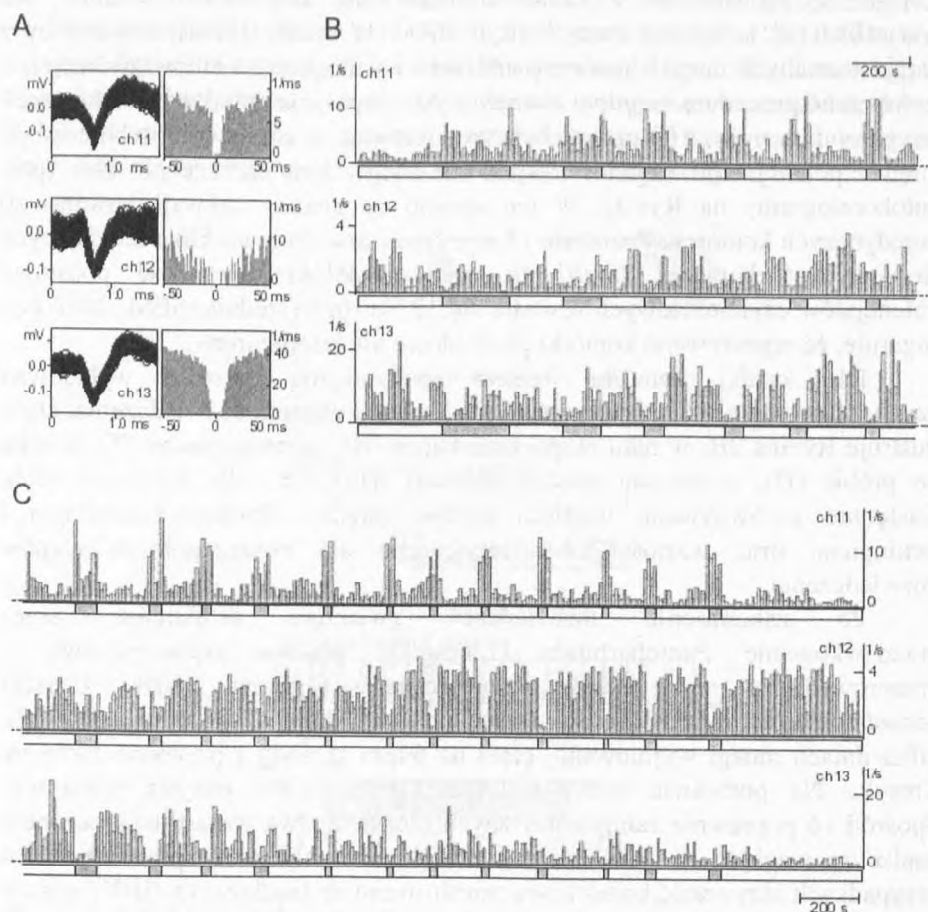
Dla każdej komórki liczono spontaniczną częstość wyładowań czynnościowych a następnie częstość w kolejnych etapach doświadczenia, które ilustruje Rycina 2B: w ręku eksperymentatora (H), w czasie próby (T), w ręku po próbie (H), w okresie między próbami (ITI), itd... dla kolejnych prób. Następnie porównywano wartości średnie między okresem kontrolnym i treningiem, oraz wartości charakterystyczne dla poszczególnych etapów doświadczenia.

Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta uśmiercano przez przedawkowanie Pentobarbitalu (150mg/kg, podanie dootrzewnowe) i przeprowadzano perfuzję solą fizjologiczną i formaliną (10%). Czaszki pozostawiano w formalinie aby dobrze utrwalić ślady elektrod w mózgu. Po kilku dniach mózgi wyjmowano, cięto na 60 μm skrawki i barwiono Fioletem Cresylu. Na podstawie oceny histologicznej oceniano miejsca rejestracji. Spośród 16 poprawnie zaimplantowanych szczurów dwa zostały wykluczone z analiz ze względu na lokalizację elektrod poza mFCx. W pozostałych 14 przypadkach aktywność komórkową rejestrowano ze środkowych (II-V) warstw kory w okolicy prelimbicznej (*prelimbic cortex, PL*).

Wyniki

Spontaniczna częstość wyładowań zbadanej grupy komórek wynosiła $1.87 \pm 0.41 \text{ Hz}$ (średnia \pm SEM, n=20). W kontrolnej części sesji nie różniła się ona istotnie od poziomu spontanicznego, natomiast w czasie procedury uczenia wzrastała średnio do $3.66 \pm 0.26 \text{ Hz}$ ($p=0.0053$, dwustronny t-test). W rejestracjach MUA również zaobserwowano wzrost częstości iglic w części treningowej w stosunku do kontroli (odpowiednio $5.98 \text{ Hz} \pm 0.26 \text{ Hz}$ i $4.97 \text{ Hz} \pm 0.31 \text{ Hz}$, n=15, $p=0.012$).

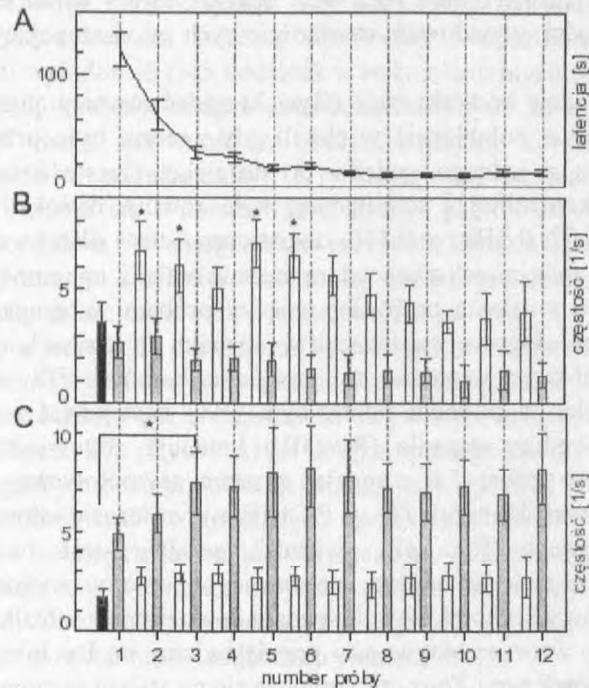
Aktywność 80% zarejestrowanych komórek była modulowana (w różny sposób) w kolejnych etapach sesji. Ilustruje to przykładowy zapis z jednoczesną



Ryc. 3. Zapis sesji szczura R27. **A.** Nalożone pojedyncze potencjały czynnościowe i autokorelogram dla trzech zarejestrowanych jednocześnie komórek (*ch11*, *ch12*, *ch13*). Częstość wyładowań (bin = 10s) komórek w części kontrolnej (**B**, sześć prób) i w części doświadczalnej (**C**, 12 prób). Białoszary pasek poniżej wykresów częstości wskazuje kolejne etapy sesji doświadczalnej: białe pola - okres przed i między próbami spędzany przed zwierzę w pudełku kontrolnym; szare pola - okres poza pudełkiem kontrolnym - czyli czas próby i kilka sekund w ręku eksperymentatora przed i po próbie. Wysokie biny na początku i końcu każdej próby komórki *ch11* odpowiadają pobudzeniu jej w czasie przekładania szczura między pudełkami.

rejestracją aktywności dwóch komórek (*ch11* i *ch12*) z jednej elektrody w lewej półkuli mózgu i trzeciej komórki (*ch13*) z drugiej elektrody w przeciwległej półkuli (Ryc. 3). Częstość wyładowań neuronu *ch11* była znacznie wyższa podczas prób niż w 2-3minutowych okresach pomiędzy próbami. Odwrotnie, częstość wyładowań komórki *ch12* wyższa między próbami niż w czasie prób, a

w trakcie sesji uczenia ta dysproporcja nasiliła się. Komórka *ch13* również charakteryzowała się wyższą częstością w czasie gdy zwierze przebywało w pudełku kontrolnym, ale w sesji treningowej jej aktywność powoli malała.



Ryc. 4. A. Średnia latencja odpowiedzi behawioralnej ($n=16$ szczurów, \pm SEM). B - średnia częstość wyładowań komórek charakteryzujących się wyższą aktywnością w okresie między próbami (typ *ITI*, $n=8$). C - średnia częstość wyładowań komórek z wyższą aktywnością w czasie prób (typ *Tbox*, $n=7$). B i C białe słupki - poziom aktywności w okresie między próbami; szare - poziom aktywności w czasie prób, czarny - poziom kontrolny (średnia \pm SEM, bin=1s). B. W grupie komórek *ITI* częstość wyładowań wzrasta gwałtownie po pierwszej próbie, a następnie po raz drugi po próbie czwartej (gwiazdki oznaczają okresy gdy częstość jest istotnie wyższa od poziomem kontrolnego, $p<0.05$, t-test). W tym samym czasie (pomiędzy pierwszą a piątą próbą) latencja odpowiedzi istotnie spada by osiągnąć asymptotyczny poziom. C. Grupa komórek *Tbox* od początku sesji charakteryzowała się znacznie wyższą aktywnością w czasie prób niż w okresie między próbami ($p<0.01$). Aktywność w pudełku doświadczalnym jeszcze wzrastała w kolejnych próbach treningowych (istotna różnica osiągnięta w trzeciej próbie, $p<0.05$) natomiast częstość wyładowań w czasie między próbami nie uległa zmianie w trakcie sesji.

Praktycznie każda komórka miała swój własny specyficzny wzorzec zachowania, jednak ze względu na małą liczebność zarejestrowanej populacji (20) poniżej opisano tylko efekty typowe dla większej grupy zarejestrowanych neuronów. Pokazane na Rycinie 3 przykłady ilustrują dwa dominujące typy

aktywności. Osiem komórek wykazywało wzmożoną aktywność w okresach między próbami - w pudełku kontrolnym (grupa *ITI*, Ryc.4B) natomiast siedem innych wykazywało znacznie wyższą aktywność w trakcie prób w pudełku doświadczalnym (grupa *Tbox*, Ryc. 4C). Jedynie cztery komórki w ogóle nie zmieniały częstości wyładowań czynnościowych w następujących po sobie etapach sesji.

Na przykładzie komórki *ch11* (Ryc. 3) widać również charakterystyczne dla typu *Tbox* silne pobudzenie w chwili gdy zwierze było przekładane ręką eksperymentatora z jednego pudełka do drugiego. Częstość wyładowań "w rękę" w sesji kontrolnej i treningowej była równie wysoka (odpowiednio $6.08 \pm 0.68\text{Hz}$ i $5.07 \pm 0.3\text{Hz}$, $p=0.176$, dwustronny t-test) dlatego wydaje się, że był to wyraz nie związanych z procedurą uczenia reakcji, np. emocjonalnych.

Aktywność w czasie próby i pomiędzy próbami w grupach *ITI* i *Tbox* zmieniała się w treningowej części sesji w stosunku do okresu kontrolnego. Jest to szczególnie dobrze widoczne w przypadku komórek *ITI* gdzie wyraźny wzrost aktywności w pudełku kontrolnym (*PK*) następował natychmiast po rozpoczęciu procedury uczenia (Ryc.4B). Latencja odpowiedzi spadała od drugiej próby, w próbie 5-6 osiągając poziom asymptotyczny (Ryc. 4A) a częstość wyładowań komórek *ITI* w *PK* była w tym czasie istotnie wyższa od poziomu kontrolnego (Ryc. 4B, gwiazdki, $p<0.05$, t-test dwustronny). Po osiągnięciu przez zwierze stałego, poprawnego poziomu wykonania zadania aktywność tej grupy komórek powoli spadała do poziomu kontrolnego.

Odmienny wzorzec aktywności przedstawiamy na Rycinie 4C. Częstość wyładowań komórek typu *Tbox* utrzymywała się na stałym poziomie w okresach między-próbowych a rosła w trakcie prób, w czasie gdy zwierze eksplorowało pudełko doświadczalne szukając nagrody. Częstość wyładowań osiągała poziom istotnie różny od kontroli w trzeciej próbie (Ryc. 4C, gwiazdka), a tendencja wzrostowa w czasie sesji korelowała ze spadkiem latencji odpowiedzi behawioralnej ($R=-0.87$, $p=0.002$).

Histologiczna weryfikacja danych nie wykazała żadnej systematycznej różnicy w lokalizacji opisanych populacji komórek w mFCx.

Wnioski

Wzrost częstości wyładowań większości przebadanych neuronów (*SU* i *MUA*) w okolicy *PL* przyśrodkowej kory czołowej w czasie sesji treningowej, potwierdza wnioski płynące z poprzednich doświadczeń w których stwierdzono podwyższoną ekspresję *c-fos* po podobnym treningu [6]. Dzięki analizie aktywności pojedynczych neuronów rejestrowanych w czasie trwania całej procedury doświadczalnej udało nam się opisać różne populacje komórek

charakteryzujące się odmienną dynamiką wyładowań w czasie sesji. Nasze wyniki pokazują, że w mFCx znajdują się rozproszone populacje komórek w różny sposób zaangażowanych podczas różnych etapów sesji doświadczalnej. Część komórek (typ *Tbox*) wydaje się być zaangażowana w czynności podejmowane przez szczura podczas eksploracji i poszukiwania nagrody. Wzrost częstości wyładowań tych komórek w trakcie kolejnych prób towarzyszy skróceniu latencji poprawnych odpowiedzi behawioralnych. Inna grupa komórek znacznie nasila swoją aktywność w okresach między kolejnymi próbami. Wydaje się, że to ta populacja (typ *ITI*) może mieć istotne znaczenie dla mechanizmów uczenia się i powstawania śladów pamięciowych. Podawanie blokerów syntezy białka lub antagonistów receptora NMDA do kory w okolicy mFCx po zakończeniu sesji doświadczalnej działa pro-amnestycznie [1,7]. Należy sobie uświadomić, że czas bezpośrednio po sesji w doświadczeniu składającym się z jednej [1] lub pięciu [7] prób jest tożsamy z pierwszym lub piątym okresem międzypróbowym w przypadku większej ilości powtórzeń - jak w naszym doświadczeniu gdzie maksimum aktywności komórek *ITI* przypada właśnie po próbach 1-5 (Ryc. 4AB). W tym początkowym etapie uczenia odnalezienie nagrody mocno pobudza układ dopaminergiczny [5]. Silne toniczne pobudzenie komórek mFCx (opisanych przez nas jako *ITI*) w czasie następującym po kolejnych próbach w krytycznym okresie uczenia może być niezbędnym elementem wyzwalanych pod wpływem dopaminy mechanizmów utrzymujących świeżo zdobyte informacje (asocjacje) w pamięci operacyjnej i prowadzących do powstania trwałego śladu pamięciowego.

Piśmiennictwo

1. Akirav I., and Maroun M. (2006) Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex*, in press
2. Hugues S., Deschaux O., Garcia R. (2004) Postextinction infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairs memory of the extinction of conditioned fear. *Learn. Mem.* 11: 540-543
3. Runyan J.D., Dash P.K. (2004) Intra-medial prefrontal administration of SCH-23390 attenuates ERK phosphorylation and long-term memory for trace fear conditioning in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82: 65-70.
4. Santini E., Ge H., Ren K., Peña de Ortiz S., Quirk G.J. (2004) Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 24: 5704-5710.
5. Schultz W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 191-197.
6. Tronel S., Sara S.J. (2003) Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J. Neurosci.* 23: 5472-5476.

7. Tronel S., Sara S.J. (2002) Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn. Mem.* 9: 105-111.

Adres do korespondencji:

Ewa Kublik

Zakład Neurofizjologii

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M.Nenckiego

ul. Pasteura 3

02-093 Warszawa

tel (48 22) 589 24 20

e-mail e.kublik@nencki.gov.pl