

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ВОЗБУЖДАЮЩИХ И ТОРМОЗНЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА ПРИ ИЗВЛЕЧЕНИИ АССОЦИАТИВНОЙ ОБСТАНОВОЧНОЙ ПАМЯТИ

© 2024 г. К. А. Торопова^{1, 2, *}, О. И. Ивашкина^{1, 2}, Н. С. Воробьева¹, К. В. Анохин^{1, 2}

¹Институт перспективных исследований мозга, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Лаборатория нейронного интеллекта, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

* e-mail: xen.alexander@gmail.com

Поступила в редакцию 02.11.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

В настоящей работе проведен анализ дифференциального вовлечения интернейронов и пирамидных нейронов различных областей гиппокампа в извлечение ассоциативной аверсивной памяти об обстановке. Для этого была использована модель ассоциативного обучения мышей, в которой формирование памяти о нейтральной обстановке и последующая ассоциация кратковременного предъявления этой обстановки с безусловным стимулом – электрокожным раздражением (ЭКР) – были значительно разнесены во времени. Активацию нейронов различных областей гиппокампа при извлечении сформированной таким образом ассоциативной обстановочной памяти исследовали с помощью иммуногистохимической детекции белкового продукта немедленного раннего гена *c-fos*. Извлечение ассоциативной памяти об обстановке сопровождалось увеличением количества *c-Fos*-положительных клеток в области CA1, но не в области CA3 и зубчатой фации гиппокампа. Далее для специфического выявления возбуждающих нейронов использовали белковый маркер – продукт гомеобокс-содержащего гена *Emx1*, а для специфического выявления тормозных нейронов – маркер глутамат декарбоксилазы, GAD, продукт генов *GAD1* и *GAD2*. По результатам двойного окрашивания на клеточные маркеры и белок *c-Fos* было показано, что при извлечении ассоциативной аверсивной памяти об обстановке в области CA1 гиппокампа активировались как положительные по маркеру *Emx1* возбуждающие нейроны, так и, в несколько меньшей степени, тормозные интернейроны, положительные по маркеру GAD. При этом, независимо от типа поведенческого воздействия (извлечение ассоциативной памяти об обстановке, неассоциативной памяти об обстановке или обследование обстановки, сочетавшейся с ЭКР, но не запомненной животными), пропорция активированных возбуждающих и тормозных нейронов оставалась постоянной, изменялось только количество активированных клеток каждого типа. Полученные результаты свидетельствуют о специфическом участии нейронов области CA1 гиппокампа в ассоциативной обстановочной памяти, а также демонстрируют, что в кодировании такой памяти участвуют как возбуждающие, так и тормозные нейроны.

Ключевые слова: ассоциативная память, извлечение памяти, условно-рефлекторное замирание, гиппокамп, *c-fos*, возбуждающие нейроны, тормозные интернейроны

DOI: 10.31857/S0044467724020034

ВВЕДЕНИЕ

Гиппокамп – структура головного мозга, играющая важную роль как в процессах формирования эпизодической памяти и памяти об обстановке (Eichenbaum, 2018; Takahashi, 2018; Lee, 2023), так и при условно-рефлекторном обучении и формировании ассоциативной памяти (Takamiya et al., 2021). То, каким образом эти разные типы памяти кодируются клеточными сетями гиппокампа, является актуальной нерешенной проблемой, служащей объектом современных нейрофизиологических исследований. Один из способов приблизиться к изучению

данного вопроса – использовать экспериментальную модель, позволяющую отдельно оценивать вовлечение нейронов гиппокампа в обстановочный и ассоциативный компонент таких традиционных гиппокамп-зависимых форм обучения, как выработка реакции условно-рефлекторного замирания (УРЗ) на обстановку (Curzon et al., 2009). В классической модели обучения УРЗ условный стимул (УС) и безусловный стимул (БС) предъявляются друг за другом или разделены кратким (до 5 сек) промежутком времени (Wotjak, 2019). В настоящей работе мы использовали модель ассоциативного обучения у мышей, в которой формирование памяти об обстановке

и ее последующая ассоциация с аверсивным стимулом (электрокожное раздражение лап, ЭКР) были разнесены во времени на трое суток так, что ассоциации подвергался фактически долговременный след предварительно сформированной памяти, извлекаемый кратким напоминанием в момент обусловливания (Воробьева и др., 2016; Торопова и др., 2018; Pinizzotto et al., 2020; Heroux et al., 2021; Zhu et al., 2022). Главным достоинством данной модели обучения является то, что она дает возможность изучать клеточные механизмы формирования нейтральной памяти об обстановке (УС), имеющей неассоциативный характер, и ее последующего ассоциирования с ЭКР (БС), поскольку эти события существенно разнесены во времени.

Ранее было обнаружено, что разрушение, временная инактивация, блокада синтеза белка или синаптической передачи в гиппокампе приводит к нарушению процессов формирования ассоциативной памяти об обстановке в задаче УРЗ при разнесении времени предъявления обстановки и нанесения ЭКР (Barrientos et al., 2002; Rudy et al., 2002; Matus-Amat et al., 2004; 2007). Таким образом, гиппокамп является критической структурой, необходимой для обучения и формирования памяти в такой модификации задачи УРЗ. Кроме этого, ранее нами была выявлена специфическая активация клеток области СА1 (но не области СА3 и зубчатой фасции) гиппокампа при формировании ассоциативной памяти об обстановке в данной модели (Торопова и др., 2018). Была также установлена необходимость электрической активности клеток гиппокампа для извлечения такого ассоциативного следа (Rudy, O'Reilly, 2001; Matus-Amat et al., 2004).

Известно, что нейроны гиппокампа делятся на две основные субпопуляции: возбуждающие нейроны (пирамидные клетки) и локальные тормозные интернейроны (Buhl, Whittington, 2006; Ramírez-Franco et al., 2016). Хотя интернейроны представляют собой гетерогенную популяцию, характеризующуюся различными биохимическими маркерами, такими как кальций-связывающие белки или нейропептиды, большинство из них содержат ингибирующий нейромедиатор γ -аминомасляную кислоту (ГАМК). В гиппокампе ГАМКергические интернейроны широко распространены в областях СА1 и СА3, а также в зубчатой фасции, и играют важную роль в регуляции активности как возбуждающих нейронов, так и других тормозных интернейронов, а также участвуют в формировании памяти (Topolnik,

Tamboli, 2022; Tzilivaki et al., 2023). Тем не менее до сих пор остается неизученным, какие именно нейроны гиппокампа участвуют в формировании и извлечении ассоциативной памяти об обстановке в рассмотренной выше задаче.

В связи с этим **целью** настоящей работы было изучить дифференциальное вовлечение пирамидных нейронов и интернейронов в активность различных областей гиппокампа мышей при извлечении сформированной ранее аверсивной ассоциативной памяти об обстановке. Для этого нами был использован подход, основанный на сочетании выявления клеток, активированных извлечением памяти, по накоплению в них белкового продукта немедленного раннего гена *c-fos* и маркирования пирамидных клеток и интернейронов гиппокампа по экспрессии в них генов *Emx1* и *GAD1/2*. Экспрессия немедленных ранних генов, таких как *c-fos*, *egr-1* и *Arc*, быстро и избирательно активируется в тех нейронах и областях мозга, которые вовлекаются в обучение и формирование памяти. Поэтому экспрессия немедленных ранних генов широко используется в качестве молекулярного маркера популяций нейронов, которые претерпевают пластические изменения, лежащие в основе формирования долговременной памяти (Nambu et al., 2022). Гомеобокс-содержащий ген *Emx1* специфически экспрессируется в возбуждающих пирамидных клетках, являясь одним из клеточных маркеров этого типа нейронов (Chan et al., 2001). Гены *GAD1* и *GAD2* кодируют две изоформы глутаматдекарбоксилазы (*GAD65* и *GAD67*), которые экспрессируются в нейронах и различаются компартментализацией в клетках. Глутаматдекарбоксилаза катализирует превращение глутамата в ГАМК в ГАМКергических нейронах и может служить клеточным маркером всех подтипов интернейронов в гиппокампе (Houser et al., 2007).

МЕТОДИКА

Животные

В экспериментах использовали 15 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 14–18 недель (питомник “Столбовая”). Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках по 5 особей со свободным доступом к воде и пище при световом цикле 12/12 ч. Экспериментальные процедуры проводили в светлой фазе цикла (с 10:00 до 17:00). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных

были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике МГУ им. М.В. Ломоносова (Заявка № 148-а, одобренная на заседании Комиссии № 151-d от 20.04.2023).

Формирование и извлечение памяти об обстановке в задаче УРЗ

Схема эксперимента представлена на рис. 1 (а). Процедура обучения УРЗ на обстановку состояла из двух этапов: на первом этапе мышам давали свободно обследовать новую для них обстановку, а затем через 3 дня животным наносили немедленное ЭКР в той же обстановке. Через 1 день после нанесения немедленного ЭКР животных помещали в обстановку обучения для тестирования ассоциативной памяти. Все процедуры проводили в установке Video Fear Conditioning System (MED Associates Inc.) с использованием программы Video Freeze v2.5.5.0 (MED Associates Inc.) Обстановка обучения представляла собой камеру размером 20 × 30 × 20 см с тремя непрозрачными пластиковыми стенками, одной прозрачной пластиковой стенкой и электродным полом из стальных стержней. Над экспериментальной ка-

мерой находился источник диффузного белого света (средний уровень освещенности в камере 87 люкс) и источник постоянного шума (средний уровень громкости 25 дБ). Перед помещением каждого животного камеру протирали 40%-ным раствором этилового спирта. Общее время обследования обстановки на первом этапе обучения составляло 5 мин, после этого мышей возвращали в домашнюю клетку. При нанесении немедленного ЭКР животных помещали в ту же обстановку и немедленно наносили ЭКР силой 1 мА длительностью 2 сек, после чего сразу же возвращали в домашнюю клетку. Общая длительность процедуры нанесения немедленного ЭКР составляла 5–7 сек. Тестирование памяти об обстановке проводили в течение 3 мин (Воробьева и др., 2016; Торопова и др., 2018).

В эксперименте использовали три группы животных:

– группа “Обучение” ($n = 5$) – животные, которые формировали ассоциативную память об обстановке: проходили и предварительное обследование обстановки, и нанесение немедленного ЭКР в ней;

– группа “ЭКР” ($n = 5$) – животные, которые не формировали ассоциативную память об об-

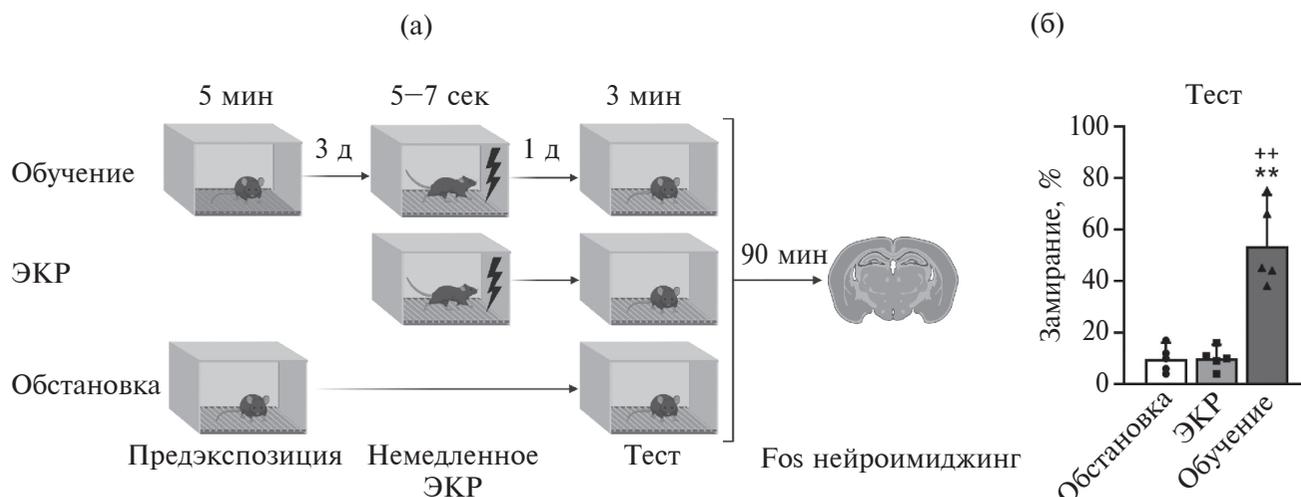


Рис. 1. Схема эксперимента (а) и данные о поведении мышей трех групп при тестировании ассоциативной памяти об обстановке (б). Предэкспозиция – предварительное неподкрепляемое обследование новой обстановки, Немедленное ЭКР – нанесение немедленного ЭКР в ранее обследованной обстановке, Тест – тестирование памяти об обстановке. ** – $p = 0.008$ по сравнению с группой “Обстановка”, ++ – $p = 0.007$ по сравнению с группой “ЭКР”, апостериорный критерий Тамхейна T2.

Fig. 1. The scheme of the experiment (a) and the behavior of three groups of mice during context associative memory test (b). Experimental procedures: Preexposure – preliminary unreinforced exploration of a new context, Immediate shock – immediate footshock in a previously explored context, Memory test – context associative memory test. ** – $p = 0.008$ compared to the Context group, ++ – $p = 0.007$ compared to the Footshock group, Tamhane’s T2 multiple comparisons test.

становке и получали только немедленное ЭКР, без предварительного обследования обстановки;

– группа “Обстановка” ($n = 5$) – животные, которые формировали неассоциативную память об обстановке: проходили только предварительное обследование обстановки, но не получали немедленное ЭКР в ней.

При предварительном обследовании обстановки и тестировании памяти проводили видеорегистрацию поведения мышей и автоматически определяли количество и продолжительность актов замирания. Замиранием считали полное отсутствие любых движений мыши, кроме дыхательных. Автоматическое выделение актов замирания осуществляли на основании следующих порогов: максимальное количество пикселей, измененных в данном кадре относительно предыдущего – 15 (при частоте оцифровки изображения 30 кадров в секунду и разрешении 320×240 пикселей); минимальная длительность иммобилизации – 0.5 сек. Для оценки ассоциативной памяти определяли процент времени замирания животных при тестировании.

Оценка паттернов экспрессии *c-Fos* в гиппокампе

Через 90 мин после тестирования животных умерщвляли путем транспозиции шейных по-

звонков. Мозг мышей извлекали и замораживали в парах жидкого азота. Срезы толщиной 20 мкм получали на криостате (Leica CM1950, Leica Microsystems, Германия). Координаты срезов определяли с помощью стереотаксического атласа мозга мыши (для области гиппокампа – 1.74 мм от уровня Брегмы) (Franklin, Paxinos, 2007). В анализ брали по три среза с одного уровня. Проводили иммуногистохимическое окрашивание для выявления белка *c-Fos*, а также для определения типов нейронов: возбуждающих (по маркеру *Emx1*) и тормозных интернейронов (по маркеру *GAD*). Для этого срезы головного мозга промывали в растворе 1xPBS и затем инкубировали в блокирующем растворе (10% NGS, 1% BSA и 0.2% Triton X-100 в PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в 0.2%-ном растворе TBS в течение ночи при 4 °С, промывали в PBS 4 × 5 мин и 2 ч инкубировали со вторичными антителами при комнатной температуре, промывая затем 4 × 5 мин в PBS. Использовали следующие первичные антитела: антитела козы против белка *c-Fos* goat anti-*c-Fos* (sc-52-G) (Santa Cruz Biotechnologies, разведение 1:500), антитела кролика против белка *GAD* rabbit anti-*GAD65/67* (Sigma-Aldrich, разведение 1:500), антитела кролика против *Emx1* anti-*EMX1* (H-50) (Santa Cruz Biotechnologies, разведение 1:100). Для визуализации использовали вторичные ан-

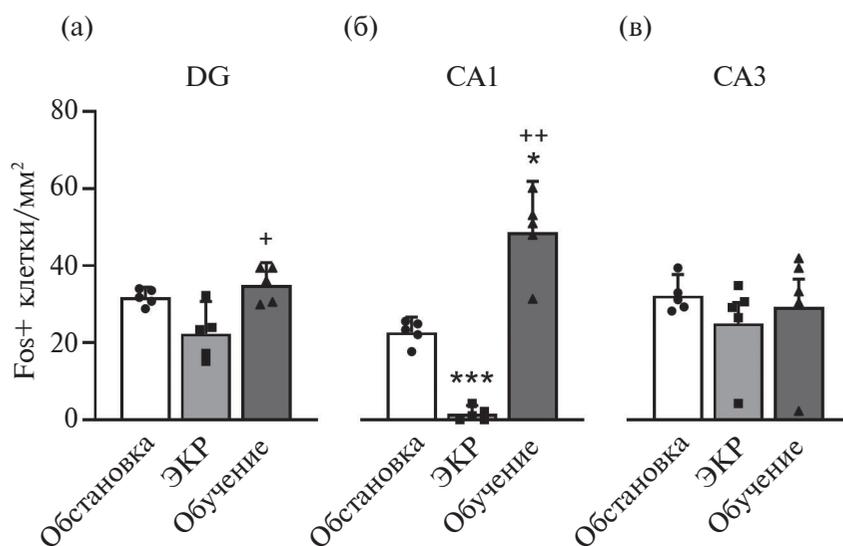


Рис. 2. Активность различных областей гиппокампа мышей при извлечении памяти об обстановке. (а) зубчатая фасция (DG), (б) область CA1, (в) область CA3. * – $p = 0.01$, *** – $p < 0.0001$ по сравнению с группой “Обстановка”, + – $p = 0.03$, ++ – $p = 0.002$ по сравнению с группой “ЭКР”, апостериорный критерий Тамхейна T2.

Fig. 2. Activity of three hippocampal regions during context memory retrieval. (a) dentate gyrus (DG), (б) CA1 region, (c) CA3 region. * – $p = 0.01$, *** – $p < 0.0001$ compared to the Context group, + – $p = 0.03$, ++ – $p = 0.002$ compared to the Footshock group, Tamhane’s T2 multiple comparisons test.

титела осли против белков козы donkey anti-goat, конъюгированные с зеленым флуоресцентным красителем (AlexaFluor 488, Invitrogen, разведение 1:500) и вторичные антитела осли против белков кролика donkey anti-rabbit, конъюгированные с красным флуоресцентным красителем (AlexaFluor 568, Invitrogen, разведение 1:500). После окончания окрашивания срезы помещали под покровное стекло, используя водную монтирующую гистологическую среду Fluoromount™ (Sigma-Aldrich). Изображения получали с помощью лазерного конфокального спиннинг-диск-микроскопа Andor Revolution WD (Andor) и проводили последующую постобработку в программе Imaris 7.4.2 (Bitplane). Далее в программе Imaris 7.4.2 (Bitplane) проводили подсчет колокализаций белка c-Fos и клеточных маркеров Emx1 и GAD в гранулярных слоях зон CA1, CA3 и зубчатой фасции гиппокампа. Для двойных положительных клеток (Fos^+Emx1^+ и Fos^+GAD^+) рассчитывали их долю относительно общего числа Fos-положительных (Fos^+) клеток в отдельных областях гиппокампа. При этом для Fos^+ -клеток также рассчитывали плотность в каждой области гиппокампа.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prism 8.0. (GraphPad Software). Использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Брауна–Форсайта и апостериорный критерий Тамхейна T2 для множественных сравнений, а также двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA и апостериорный критерий Тьюки для множественных сравнений. Значимыми считали различия при $p \leq 0.05$. Данные на графиках представлены как среднее \pm 95%-ный доверительный интервал, точки отражают индивидуальные значения. Схему эксперимента изображали с использованием BioRender.com.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мыши формируют долговременную ассоциативную аверсивную память об обстановке, только если немедленно ЭКР в ней предшествовало обследование этой обстановки

Результаты тестирования обстановочной ассоциативной памяти представлены на рис. 1 (б). Было показано, что при отставлении немедленного ЭКР от обследования обстановки на 3 дня у

мышей формировалась долговременная ассоциативная аверсивная память о данной обстановке, что выражалось в значимом повышении уровня замирания при тестировании у мышей группы “Обучение”, по сравнению с контрольными группами “ЭКР” и “Обстановка” ($F^* (2,5.4) = 31.8, p = 0.001$). При этом группы “Обстановка” и “ЭКР” демонстрировали очень низкие уровни замирания: в среднем $9.8\% \pm 6.4\%$ и $10.0\% \pm 5.3\%$ соответственно. Таким образом, только животные, получавшие предъявление новой обстановки с последующим нанесением немедленного ЭКР в ней, формировали ассоциативную аверсивную память об этой обстановке.

Область CA1 гиппокампа специфически активируется при извлечении ассоциативной аверсивной памяти об обстановке

Методом Fos-нейроимиджинга мы проанализировали активность различных областей гиппокампа мышей при извлечении памяти об обстановке (рис. 2). В зубчатой фасции гиппокампа единственное значимое различие было найдено между группами “Обучение” и “ЭКР”: в первой группе плотность Fos^+ -клеток была повышена ($F^* (2,8.06) = 9.2, p = 0.008$) – рис. 2 (а). В области CA1 гиппокампа наблюдалось значимое повышение плотности Fos^+ -клеток у животных группы “Обстановка”, по сравнению с мышами группы “ЭКР” ($F^* (2,4.9) = 65.8, p = 0.0003$). Кроме этого, плотность Fos^+ -клеток была значимо выше у обученных животных, чем в обеих контрольных группах, – рис. 2 (б). В области CA3 гиппокампа нами не было обнаружено никаких значимых различий в плотности Fos^+ -клеток между разными группами мышей ($F^* (2,8.2) = 0.47, p = 0.64$) – рис. 2 (в).

Таким образом, мы обнаружили, что только в области CA1 гиппокампа наблюдалась специфическая активация, связанная именно с извлечением ассоциативной памяти.

Активация пирамидных нейронов и интернейронов гиппокампа при извлечении памяти

Для того чтобы установить, какие нейроны, возбуждающие или тормозные, преимущественно активируются при извлечении ассоциативной аверсивной памяти об обстановке, мы провели совместное иммуногистохимическое мечение белка c-Fos и маркеров типов нейронов – Emx1 и GAD. Нами были проанализированы доли Emx^+ - и GAD^+ -нейронов от всех Fos^+ -клеток

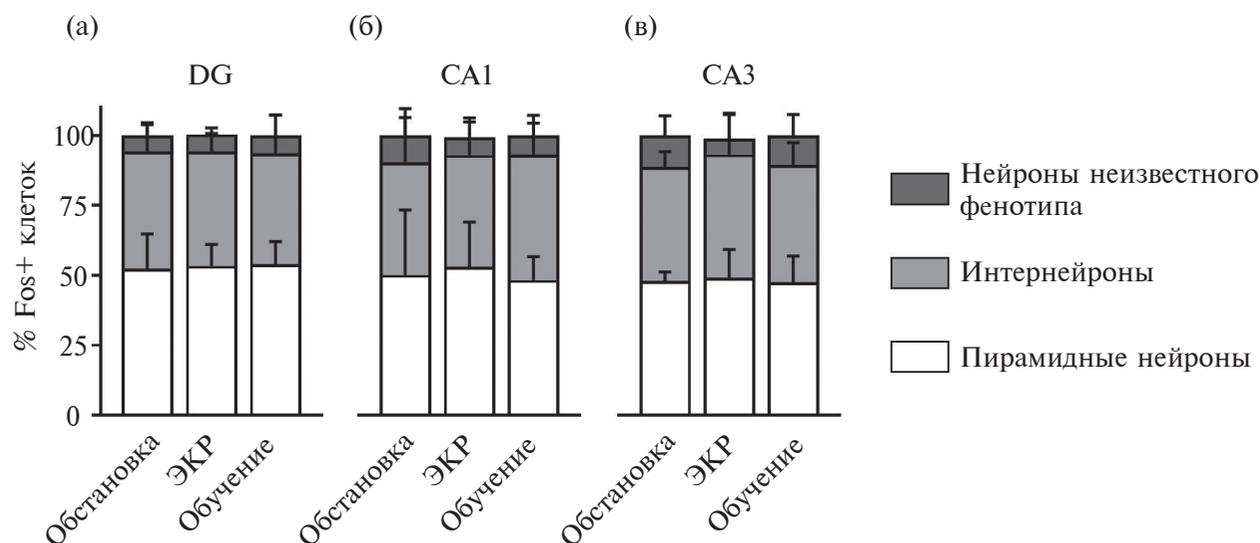


Рис. 3. Доля пирамидных Emx1⁺-нейронов, GAD⁺-интернейронов и нейронов неизвестного фенотипа от всех активированных по c-Fos нейронов в различных областях гиппокампа мышей при извлечении памяти об обстановке. (а) зубчатая фасция (DG), (б) область CA1, (в) область CA3. Описание статистических различий дано в тексте.

Fig. 3. The fraction of pyramidal Emx1⁺ neurons, GAD⁺ interneurons and neurons of unknown phenotype of all c-Fos⁺ neurons in three areas of the hippocampus during context memory retrieval. (a) dentate gyrus (DG), (б) CA1 region, (в) CA3 region. For the description of statistics see main text.

в областях CA1, CA3 и зубчатой фации. При этом оказалось, что часть Fos⁺-нейронов не окрашиваются ни на Emx1, ни на GAD – такие клетки были названы “нейронами неизвестного фенотипа”, поскольку в рамках нашего эксперимента определить их клеточный тип не представлялось возможным (рис. 3).

Было показано, что пропорция пирамидных нейронов, интернейронов и нейронов неизвестного фенотипа среди Fos⁺-клеток, активированных извлечением памяти, является практически постоянной и не зависит ни от области гиппокампа, ни от предыдущего опыта животных. Так, во всех исследованных областях и у всех экспериментальных групп доля Fos⁺Emx1⁺-нейронов составляла в среднем 47–54%, доля Fos⁺GAD⁺-нейронов – 40–45% и доля Fos⁺-нейронов неизвестного фенотипа – 6–11%. При этом доля Fos⁺-нейронов неизвестного фенотипа во всех областях гиппокампа была значительно меньше, чем доли Fos⁺Emx1⁺- и Fos⁺GAD⁺-нейронов (зубчатая фасция, рис. 3 (а): фактор “тип клеток”: $F(1.337, 16.05) = 120.4, p < 0.0001$, фактор “группа мышей”: $F(2, 12) = 1.0, p = 0.4$, взаимодействие факторов: $F(4, 24) = 0.07, p = 0.99$, попарные сравнения доли нейронов неизвестного фенотипа и пирамидных или интернейронов: $p < 0.0001$; область CA1, рис. 3 (б): фактор “тип клеток”: $F(1.206, 14.47) = 42.72, p < 0.0001$, фак-

тор “группа мышей”: $F(2, 12) = 1.0, p = 0.4$, взаимодействие факторов: $F(4, 24) = 0.22, p = 0.92$, попарные сравнения доли нейронов неизвестного фенотипа и пирамидных или интернейронов: $p < 0.0001$; область CA3, рис. 3 (в): фактор “тип клеток”: $F(1.892, 22.70) = 89.85, p < 0.0001$, фактор “группа мышей”: $F(2, 12) = 1.0, p = 0.4$, взаимодействие факторов: $F(4, 24) = 0.45, p = 0.77$, попарные сравнения доли нейронов неизвестного фенотипа и пирамидных или интернейронов: $p < 0.0001$). Доли Fos⁺Emx1⁺- и Fos⁺GAD⁺-нейронов были равными и не различались в областях CA1 и CA3 (попарные сравнения: $p > 0.2$), а в зубчатой фации Fos⁺-пирамидных нейронов было несколько больше, чем Fos⁺-интернейронов ($p = 0.01$). Интересно, что пропорция активированных нейронов разного типа оставалась постоянной во всех областях гиппокампа, независимо от того, извлекали ли мыши аверсивную ассоциативную память об обстановке (группа “Обучение”), неассоциативную обстановочную память (группа “Обстановка”) или обследовали обстановку, ранее сочетавшуюся с немедленным ЭКР, но не запомненную животными (группа “ЭКР”), – как описано выше, фактор “группа мышей” не был значим ни в одной из изученных областей.

Несмотря на то, что пропорция нейронов разных типов не зависела от группы животных,

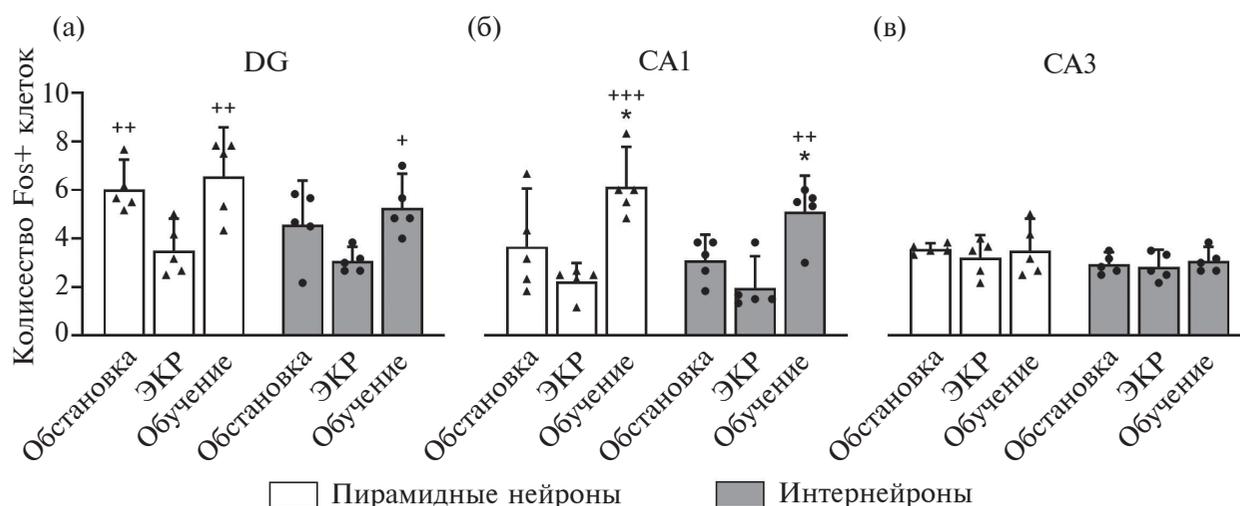


Рис. 4. Количество активированных по c-Fos пирамидных $Emx1^+$ -нейронов и GAD^+ -интернейронов в различных областях гиппокампа у мышей разных групп при извлечении памяти об обстановке. (а) зубчатая фасция (DG), (б) область CA1, (в) область CA3. * – $p < 0.05$ по сравнению с группой “Обстановка”, + – $p = 0.02$, ++ – $p < 0.01$, +++ – $p = 0.0001$ по сравнению с группой “ЭКР”, апостериорный критерий Тьюки.

Fig. 4. The number of c-Fos-positive pyramidal $Emx1^+$ neurons and GAD^+ interneurons in three hippocampal regions of mice during context memory retrieval. (a) dentate gyrus (DG), (б) CA1 region, (в) CA3 region. * – $p < 0.05$ compared to the Context group, + – $p = 0.02$, ++ – $p < 0.01$, +++ – $p = 0.0001$ compared to the Footshock group, Tukey’s multiple comparisons test.

в абсолютных количествах Fos⁺-пирамидных и интернейронов наблюдались значимые межгрупповые различия (рис. 4). Так, в зубчатой фасции количество Fos⁺ $Emx1^+$ -нейронов было значимо больше у групп “Обстановка” и “Обучение”, чем у группы “ЭКР”, а количество Fos⁺ GAD^+ -нейронов было значимо больше только у группы “Обучение”, чем у группы “ЭКР” (фактор “тип клеток”: $F(1, 12) = 4.83, p = 0.045$, фактор “группа мышей”: $F(2, 12) = 18.37, p = 0.0002$, взаимодействие факторов: $F(2, 12) = 0.44, p = 0.65$) – рис. 4 (а). В области CA1 наблюдалось значимое повышение количества как Fos⁺ $Emx1^+$ -, так и Fos⁺ GAD^+ -нейронов у группы “Обучение”, по сравнению с контрольными группами “Обстановка” и “ЭКР” (фактор “тип клеток”: $F(1, 12) = 2.04, p = 0.18$, фактор “группа мышей”: $F(2, 12) = 19.67, p = 0.0002$, взаимодействие факторов: $F(2, 12) = 0.26, p = 0$) – рис. 4 (б). В области CA3 не было обнаружено никаких значимых различий по количеству Fos⁺ $Emx1^+$ - и Fos⁺ GAD^+ -нейронов у разных групп мышей (фактор “тип клеток”: $F(1, 12) = 3.84, p = 0.07$, фактор “группа мышей”: $F(2, 12) = 0.57, p = 0.58$, взаимодействие факторов: $F(2, 12) = 0.11, p = 0.9$) – рис. 4 (в).

Таким образом, нами было показано, что соотношение пирамидных и интернейронов, активи-

рующихся по c-Fos, практически одинаково для разных областей гиппокампа и не изменяется при извлечении различных форм памяти. При этом увеличение количества Fos⁺-клеток в области CA1 гиппокампа при извлечении ассоциативной памяти происходит в равной степени за счет активации интернейронов и пирамидных нейронов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе было проведено сравнительное исследование вовлечения возбуждающих и тормозных нейронов гиппокампа в извлечение ассоциативной аверсивной памяти об обстановке. Для этого использовали модель обучения УРЗ на обстановку, в которой ознакомление животного с обстановкой (будущим УС) и последующий БС (нанесение ЭКР в этой обстановке) были разнесены на длительное время (Воробьева и др., 2016; Pinizzotto et al., 2020; Heroux et al., 2021; Zhu et al., 2022). Мы показали, что животные способны формировать ассоциативную аверсивную память об обстановке только в том случае, если нанесение немедленного ЭКР производится в обследованной ими ранее обстановке, в то время как одно только немедленное ЭКР не приводит к формированию ассоциации, что согласуется с данными предыдущих работ (Воробьева и др., 2016; Торопова и др., 2018; Lunardi et al., 2020).

Далее с помощью выявления белкового продукта немедленного раннего гена *c-fos* нами была изучена активация нейронов различных областей гиппокампа при извлечении аверсивной ассоциативной памяти об обстановке (группа “Обучение”), по сравнению с неассоциативной памятью об обстановке (группа “Обстановка”) или обследованием обстановки, сочетавшейся с ЭКР, но не запомненной животными (группа “ЭКР”). Мы показали, что извлечение ассоциативной памяти об обстановке сопровождается специфической активацией только области СА1 гиппокампа, но не области СА3 и не зубчатой фации гиппокампа. Считается, что область СА1 гиппокампа является критически важной для формирования нейтральной памяти об обстановке, а также ассоциативного обучения УРЗ на обстановку (Mauger, Nadel, 2021). Нейроны этой области участвуют в кодировании окружающего пространства (Alexander et al., 2020), в СА1 были найдены клетки места, активность которых была приурочена к конкретной обстановке (Khatib et al., 2023). Именно СА1 рассматривается как область, в которой происходит изменение активности нейронов и экспрессия генов в связи с обучением в классической модели УРЗ (Silva et al., 2019; Kobayashi, Matsuo, 2023). В некоторых из ранее выполненных работ по изучению экспрессии немедленных ранних генов в гиппокампе при предварительном обследовании мышами или крысами обстановки, нанесении в ней немедленного ЭКР, а также при сочетании обеих этих процедур была показана специфическая активация области СА1 при формировании аверсивной ассоциативной памяти в момент сочетания немедленного ЭКР с обследованной ранее обстановкой (Торопова и др., 2018; Pevzner, Guzowski, 2014). Однако исследований, посвященных активности различных областей гиппокампа при извлечении памяти в такой поведенческой модели, ранее не проводили.

Мы показали, что при извлечении аверсивной обстановочной памяти в различных областях гиппокампа активируются как возбуждающие $Emx1^+$ -пирамидные нейроны, так и тормозные GAD^+ -интернейроны. Пирамидные нейроны и интернейроны гиппокампа образуют сложную сеть, которая играет ключевую роль в обучении и формировании памяти, в том числе и в условно-рефлекторном замирании. Известно, что пирамидные нейроны активируются при формировании пространственных карт и обстановочной памяти (Krueger et al., 2020; Jarzebowski et al., 2022; Nilchian et al., 2022). Исследования с

применением оптической стимуляции и ингибирования показывают, что пирамидные клетки гиппокампа играют ключевую роль в формировании ассоциативной памяти (Alexander et al., 2019; Krueger et al., 2020; Graham et al., 2021). Роль интернейронов, особенно парвальбумин-позитивных интернейронов, представляется не менее важной в контексте обучения и формирования условных рефлексов. Парвальбумин-позитивные интернейроны играют ключевую роль в регулировании синаптической пластичности (Kaifosh et al., 2014). Эти интернейроны ингибируют активность пирамидных нейронов в определенных временных интервалах, что способствует точному временному кодированию информации и формированию ассоциативных связей (Lee et al., 2013). Еще один класс интернейронов – NPY-положительные корзинчатые клетки – играют важную роль в регулировании сетевой активности гиппокампа (Comeras et al., 2021). Эти клетки контролируют высвобождение гамма-аминомасляной кислоты, что влияет на синаптическую пластичность и генерацию ритмической активности, сопутствующей обучению (Comeras et al., 2021). Таким образом, взаимодействие пирамидных нейронов и интернейронов различных типов в гиппокампе существенно для обучения условно-рефлекторному замиранию и формирования ассоциативной памяти.

В проведенных ранее исследованиях роли нейронов различных типов в формировании памяти, в частности участия клеток гиппокампа различных типов в обучении УРЗ на обстановку, было показано, что как пирамидные нейроны, так и интернейроны гиппокампа вовлечены в формирование ассоциативной обстановочной памяти (Lovett-Barron et al., 2014; Raza et al., 2017; Guo et al., 2018; Besnard et al., 2019; Comeras et al., 2021). Тем не менее проведенные ранее исследования были выполнены в принципиально иной парадигме – они изучали микросетевые механизмы формирования ассоциативной памяти и роль клеток какого-то одного нейронального подтипа, используя в основном электрофизиологические методы (Lovett-Barron et al., 2014; Raza et al., 2017; Guo et al., 2018; Besnard et al., 2019; Comeras et al., 2021). Нас же интересовал сравнительный анализ активности пирамидных клеток и интернейронов различных областей гиппокампа при извлечении ассоциативной обстановочной памяти. При этом метод Fos-нейроимиджинга позволил нам избирательно выявлять энграммные клетки, то есть именно те

нейроны, которые подвергаются пластическим перестройкам при обучении и, как предполагается, поддерживают хранение и воспроизведение памяти (Kitamura et al., 2017; Roy et al., 2017; Tonegawa et al., 2018; Pignatelli et al., 2019; Josselyn, Tonegawa, 2020; Zhang et al., 2020). Это позволило выяснить, относятся ли выявленные по *c-Fos* нейроны энграммы гиппокампа к пирамидным клеткам или интернейронам. Было показано, что оба эти базовых типа нейронов вовлекаются в специфическую активность при извлечении памяти, причем соотношение активированных пирамидных и интернейронов практически не зависит ни от типа поведенческого воздействия, ни от области гиппокампа, и близко к 50/50%, а наблюдавшийся при извлечении ассоциативной памяти специфический прирост количества *Fos*⁺-клеток в области CA1 гиппокампа происходил в равной степени за счет увеличения количества активированных интернейронов и пирамидных нейронов.

Добавочную информацию по пластичности нейронов различных типов в гиппокампе дают исследования экспрессии гена *c-fos* в ответ на фармакологические или физиологические воздействия. Так, в серии работ было показано, что судороги, индуцированные электрической стимуляцией (Dragunow et al., 1992), введением 4-аминопиридина (Mihály et al., 2001) или пилокарпина (Peng et al., 2005), приводят к экспрессии *c-fos* в интернейронах разных подтипов в гиппокампе у мышей или крыс. Кроме того, показано, что ген *c-fos* экспрессируется как в пирамидных нейронах зубчатой фасции, так и в парвальбуминовых интернейронах лабораторных крыс и шетинистых крыс *Proechimys guyannensis* после пилокарпин-индуцированных судорог (Fabene et al., 2004). Высокочастотная оптогенетическая стимуляция медиальной префронтальной коры стрессированных крыс не влияла на экспрессию *c-fos* в CaMKII⁺-пирамидных нейронах гиппокампа, но приводила к усилению его экспрессии в GAD⁺-интернейронах (Parr et al., 2022). Стимуляция околосинаптического серого вещества, наоборот, приводила к снижению количества *Fos*⁺-парвальбумин-позитивных интернейронов в гиппокампе крыс (Temel et al., 2013). Введение эстрадиола самкам крыс приводило к индукции *c-fos* в небольшом количестве GAD⁺-интернейронов областей CA1 и CA3 гиппокампа (Rudick et al., 2000). И, наконец, исследование активации экспрессии *c-fos* в парвальбуминовых и кальбиндиновых интернейронах коры и гиппокампа показало, что при введении

фенциклидина крысам активировались парвальбуминовые интернейроны области CA1 (Hervig et al., 2016). Таким образом, исследования соотношения активированных по экспрессии *c-fos* пирамидных и интернейронов ранее не проводили. В представленных выше работах было показано, что *c-fos* может экспрессироваться как в пирамидных, так и в интернейронах различных подтипов в ответ на фармакологические и физиологические воздействия. При этом изменения в соотношении разных типов нейронов в контрольных и экспериментальных группах не оценивали. В нашей работе мы впервые показали, что соотношение входящих в энграмму пирамидных и интернейронов не изменяется в зависимости от типа поведенческого воздействия.

Таким образом, нами было проведено первое сравнительное исследование вовлечения пирамидных клеток и интернейронов гиппокампа в извлечение различных форм памяти и показано, что нейроны обоих типов вовлекаются в специфическую активность при извлечении памяти, причем соотношение типов активированных нейронов практически не зависит ни от поведенческого воздействия, ни от области гиппокампа, и близко к 50/50%, а наблюдающийся при извлечении ассоциативной памяти специфический прирост количества *Fos*⁺-клеток в области CA1 гиппокампа происходит в равной степени за счет увеличения количества активированных интернейронов и пирамидных нейронов. В связи с тем, что и пирамидные нейроны, и интернейроны гиппокампа делятся на различные клеточные подтипы (Zeisel et al., 2015; Tasic et al., 2016; Zeng, Sanes, 2017; Booker, Vida, 2018), следующим вопросом, требующим исследования, является то, экспрессируют ли *c-fos* при обучении и извлечении памяти все эти подтипы нейронов в равной степени, или только некоторые из них?

ВЫВОДЫ

Извлечение ассоциативной памяти об обстановке, сформированной ранее при разнесении во времени предварительного предъявления обстановки и аверсивного безусловного стимула, сопровождается увеличением количества *c-Fos*-положительных клеток в области CA1 гиппокампа.

При извлечении памяти об обстановке в гиппокампе активируются как положительные по маркеру *Emx1* возбуждающие нейроны, так и тормозные интернейроны, положительные по маркеру GAD.

При этом независимо от типа поведенческого воздействия пропорция активированных возбуждающих и тормозных нейронов остается постоянной, изменяется только количество активированных клеток каждого типа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда: проект № 20-15-00283 – поведенческие эксперименты и эксперименты по анализу экспрессии *c-fos* при извлечении памяти; проект № 23-78-00010 – эксперименты по анализу активации нейронов разных типов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воробьева Н.С., Ивашкина О.И., Торопова К.А., Анохин К.В.* Долговременная обстановочная память у мышей: продолжительность и способность к ассоциации с подкрепляющим воздействием. Журн. высш. нервн. деят. им. Павлова. 2016. 66 (3): 352–360.
- Торопова К.А., Трошев Д.В., Ивашкина О.И., Анохин К.В.* Активация экспрессии *c-Fos* в ретроспленальной коре, но не гиппокампе, сопровождает формирование ассоциации между обстановкой и безусловным стимулом и ее последующее извлечение у мышей. Журн. высш. нервн. деят. им. Павлова. 2018. 68 (6): 759–774.
- Alexander A.S., Robinson J.C., Dannenberg H., Kinsky N.R., Levy S.J., Mau W. et al.* Neurophysiological coding of space and time in the hippocampus, entorhinal cortex, and retrosplenial cortex. *Brain Neurosci Adv.* 2020. 4: 2398212820972871.
- Alexander G.M., Riddick N.V., McCann K.E., Lustberg D., Moy S.S., Dudek S.M.* Modulation of CA2 neuronal activity increases behavioral responses to fear conditioning in female mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2019. 163: 107044.
- Barrientos R.M., Reilly R.C.O., Rudy J.W.* Memory for context is impaired by injecting anisomycin into dorsal hippocampus following context exploration. *Behav. Brain Res.* 2002. 134: 299–306.
- Besnard A., Gao Y., TaeWoo Kim M., Twarkowski H. et al.* Dorsolateral septum somatostatin interneurons gate mobility to calibrate context-specific behavioral fear responses. *Nat Neurosci.* 2019. 22 (3): 436–446.
- Booker S.A., Vida I.* Morphological diversity and connectivity of hippocampal interneurons. 2018. *Cell Tissue Res.* 373 (3): 619–641.
- Buhl E., Whittington M.* Local Circuits. The Hippocampus Book. Ed. Per Andersen et al. New York: Oxford Neuroscience Series, 2006. 297–320.
- Chan C.-H., Godinho L.N., Thomaidou D., Tan S.-S., Gulisano M., Parnavelas J.G.* *Emx1* is a Marker for Pyramidal Neurons of the Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex.* 2001. 11 (12): 1191–1198.
- Comeras L.B., Hörmer N., Mohan Bethuraj P., Tasan R.O.* NPY Released from GABA neurons of the dentate gyrus specially reduces contextual fear without affecting cued or trace fear. *Front. Synaptic Neurosci.* 2021. 13: 635–726.
- Curzon P., Rustay N.R., Browman K.E.* Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd ed. Ed. Buccafusco J.J. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2009. Chapter 2.
- Dragunow M., Yamada N., Bilkey D.K., Lawlor P.* Induction of immediate-early gene proteins in dentate granule cells and somatostatin interneurons after hippocampal seizures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1992. 13 (1–2): 119–126.
- Eichenbaum H.* What Versus Where: Non-spatial Aspects of Memory Representation by the Hippocampus. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018. 37: 101–117.
- Fabene P.F., Andrioli A., Priel M.R., Cavalheiro E.A., Bentivoglio M.* Fos induction and persistence, neurodegeneration, and interneuron activation in the hippocampus of epilepsy-resistant versus epilepsy-prone rats after pilocarpine-induced seizures. *Hippocampus.* 2004. 14 (7): 895–907.
- Franklin B.J., Paxinos G.* The mouse brain in stereotaxic coordinates, 3rd ed. New York: Academic Press, 2007.
- Graham J., D'Ambra A.F., Jung S.J., Teratani-Ota Y., Vishwakarma N., Venkatesh R. et al.* High-frequency stimulation of ventral CA1 neurons reduces amygdala activity and inhibits fear. *Front Behav Neurosci.* 2021. 15: 595049.
- Guo N., Soden M.E., Herber C., Kim M.T., Besnard A., Lin Pw. et al.* Dentate granule cell recruitment of feedforward inhibition governs engram maintenance and remote memory generalization. *Nat Med.* 2018. 24 (4): 438–449.
- Heroux N.A., Horgan C.J., Stanton M.E.* Prefrontal NMDA-receptor antagonism disrupts encoding or consolidation but not retrieval of incidental context learning. *Behav. Brain Res.* 2021. 405: 113175.
- Hervig M.E., Thomsen M.S., Kalló I., Mikkelsen J.D.* Acute phencyclidine administration induces *c-Fos*-immunoreactivity in interneurons in cortical and subcortical regions. *Neuroscience.* 2016. 334: 13–25.
- Houser C.R.* Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog. Brain Res.* 2007. 163: 217–232.
- Jarzebowski P., Hay Y.A., Grewe B.F., Paulsen O.* Different encoding of reward location in dorsal and intermediate hippocampus. *Curr Biol.* 2022. 32(4): 834–841.
- Josselyn S.A., Tonegawa S.* Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science.* 2020. 367 (6473): eaaw4325.
- Kaifosh P., Lovett-Barron M., Turi G.F., Reardon T.R., Losonczy A.* Septo-hippocampal GABAergic signaling across multiple modalities in awake mice. *Nat Neurosci.* 2013. 16 (9): 1182–1184.

- Khatib D., Ratzon A., Sellevoll M., Barak O., Morris G., Derdikman D.* Active experience, not time, determines within-day representational drift in dorsal CA1. *Neuron*. 2023. 111 (15): 2348–2356.e5.
- Kitamura T., Ogawa S.K., Roy D.S., Okuyama T., Morrissey M.D., Smith L.M. et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*. 2017. 356 (6333): 73–78.
- Kobayashi K.S., Matsuo N.* Persistent representation of the environment in the hippocampus. *Cell Rep*. 2023. 42 (1): 111989.
- Krueger J.N., Wilmot J.H., Teratani-Ota Y., Puhger K.R., Nemes S.E., Crestani A.P. et al.* Amnesia for context fear is caused by widespread disruption of hippocampal activity. *Neurobiol Learn Mem*. 2020. 175: 107295.
- Lee S.A.* Navigational roots of spatial and temporal memory structure. *Anim. Cogn*. 2023. 26 (1): 87–95.
- Lee S.H., Marchionni I., Bezaire M., Varga C., Danielson N., Lovett-Barron M. et al.* Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron*. 2014. 82 (5): 1129–1144.
- Lovett-Barron M., Kaifosh P., Kheirbek M.A., Danielson N., Zaremba J.D., Reardon T.R. et al.* Dendritic inhibition in the hippocampus supports fear learning. *Science*. 2014. 343 (6173): 857–863.
- Lunardi P., de Souza L.W., Dos Santos B., Popik B., de Oliveira Alvares L.* Effect of the endocannabinoid system in memory updating and forgetting. *neuroscience*. 2020. 444: 33–42.
- Matus-Amat P., Higgins E.A., Barrientos R.M., Rudy J.M.* The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J. Neurosci*. 2004. 24 (10): 2431–2439.
- Matus-Amat P., Higgins E.A., Sprunger D., Wright-Hardesty K., Rudy J.W.* The role of dorsal hippocampus and basolateral amygdala NMDA receptors in the acquisition and retrieval of context and contextual fear memories. *Behav. Neurosci*. 2007. 121 (4): 721–731.
- Maurer A.P., Nadel L.* The Continuity of Context: A Role for the hippocampus. *Trends Cogn Sci*. 2021. 25 (3): 187–199.
- Mihály A., Szakács R., Bohata C., Dobó E., Krisztin-Péva B.* Time-dependent distribution and neuronal localization of c-fos protein in the rat hippocampus following 4-aminopyridine seizures. *Epilepsy Res*. 2001. 44 (2–3): 97–108.
- Nambu M.F., Lin Y.J., Reuschenbach J., Tanaka K.Z.* What does engram encode? Heterogeneous memory engrams for different aspects of experience. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2022. 75: 102568.
- Nilchian P., Wilson MA, Sanders H.* Animal-to-Animal Variability in Partial Hippocampal Remapping in Repeated Environments. *J Neurosci*. 2022. 42 (26): 5268–5280.
- Papp M., Gruca P., Lason M., Litwa E., Solecki W., Willner P.* Optogenetic stimulation of medial prefrontal cortex excites GABAergic cells in the nucleus accumbens and hippocampus of Wistar-Kyoto rats exposed to chronic mild stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 2022. 239 (7): 2299–2307.
- Peng Z., Houser C.R.* Temporal patterns of fos expression in the dentate gyrus after spontaneous seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci*. 2005. 25 (31): 7210–7220.
- Pevzner A., Guzowski J.F.* Immediate-early gene transcriptional activation in hippocampus CA1 and CA3 does not accurately reflect rapid, pattern completion-based retrieval of context memory. *Learn. Mem*. 2014. 22 (1): 1–5.
- Pignatelli M., Ryan T.J., Roy D.S., Lovett C., Smith L.M., Muralidhar S., Tonegawa S.* Engram cell excitability state determines the efficacy of memory retrieval. *Neuron*. 2019. 101 (2): 274–284.e5.
- Pinizzotto C.C., Heroux N.A., Horgan C.J., Stanton M.E.* Role of dorsal and ventral hippocampal muscarinic receptor activity in acquisition and retention of contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci*. 2020. 134 (5): 460–470.
- Ramírez-Franco J.J., Muñoz-Cuevas F.J., Luján R., Jurado S.* Excitatory and inhibitory neurons in the hippocampus exhibit molecularly distinct large dense core vesicles. *Front. Cell Neurosci*. 2016. 10: 202.
- Raza S.A., Albrecht A., Çalışkan G., Müller B., Demiray Y.E., Ludewig S. et al.* HIP neurons in the dentate gyrus mediate the cholinergic modulation of background context memory salience. *Nat. Commun*. 2017. 8 (1): 189.
- Roy D.S., Kitamura T., Okuyama T., Ogawa S.K., Sun C., Obata Y. et al.* Distinct Neural circuits for the formation and retrieval of episodic memories. *Cell*. 2017. 170 (5): 1000–1012.e19.
- Rudick C.N., Woolley C.S.* Estradiol induces a phasic Fos response in the hippocampal CA1 and CA3 regions of adult female rats. *Hippocampus*. 2000. 10 (3): 274–283.
- Rudy J.W., Barrientos R.M., O'Reilly R.C.* Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav. Neurosci*. 2002. 116 (4): 530–538.
- Rudy J.W., O'Reilly R.C.* Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci*. 2001. 1 (1): 66–82.
- Silva B.A., Burns A.M., Gräff J.* A cFos activation map of remote fear memory attenuation. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019. 236 (1): 369–381.
- Takahashi S.* The hippocampal ensemble code for spatial navigation and episodic memory. *Adv. Neurobiol*. 2018. 21:49-70.
- Takamiya S., Shiotani K., Ohnuki T., Osako Y., Tanisumi Y., Yuki S. et al.* Hippocampal CA1 neurons represent positive feedback during the learning process of an associative memory task. *Front. Syst. Neurosci*. 2021. 15: 718619.
- Tasic B., Menon V., Nguyen T.N., Kim T.K., Jarsky T., Yao Z. et al.* Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat. Neurosci*. 2016. 19 (2): 335–346.
- Temel Y., Blokland A., Lim L.W.* Deactivation of the parvalbumin-positive interneurons in the hippocampus after fear-like behaviour following electrical stimulation of

- the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Behav. Brain Res.* 2012. 233 (2): 322–325.
- Tonegawa S., Morrissey M.D., Kitamura T.* The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 2018. 19 (8): 485–498.
- Topolnik L., Tamboli S.* The role of inhibitory circuits in hippocampal memory processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 2022. 23 (8): 476–492.
- Tzilivaki A., Tukker J.J., Maier N., Poirazi P., Sammons R.P., Schmitz D.* Hippocampal GABAergic interneurons and memory. *Neuron.* 2023. 111 (20): 3154–3175.
- Wojjak C.T.* Sound check, stage design and screen plot – how to increase the comparability of fear conditioning and fear extinction experiments. *Psychopharmacology.* 2019. 236 (1): 33–48.
- Zeisel A., Muñoz-Manchado A.B., Codeluppi S., Lönnerberg P., La Manno G., Juréus A. et al.* Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* 2015. 347 (6226): 1138–1142.
- Zeng H., Sanes J.R.* Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. 18 (9): 530–546.
- Zhang X., Kim J., Tonegawa S.* Amygdala reward neurons form and store fear extinction memory. *Neuron.* 2020. 105 (6): 1077–1093.e7.
- Zhu M., Perkins M.G., Lennertz R., Abdulzahir A., Pearce R.A.* Dose-dependent suppression of hippocampal contextual memory formation, place cells, and spatial engrams by the NMDAR antagonist (R)-CPP. *Neuropharmacology.* 2022. 218: 109215.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EXCITATORY AND INHIBITORY HIPPOCAMPAL NEURONS ACTIVITY DURING ASSOCIATIVE CONTEXT MEMORY RETRIEVAL

K. A. Toropova^{a, b, #}, O. I. Ivashkina^{a, b}, N. S. Vorobyeva^a, K. V. Anokhin^{a, b}

^a*Institute for advanced brain studies, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Laboratory of neuronal intelligence, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

[#]*e-mail: xen.alexander@gmail.com*

In the present study, we analyzed the differential involvement of hippocampal interneurons and pyramidal neurons in the retrieval of associative aversive context memory. For this purpose, we used a model of associative learning in which the formation of a neutral context memory and the subsequent association of this memory with the footshock US during a brief reminder of the context were significantly separated in time. The activation of hippocampal neurons during associative context memory retrieval in this task was addressed by immunohistochemical detection of the immediate early gene *c-fos* protein. Retrieval of associative context memory was accompanied by an increase in the number of *c-Fos*-positive cells in the CA1 region, but not in the CA3 region and the dentate gyrus of the hippocampus. Next, a protein marker, the product of the homeobox-containing gene *Emx1*, was used to specifically identify excitatory neurons, and the marker glutamate decarboxylase, GAD, the product of the *GAD1* and *GAD2* genes, was used to specifically identify inhibitory neurons. The results of double staining for cell markers and *c-Fos* protein showed that during retrieval of associative aversive context memory in the CA1 region of the hippocampus, both *Emx1*-positive excitatory neurons and, less, GAD-positive inhibitory interneurons were activated. At the same time, regardless of the type of behavioral procedure (retrieval of associative context memory, non-associative context memory, or exploration of context, where animals previously received the footshock but did not remember it), the proportion of activated excitatory and inhibitory neurons remained constant, only the number of activated cells of each type changed. Altogether, our results indicate the specific role of hippocampal CA1 neurons in associative context memory and demonstrate that both excitatory and inhibitory neurons are involved in the encoding of such memory.

Keywords: associative memory, memory retrieval, fear conditioning, hippocampus, *c-fos*, excitatory neurons, inhibitory interneurons