

О.В. Довгань, О.В. Власенко, Т.В. Бузика, В.О. Майський,
О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

Зміни експресії гена *c-fos* в ядрах мигдалеподібного тіла та частоти серцевих скорочень при реалізації їждобувних стереотипних рухів у щурів

Досліджували розподіл *Fos*-імунореактивних (*Fos-ir*-) і НАДФН-діафореактивних (НАДФН-др-) нейронів у під'ядрах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі щурів (на рівнях від -2,12 до -3,14 мм від брегми), а також виявляли зміни частоти серцевих скорочень (ЧСС) у інтактних тварин, після харчової депривації та реалізації тваринами їждобувних рухів. Достовірне збільшення кількості *Fos-ir*-нейронів було виявлено в мозку щурів, які здійснювали оперантні рухи (у порівнянні з іншими групами тварин) як у центральному ядрі мигдалеподібного тіла, так і інсулярній корі на всіх досліджуваних рівнях. Основний фокус локалізації *Fos-ir*-нейронів у мигдалеподібному тілі був зареєстрований у латеральній частині центрального ядра (58,5 од. \pm 1,9 од. у зрізі 40 мкм) на рівні -2,56 мм. Більша середня кількість активованих нейронів визначалася також у медіальному та капсулярному під'ядрах центрального ядра. У гранулярній/дисгранулярній інсулярній корі кількість *Fos-ir*-клітин становила 165,5 од. \pm 3,2 од. Однак середня кількість і щільність НАДФН-др-нейронів у досліджених структурах мозку у тварин усіх груп достовірно не відрізнялися. У щурів, що реалізують їждобувні рухи, були зареєстровані нейрони з подвійним забарвленням (*Fos-ir* + НАДФН-др) у медіальному, базолатеральному, передньому кортикальному ядрах мигдалеподібного тіла та безіменній субстанції. Було виявлено, що виконання тваринами оперантних рухів передньою кінцівкою протягом повторних сеансів тренування супроводжується поступовим зниженням (на 5–12 %) усереднених значень ЧСС із наступним відновленням їх до початкових значень (тонічний компонент). Аналіз змін ЧСС протягом реалізації окремих цілеспрямованих рухів виявив період швидкого (500 мс) її зниження, яке збігалось з кінцевою фазою захоплення харчової кульки (фазний компонент). Передбачається, що виявлені фокуси *Fos*-імунореактивності в латеральній і медіальній частинах центрального ядра мигдалеподібного тіла, а також інсулярній корі та безіменній субстанції свідчать про те, що зазначені структури мозку причетні до формування цілеспрямованих рухів. Прямі проєкції вказаних ядер (і гіпоталамуса) на кардіоваскулярні центри довгастого мозку можуть зумовлювати виявлені зміни в діяльності серцево-судинної системи тварин у період реалізації ними цілеспрямованих рухів.

Ключові слова: оперантний рефлекс, експресія *c-fos*, НАДФН-діафоразна реактивність, мигдалеподібне тіло, інсулярна кора, щур.

ВСТУП

Моторні ділянки кори великих півкуль мозку є ключовими структурами, задіяними у формування моторних програм і низхідних команд, які забезпечують ініціацію цілеспрямованих рухів у людини та тварин. На відміну від рефлекторних, цілеспрямовані рухи є вну-

трішньомотивованими. Нещодавно нами було встановлено [6], що у фронтальних ділянках моторної кори головного мозку щурів, які виконували оперантні рухи передньою кінцівкою для досягнення та захоплення харчової кульки, достовірно пригнічувалася сумарна нейронна активність. Таке зниження пов'язується з пластичними змінами в кір-

© О.В. Довгань, О.В. Власенко, Т.В. Бузика, В.О. Майський, О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

кових мережах, направлених на закріплення моторних навичок під час напрацювання стереотипних рухів [18]. Характерно, що на короткому часовому проміжку реалізації кожного оперантного стереотипного руху передньою кінцівкою у щурів було відмічено різке зниження частоти серцевих скорочень (ЧСС), після чого вона поступово відновлювалася до початкових значень. Також за допомогою маркера нейронної активації – експресії раннього гена *c-fos*, нами було встановлено, що після реалізації оперантних рухів рееструвалося підвищення кількості активних нейронів у дорсальному моторному ядрі блукаючого нерва та ретикулярних вентролатеральних ядрах довгастого мозку [3]. Відомо, що вказані ядра прямо задіяні у модуляцію артеріального тиску та збільшення ЧСС при активації м'язових ноцицепторів [10, 23]. Треба зазначити, що важливу роль в ініціації як мотиваційно-афективного, так і вегетативного компонентів рухових програм відіграють і лімбічні структури базальної частини переднього мозку та гіпоталамус [2, 8].

Наразі відомі два пускових механізми, які ініціюють розвиток серцево-судинних автономних реакцій під час реалізації рухів. Одним із них можуть бути аферентні ноцицептивні впливи від м'язів при тривалому їх напруженні та розвитку стомлення. Інший механізм забезпечується головним чином сигналами, які генеруються в сенсомоторній корі й ініціюють виконання моторної програми та активують бульбарні кардіоваскулярні центри [34, 35]. Слід також відзначити наявність прямих шляхів від інсулярної кори, ядер мигдалеподібного тіла та гіпоталамуса до медулярних центрів регуляції функції серцево-судинної системи [10, 14].

Нині існує значна кількість праць, в яких досліджували патерни нейронної активації в ядрах мигдалеподібного тіла при реалізації тваринами мотивованих поведінкових рефлексів [12, 30]. Однак дані цих досліджень дуже суперечливі в оцінці нейронної активації в окремих ядрах і під'ядрах мигда-

леподібного тіла та їх причетності до закріплення та реалізації тваринами їжодобувних рефлексів [19]. Також детально не з'ясована роль об'ємного медіатора оксиду азоту (NO) в окремих структурах мигдалеподібного тіла; хоча відомо, що NO та синтаза оксиду азоту (NOS) залучаються у контроль серцево-судинної системи як на рівні автономних центрів стовбура мозку, так і лімбічних структур і гіпоталамуса [21].

Метою цієї роботи було дослідити топографію Fos-імунореактивних (Fos-ір-) і додатково НАДФН-діафоразореактивних (НАДФН-др-) нейронів (NO-генеруючих клітин) у різних ядрах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі щурів у нормі, після голодування та реалізації тваринами оперантних рефлексів, а також оцінити зміни ЧСС (показника функцій серцево-судинної системи) під час реалізації тваринами унілатеральних оперантних їжодобувних рухів. Аналіз нейронної активності в структурах мигдалеподібного тіла дасть змогу з'ясувати можливу причетність цих лімбічних структур до формування вегетативного компонента під час реалізації тваринами стереотипних цілеспрямованих рухів. Попередні результати таких досліджень опубліковані в короткому повідомленні [1].

МЕТОДИКА

В експериментах було використано чотири групи щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г. До 1-ї групи увійшли інтактні тварини (n=4); до 2-ї – тварини, які голодували протягом доби при вільному доступі до води (n=4); до 3-ї – тварини, які виконували їжодобувні рухи (n=4); до 4-ї – тварини, у яких реестрували ЧСС під час виконання їжодобувних рухів на 3-тю, 5-ту та 10-ту добу тренувань (n=12). Мотивовані протягом доби голодом тварини 3-ї групи виробляли стереотипний рух передньою кінцівкою для захоплення харчових кульок з годівниці (близько 100–150 штук за один сеанс). Протягом 12 діб

було проведено 12 тренувальних сеансів тривалістю 30 хв, в яких за кожну хвилину тварини захоплювали 4 і більше харчових кульок. Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Реєстрація фонокардіограми (ФКГ) та рухів тварини. У щурів 4-ї групи ЧСС визначали за допомогою реєстрації ФКГ. Для цього використовували рюкзачок з телеметричною апаратурою та платформу, під якою розміщували мініатюрний мікрофон. Платформу і рюкзачок фіксували на тілі тварини в умовах кетамінового наркозу (100 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Перед кожним тренувальним сеансом у рюкзачку розміщували бездротовий мобільний передавач параметрів ФКГ [5, 9]. Експериментальна камера, в якій знаходилася годівниця, була оснащена фотоелектронною системою реєстрації рухів передньої кінцівки тварини та наявності харчової кульки у годівниці. Отримані сигнали були оцифровані та записані на магнітний носій персонального комп'ютера.

Перфузія. Щурів 1-ї, 2-ї груп, а також 3-ї групи через 2 год після тренування під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, „Sigma”, США, внутрішньоочеревинно) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од./л гепарину, а потім 4%-м параформальдегідом, розчиненим у 0,1 моль/л фосфатному буфері (ФБ) (рН 7,4). Головний мозок кожної тварини швидко виділяли та додатково фіксували протягом 12 год, а потім для кріопротекції витримували 48 год при 4°C у 30%-му розчині сахарози, який готувався на ФБ. На заморожувачу мікромомі були зроблені фронтальні зрізи мозку (завтовшки 40 мкм), які збирали у лунки з СФБ для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного забарвлення.

Fos-імуно- та НАДФН-діафоразна гістохімія. Fos-імунореактивні нейрони виявляли за допомогою стандартної авідин-біотин-пе-

роксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти ядерного білка c-Fos („Oncogene Research”, Ab-5, США) і комерційного набору (ABC, „Vector”, РК 4001, США) [17]. Для виявлення НАДФН-др-нейронів забарвлені на c-Fos зрізи витримували 1 год при 37 °C у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4), який містив 0,3 % детергенту Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого β -НАДФН („Sigma”, США) [38]. Fos-ір-нейрони у зрізах мозку ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер, а НАДФН-др-нейрони – за блакитним забарвленням їх цитоплазми. Підрахунок мічених нейронів у зрізах головного мозку проводили під світловим мікроскопом, а їх локалізацію та структури визначали за атласом мозку щура [31].

Статистика. Щоб оцінити зміни ЧСС, у тварин 4-ї групи вимірювали тривалість серцевого циклу (відповідно до ФКГ) у межах 10 с (5 с до та 5 с після початку реалізації окремого оперантного руху), а також вимірювали усереднену ЧСС за хвилину (через кожні 5 хв протягом тренувального сеансу) та за весь сеанс кожної доби. Для цих показників розраховували середнє значення (M), похибку середнього (m) та 95%-й довірчий інтервал варіацій ($M \pm 1,95 \cdot m$). Для підрахунку кількості мічених клітин використовували 4–5 зрізів мозку з досліджуваного рівня усіх тварин у групі. Середню кількість мічених нейронів \pm стандартна похибка середнього підраховували в ядрах мигдалеподібного тіла (АСо – переднє кортикальне ядро; АStr – мигдалестріатна перехідна ділянка; ВАОТ – опорне ядро нюхового тракту; ВL – базолатеральне ядро; ВМА – базомедіальне ядро, передня частина; ВSTIA – опорне ядро термінального тяжа, внутрішньомигдаликова ділянка; СеС – центральне ядро, капсулярна частина; СеL – центральне ядро, латеральна частина; СеМ – центральне ядро, медіальна частина, МеAD – медіальне ядро, антеріодорсальна частина; МеAV – медіальне ядро, антеріовентральна частина; МеPD – медіальне

ядро, постеріодорсальна частина; MePV – медіальне ядро, постеріовентральна частина; PLCo – заднє латеральне кортикальне ядро; PMCo – заднє медіальне кортикальне ядро), а також у базальному ядрі або ядрі Мейнерта (B), безіменній субстанції (SI) та інсулярній корі (AIP – задня агранулярна кора, DI – дисгранулярна кора, GI – гранулярна кора) головного мозку щурів 1-ї та 2-ї групи унілатерально, а 3-ї групи – іпси- та контралатерально на рівнях від -2,12 до -3,14 мм каудальніше від брегми за атласом [31]. Порівнювали середні кількості забарвлених клітин за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Якщо міжгрупові відмінності були знайдені, застосовували апостеріорний критерій Ньюмена – Кеулса. Рівень достовірності визначався як $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Фазні та тонічні вегетативні реакції під час реалізації оперантних рефлексів. Напрацювання тваринами стійких навичок захоплювати харчові кульки передньою кінцівкою відбувалося в послідовних 30-хвилинних тренувальних сеансах протягом 12 діб. Тривалість реалізації окремого оперантного рефлексу (час від початку руху передньої кінцівки щура до захоплення харчової кульки з годівниці) становив 500–600 мс. Під час реалізації їждобувних рухів у тварин спостерігалися виражені мотиваційно-афективні реакції, які проявлялись у вигляді характерної стійки та активних скоординованих рухів. Виконання тваринами кожного їждобувного руху передньою кінцівкою супроводжувалося швидким зниженням ЧСС з подальшим її відновленням до початкового рівня протягом 4 с. Як показано на рис. 1, а зниження усереднених значень ЧСС в інтервалі реалізації оперантних рефлексів з $397,1 \pm 2,7$ до $374,9 \text{ хв}^{-1} \pm 5,2 \text{ хв}^{-1}$ (приблизно на 5 %) відмічалось уже на 3-тю добу тренувань. На 5-ту добу таке зниження

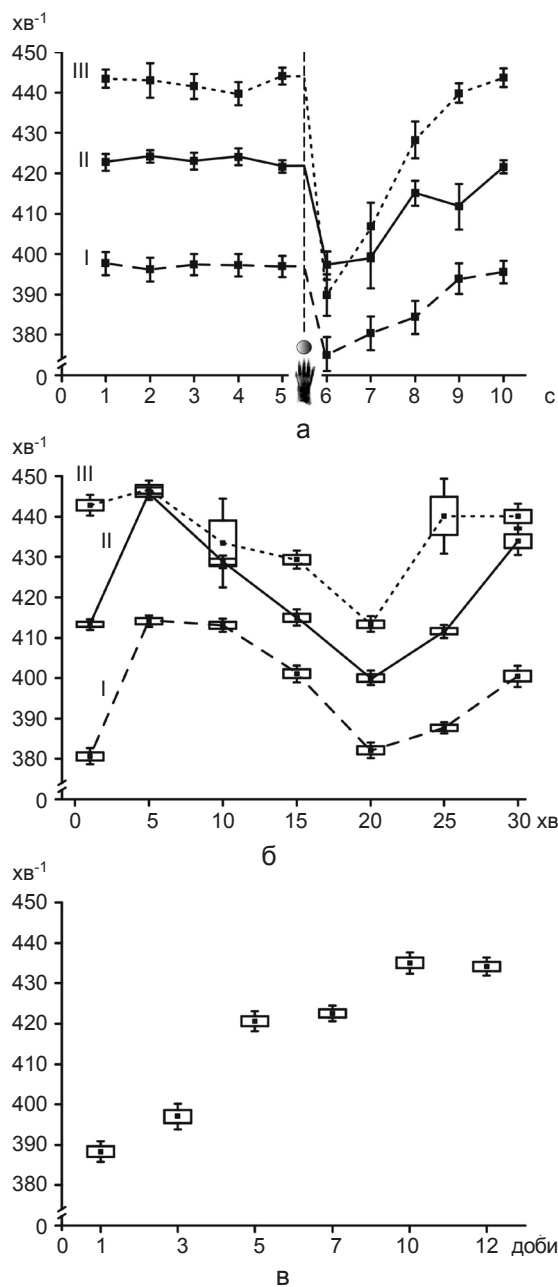


Рис. 1. Динаміка частоти серцевих скорочень (ЧСС, хв⁻¹) у щурів під час реалізації ними оперантних їждобувних рухів: а – усереднені значення ЧСС за 5 с до та 5 с після захоплення харчової кульки, момент ініціації руху показаний пунктирною лінією (результати усереднені за 20 реалізаціями на 5-й хвилині); б – через кожні 5 хв протягом 30 хв сеансу; в – за весь сеанс кожної доби протягом 12 діб тренувальних сеансів (відмітки на діаграмі зроблені через кожні 2–3 доби). I, II, III – зміни 3-тя, 5-та та 10-та доба відповідно. Чорні квадратики – середні значення (M); білі прямокутники – середні значення ± похибка середнього (M ± m); вертикальні лінії – 95%-й довірчі інтервали варіацій середнього (M ± 1,96 m)

було зареєстровано вже на рівні 6 % (з $423,1 \pm 1,8$ до $397,9 \text{ хв}^{-1} \pm 3,4 \text{ хв}^{-1}$), а на 10-ту – сягало близько 12 % (з $441,7 \pm 2,2$ до $389,9 \text{ хв}^{-1} \pm 5,3 \text{ хв}^{-1}$; $P < 0,05$). Слід зазначити, що середня ЧСС змінювалася також протягом кожного тренувального сеансу. Починаючи з 5-ї і до 20-ї хвилини середні значення ЧСС поступово знижувалися майже на 10 %, після чого, протягом останніх 10 хв тренувального сеансу починалося її збільшення майже до початкових значень. Так, на рис. 1,б представлено результати щодо зниження середніх значень ЧСС на 3-тю (з $414,1 \pm 0,8$ до $382,1 \text{ хв}^{-1} \pm 0,9 \text{ хв}^{-1}$), 5-ту (з $445,7 \pm 0,8$ до $400,1 \text{ хв}^{-1} \pm 0,9 \text{ хв}^{-1}$) та 10-ту добу (з $446,8 \pm 1,9$ до $413,4 \text{ хв}^{-1} \pm 1,9 \text{ хв}^{-1}$; $P < 0,05$) реалізації тваринами їждобувних рухів. Відзначимо, що впродовж 12 діб експерименту відбувалися також стабільні зміни середніх значень ЧСС в інтервалі тренувальних сеансів, які були направлені у бік поступового збільшення цього показника (див. рис. 1,в).

Експресія білка c-Fos у мигдалеподібному тілі та інсулярній корі щурів після реалізації їждобувних рухів. За сучасними уявленнями, які базуються на даних цито-, хемоархітектоніки, а також волоконними зв'язками мигдалеподібне тіло розділяють на три частини: 1) базолатеральну, яка утворює венстромедіальне подовження найбільш глибокого шару кори (латеральне, базальне і базомедіальне ядра), 2) центромедіальну (центральне та медіальне ядра), яка являє собою венстромедіальне подовження смугастого тіла, а також 3) каудальну частину нюхової кори (переднє та заднє кортикальні ядра) [19, 36]. Крім того, з дорсолатерального боку до мигдалеподібного тіла тісно прилягає інсулярна кора.

У інтактних тварин в ядрах мигдалеподібного тіла та лімбічній корі Fos-ір-нейрони були локалізовані досить рівномірно з обох боків мозку: середні їх кількості (у зрізі мозку) достовірно не відрізнялись. Інтенсивність імунореактивності *c-Fos* дуже різнилася у мигдалеподібному тілі в окремих його частинах і на різних рівнях

мозку (від -2,12 до -3,14 мм від брегми). Так, у центромедіальній групі під'ядер (CeC, CeL, CeM, MeAD, MeAV, MePD, MePV та BAOT) середня кількість Fos-ір-нейронів знаходилася в межах від $1,44 \pm 0,3$ до 39 од. $\pm 4,3$ од., у базолатеральній групі (BL і BMA) – від $5,1 \pm 0,5$ до $21,6$ од. $\pm 1,8$ од., у кіркоподібній групі (ACo, PLCo та PMCo) – від $17,5 \pm 1,3$ до $54,8$ од. $\pm 3,4$ од. Fos-імунореактивність також була зареєстрована і в прилеглих до мигдалеподібного тіла структурах (ASt, B, SI та BSTIA) – від $1,6 \pm 0,3$ до $19,3$ од. $\pm 1,0$ од., включаючи інсулярну кору (AIP і GI/DI) – від $31,7 \pm 2,2$ до $60,1$ од. $\pm 3,9$ од. мічених клітин (рис. 2, а–г).

Після добового голодування у щурів 2-ї групи середня кількість Fos-ір-нейронів у окремих структурах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі була достовірно більшою, ніж у контролі. Таке збільшення Fos-імунореактивності відмічалось у MeAD (на всіх рівнях) та BL, ACo, AIP і GI/DI (на ростральному та середньому рівнях, тобто -2,12 мм та -2,56 мм від брегми). Відмітимо, що на рівні -2,12 мм у передньому кортикальному ядрі та інсулярній корі була зареєстрована дуже велика кількість Fos-ір-нейронів: $83,7 \pm 5,1$ в ACo і $115,4 \pm 7,6$ та $138,6$ од. $\pm 11,4$ од. у GI/DI та AIP відповідно. Достовірно більша кількість мічених нейронів була виявлена також у прилеглих до мигдалеподібного тіла структурах ASt, B, SI та BSTIA. Слід зазначити, що у під'ядрах центрального ядра мигдалеподібного тіла (CeC, CeL та CeM) була зареєстрована достовірно менша ($P < 0,05$) кількість активованих нейронів, ніж у контролі (див. рис. 2).

У щурів 3-ї групи (після реалізації їждобувних рухів) більш інтенсивна Fos-імунореактивність спостерігалася білатерально у центральному (на всіх рівнях) і базолатеральному (на ростральному та середньому рівнях) ядрах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі. Так, основні фокуси активованих нейронів у центральному ядрі мигдалеподібного тіла зареєстровані в його

латеральній частині (CeL) на рівнях -2,12 і -2,56 мм від брегми – $42,3 \pm 2,5$ та $58,5 \pm 1,9$ Fos-ір-нейронів відповідно, що майже в 10 разів більше, ніж у контролі). Найбільша кількість активованих нейронів в інсулярній корі (GI/DI) спостерігалася іпсилатерально

(відносно робочої передньої кінцівки) на рівні -2,56 мм – $165,5 \text{ од.} \pm 3,2 \text{ од.}$ У кортикальній групі ядер відмічалася іпсилатеральне домінування мічених клітин на середньому та каудальному рівнях, а максимальна кількість Fos-ір-нейронів була зареєстрована в

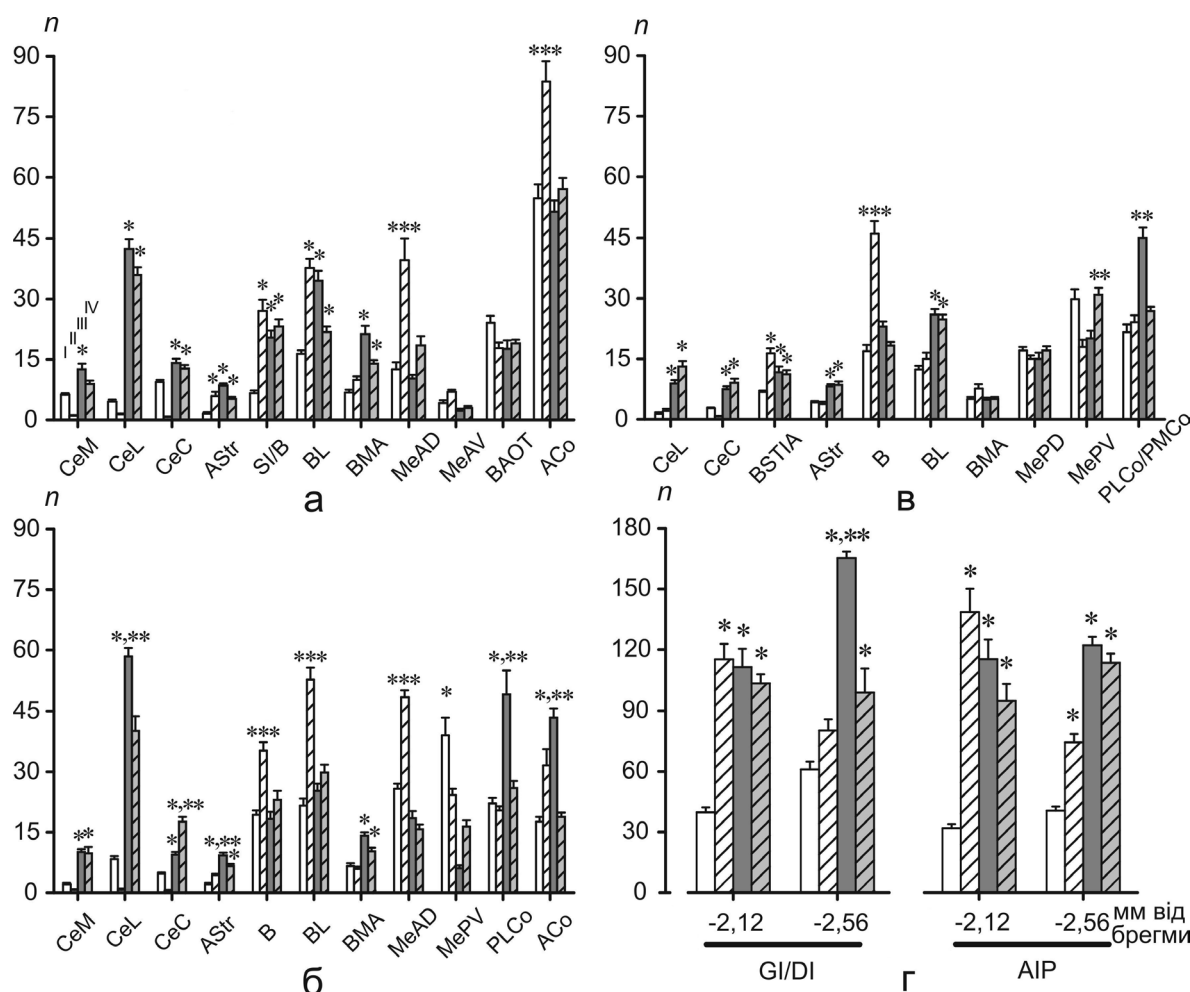


Рис. 2. Середня кількість (n) \pm стандартна похибка середнього Fos-імунореактивних (Fos-ір-) нейронів (на зріз) у під'ядрах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі. У під'ядрах мигдалеподібного тіла на рівнях -2,12 (а), -2,56 (б) і -3,14 мм (в) та інсулярній корі (г) на рівнях -2,12 і -2,56 мм від брегми за атласом мозку щура [31]. I, II – середня кількість Fos-ір-нейронів (унілатерально) у мозку інтактних щурів і тварин, що голодували відповідно; III, IV – у мозку тварин після виконання стереотипних їждобувних рухів (іпси- та контралатерально відповідно). *P < 0,05 вірогідні різниці між значеннями середньої кількості мічених нейронів у мозку інтактних щурів та тварин, котрі голодували або таких, що виконували їждобувні рухи, **P < 0,05 – між іпси- та контра-латеральним боками мозку тварин, що виконували їждобувні рухи, ***P < 0,05 між значеннями середньої кількості Fos-ір-нейронів у мозку тварин, що голодували, з інтактними або тваринами, що виконували їждобувні рухи. Структури: АСo, PLCo, РМСo – переднє, заднє латеральне та заднє медіальне кортикальне ядро; АІP, DІ, GІ – задня агранулярна, дисгранулярна та гранулярна інсулярна кора; АSTr – мигдалестріатна перехідна ділянка; В – ядро Мейнерта; ВАOТ – опорне ядро нюхового тракту; ВL – базолатеральне ядро; ВМА – базомедіальне ядро; ВSТІА – опорне ядро термінального тяжа; СeC, СeL, СeМ – капсулярна, латеральна та медіальна частини центрального ядра; МeАD, МeАV, МePД, МePV – антеріодорсальна, антеріовентральна, постеріодорсальна та постеріовентральна частини медіального ядра; SІ – безіменна субстанція

PLCo і ACo на рівні $-2,56$ мм – $49,1 \pm 5,9$ та $43,3$ од. $\pm 2,3$ од. відповідно (див. рис. 2, 3).

НАДФН-діафоразна активність у структурах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі. Позитивні NO-генеруючі нейрони спостерігалися у всіх трьох частинах мигдалеподібного тіла та інсулярній корі, а їх середня кількість або щільність, у цих структурах, достовірно не відрізнялася у тварин усіх досліджуваних груп. На рис. 3, а–в структури з найбільш високою щільністю НАДФН-др-клітин відмічені сірим кольором. У MePV і CeM спостерігалися тільки слабо забарвлені реактивні клітини малого розміру (близько 10–15 мкм у діаметрі), а в MeAD, ACo та BMA серед невеликих слабо забарвлених реєструвалися поодинокі інтенсивно забарвлені NO-генеруючі нейрони великих розмірів (близько 20–25 мкм у діаметрі; рис. 4). В інсулярній корі (AIP та GI/DI) NO-генеруючі нейрони були зареєстровані в шарах 2 і 6 і мали невеликі

розміри – близько 10–15 мкм у діаметрі. Додатково відзначимо, що у латеральній і капсулярній частинах центрального ядра (CeL і CeC), а також в прилеглих структурах (AStr та BSTIA) відмічалася майже повна відсутність NO-генеруючих нейронів. У нашому дослідженні були також зареєстровані нейрони з подвійним забарвленням (Fos-ір + НАДФН-др). Такі нейрони відмічалися в MePV/BAOT (понад 5 одиниць на зріз), BL (понад 3 одиниць), ACo (понад 3 одиниць) та SI/V (понад 8 одиниць).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Активация ранніх генів відіграє ключову роль у запуску пластичних змін у мигдалеподібному тілі [11, 15, 20]. Такі гени швидкого реагування, як *c-fos*, є важливими посередниками для з'єднання короткотривалої нейронної активності зі змінами рівня транскрипції пізніх генів [16]. Було

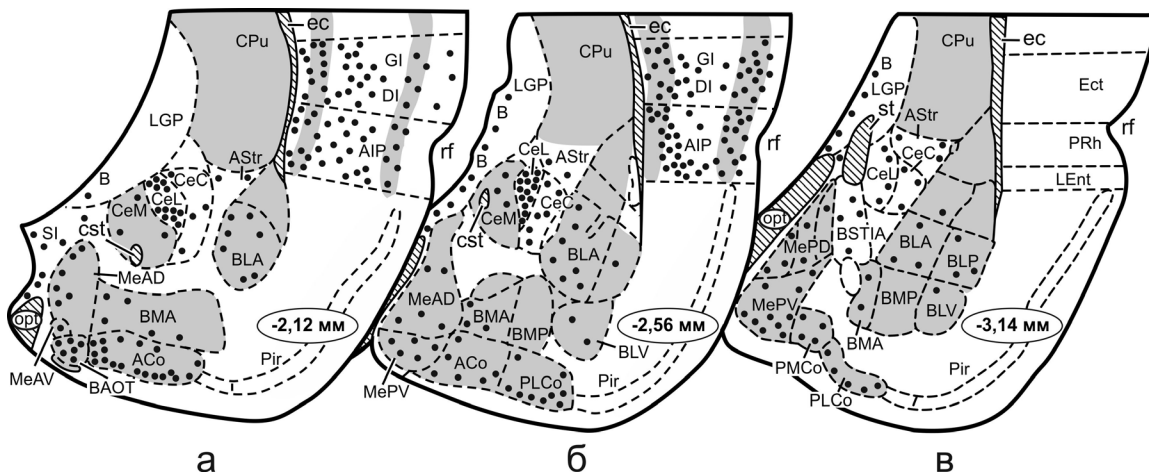


Рис. 3. Фронтальні плани зрізів мигдалеподібного тіла, прилеглих до нього структур та інсулярної кори на рівнях $-2,12$ (а), $-2,56$ (б) та $-3,14$ мм (в) від брегми. Показаний просторовий розподіл Fos-імунореактивних нейронів (чорні крапки, кожна крапка відповідає п'яти Fos-ір-нейронам) та НАДФН-діафоразна активність в окремих структурах (виділено сірим кольором). Структури: ACo, PLCo, PMCo – переднє, заднє латеральне та заднє медіальне кортикальне ядро; AIP, DI, GI – задня агранулярна, дисгранулярна та гранулярна інсулярна кора; AStr – мигдалестріатна перехідна ділянка; B – ядро Мейнерта; BAOT – опорне ядро нюхового тракту; BL – базолатеральне ядро; BMA – базомедіальне ядро; BSTIA – опорне ядро термінального тяжа; CeC, CeL, CeM – капсулярна, латеральна та медіальна частини центрального ядра; cst – комісуральна кінцева смужка; CPu – смугасте тіло; ec – зовнішня капсула; Ect – зовнішня нюхова кора; LEnt – латеральна частина внутрішньої нюхової кори; LGP – латеральна частина блідої кулі; MeAD, MeAV, MePD, MePV – антеріодорсальна, антеріовентральна, постеріодорсальна та постеріовентральна частини медіального ядра; opt – оптичний тракт; Pir – грушоподібна кора; PRh – навколонухова ділянка кори; rf – нюхова щілина; SI – безіменна субстанція; st – кінцева смужка

показано, що формування моторних навичок після навчання і закріплення оперантного рефлексу, пов'язано зі структурними та функціональними адаптивними змінами в мозку [18, 27]. Таким чином, виявлення в ядрах нервових клітин *c-Fos*-білка (продукту активації "раннього" гена *c-fos*), може бути потенціальним маркером тих нейронів мозку, які зазнають пластичних змін внаслідок реалізації оперантних їждобувних рухів.

Раніше вже підкреслювалося, що мигда-

леподібне тіло являє собою функціонально різноманітні скупчення нейронів, схильних до специфічних пластичних змін під впливом різноманітних мотиваційно-афективних поведінкових реакцій. Відповідно до результатів наших експериментів, у щурів після реалізації оперантних їждобувних рухів на 12-ту добу тренування виявлялися достовірно більш високі рівні *Fos*-імунореактивності у центральному ядрі та інсулярній корі, порівняно з контролем ($P < 0,05$). Основний

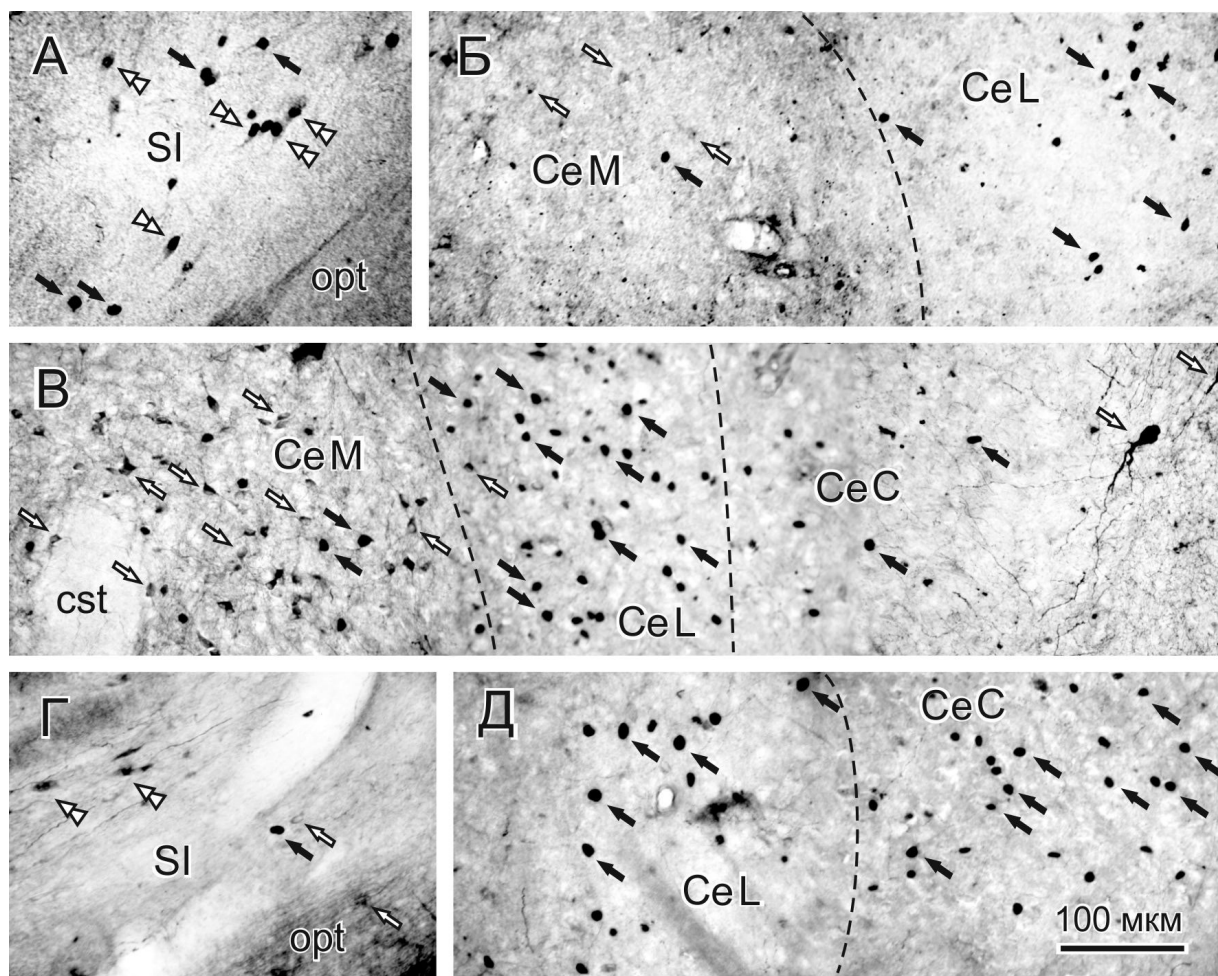


Рис. 4. *Fos*-імунореактивні (*Fos-ir*-) та НАДФН-діафоразореактивні (НАДФН-др-) нейрони у центральному ядрі мигдалеподібного тіла та безімненній субстанції: а, б – фронтальні зрізи мозку щура після голодування (на рівні -2,56 мм від брегми); в – після виконання оперантних рефлексів (на рівні -2,56 мм); г, д – після виконання оперантних рефлексів (на рівні -3,14 мм). Чорні стрілки – ядра *Fos-ir*-нейронів, білі – НАДФН-др-нейрони, подвійні білі – нейрони з подвійним міченням (*Fos-ir* + НАДФН-др). Структури: CeC, CeL, CeM – капсулярна, латеральна та медіальна частини центрального ядра; cst – комісуральна кінцева смужка; opt – оптичний тракт; SI – безімненна субстанція. Масштабна лінія на (д) – 100 мкм, відповідає всім фрагментам.

фокус експресії білка Fos знаходиться у CeL (див. рис. 2, 3). Однак у центромедіальній частині мигдалеподібного тіла (MePD), а також у прилеглий структурі (B) достовірних відмінностей у кількості мічених клітин у мозку щурів 3-ї групи порівняно з нормою не спостерігалось. Такі зміни різко контрастують з достовірно нижчим рівнем експресії *c-Fos* у центральному ядрі та значно вищим – у медіальному під'ядрі (MeAD) під час голодування (див. рис. 2). Характерно, що у моторній корі щурів після напрацювання моторних навичок було виявлено незначне пригнічення *c-Fos*- імунореактивності [6]. Навпаки, у лімбічних структурах базальної частини переднього мозку (ядра вертикальної і горизонтальної гілки діагональної смужки, великоклітинне преоптичне ядро та паравентрикулярне ядро гіпоталамуса), зареєстровано достовірно більшу кількість *Fos*-ір-нейронів порівняно з контролем [2, 4].

Дані сучасних нейроанатомічних, нейрофізіологічних та електронно-мікроскопічних досліджень дають підстави зробити припущення про те, що активація або гальмування нейронів медулярних центрів серцево-судинної регуляції тварин під час реалізації ними оперантних їждобувних моторних програм значною мірою забезпечується надходженням до цих центрів прямих команд від моторної та інсулярної кори, а також підкірковими впливами [10, 14, 35]. Серед підрозділів мигдалеподібного тіла центральне ядро є важливою лімбічною структурою переднього мозку, яка причетна до генерації кардіоваскулярних, респіраторних і вісцеральних реакцій під час формування та реалізації цілеспрямованих рухів у тварин. Це стає можливим завдяки реципрокним зв'язкам медулярних центрів із багатьма лімбічними структурами та центрами мозку, які включаються в регуляцію автономних функцій [33].

Характерно, що реалізація поведінкових їждобувних оперантних рухів супроводжується фазними і тонічними серцево-судинними реакціями з яскраво вираженим

парасимпатичним компонентом у кінцевій фазі (захоплення їжі) [3]. Водночас тривала стимуляція скелетних м'язів викликає у тварин стійкі фазні кардіоваскулярні реакції, які пов'язані з підвищенням симпатичного тону та пригніченням парасимпатичної активності [10]. Раніше нами було встановлено, що під час унілатеральної електричної стимуляції дорсальних м'язів шиї щурів основні фокуси експресії *c-Fos* виявлялися у CeC, MeAD і BMA [25]. У цьому дослідженні показано, що після реалізації тваринами оперантних рефлексів основний фокус локалізації *Fos*-ір-нейронів знаходиться у CeL, хоча в CeM і CeC також була зареєстрована достовірна різниця у кількості мічених клітин порівняно з нормою (див. рис. 2, а–в). Відмітимо, що загальна кількість *Fos*-ір-нейронів у BL також була достовірно більшою, ніж у нормі. Структури мигдалеподібного тіла Ce та BL можна розглядати як “мотиваційно-афективний центр”. Крім цих структур ключову роль у психофізіологічному контролі сомато-кардіоваскулярної інтеграції відіграють інсулярна та сенсомоторна кора головного мозку, а також паравентрикулярне ядро гіпоталамуса, безіменна субстанція та ядро Мейнерта [14, 35].

Треба зазначити, що під'ядро мигдалеподібного тіла CeC розглядають як “ноцицептивний центр”, який не тільки контролює передачу сигналів у низхідних антиноцицептивних ланцюгах, але й причетний до розвитку фазних і тонічних серцево-судинних рефлексів з домінуванням симпатичного компонента [24, 28]. Морфологічні дані також підтверджують наявність прямих гальмівних (ГАМК-ергічних) проєкцій під'ядер CeL та CeM до автономних центрів довгастого мозку, які задіяні у регуляцію фазних і тонічних кардіоваскулярних рефлексів з домінуванням парасимпатичного компонента [13, 33].

Недавні нейроанатомічні дослідження продемонстрували, що НАДФН-др-/NO-генеруючі нейрони знаходяться у всіх трьох групах ядер мигдалеподібного тіла

[37]. Результати нашої роботи вказують на те, що кількість і щільність таких клітин у різних частинах мигдалеподібного тіла неоднакова. Ми встановили, що великі скупчення таких клітин відмічаються тільки в центромедіальній і кіркоподібній частинах, а невелика їх кількість – в базолатеральній. Відмітимо, що центромедіальна група ядер містить як слабо, так і інтенсивно забарвлені NO-генеруючі нейрони. Крім того, в деяких під'ядрах CeL, CeC, VM та ACo знаходяться поодинокі інтенсивно забарвлені NO-генеруючі нейрони великих розмірів, однак подвійне забарвлення таких клітин спостерігалось тільки в ACo.

Відомо, що NO є газовим нейромедіатором, який задіяний у регуляцію передачі ноцицептивної інформації [26, 32]. Показано [29], що підшкірна ін'єкція капсаїцину (больового подразника) щурам значно підвищувала продукцію NO у під'ядрах Me та ACo. Однак при дослідженні стрес-індукованої активації NO-генеруючих нейронів у мозку щура було встановлено, що подвійно забарвлені (Fos-ір + НАДФН-др) нейрони реєструвалися у великій кількості у під'ядрах BLA та VLP мигдалеподібного тіла [21]. Впливи NO-системи на виділення глутамату та ГАМК у цих центрах є важливим фактором, який сприяє залученню мигдалеподібного тіла у формування та реалізацію їждобувних оперантних рефлексів [29]. Можливо також припустити, що NO причетний до розвитку гальмівних процесів не тільки в центрах регуляції автономних функцій, але й в інших лімбічних центрах головного мозку [7, 22].

Підсумовуючи, можна вважати, що описані патерни розподілу Fos-ір-нейронів у під'ядрах мигдалеподібного тіла, особливо у CeL та CeM, свідчать, що їх прямі еферентні проєкції до автономних медулярних центрів довгастого мозку відіграють важливу роль у модуляції симпатичної активності в період реалізації тваринами їждобувних рухів [1, 3, 35].

А.В. Довгань, О.В. Власенко, Т.В. Бузика, В.А. Майський, А.І. Пілявський, А.В. Мазниченко

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *C-FOS* В ЯДРАХ МИНДАЛИНЫ И ЧАСТОТЫ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ПИЩЕДОБЫВАТЕЛЬНЫХ СТЕРЕОТИПНЫХ ДВИЖЕНИЙ У КРЫС

Исследовали распределение Fos-иммунореактивных (Fos-ир-) и НАДФН-диафоразореактивных (НАДФН-др-) нейронов в подъядрах миндалины и инсулярной коре крыс (на уровнях от -2,12 до -3,14 мм от брегмы), а также выявляли изменения частоты сердечных сокращений (ЧСС) у интактных животных, после пищевой депривации и реализации животными пищедобывательных движений. Достоверное увеличение количества Fos-ир-нейронов было обнаружено в мозгу крыс, осуществлявших оперантные движения (по сравнению с другими группами животных) как в центральном ядре миндалины, так и инсулярной коре на всех исследуемых уровнях. Основной фокус локализации Fos-ир-нейронов в миндалине был зарегистрирован в латеральной части центрального ядра (58,5 ед. ± 1,9 ед. в срезе 40 мкм) на уровне -2,56 мм. Достоверное превышение среднего количества активированных нейронов обнаружено также в медиальном и капсулярном подъядрах центрального ядра. В гранулярной/дисгранулярной инсулярной коре количество Fos-ир-клеток составило 165,5 ед. ± 3,2 ед. Однако средние количества и плотность НАДФН-др-нейронов в исследованных структурах мозга у животных всех групп достоверно не отличались. У крыс, реализующих пищедобывательные движения, были зарегистрированы нейроны с двойным окрашиванием (Fos-ир + НАДФН-др) в медиальном, базолатеральном, переднем кортикальном ядрах миндалины и безымянной субстанции. Было обнаружено, что выполнение животными оперантных движений передней конечностью в течение повторных сеансов тренировки сопровождается постепенным снижением (на 5–12 %) усредненных значений ЧСС с последующим восстановлением их до исходных значений (тонический компонент). Анализ динамики ЧСС в течение реализации отдельных целенаправленных движений выявил период быстротекущего (500 мс) понижения ЧСС, которое совпадало с конечной фазой захвата пищевого шарика (фазный компонент). Предполагается, что обнаруженные фокусы Fos-иммунореактивности в латеральной и медиальной частях центрального ядра миндалины, а также инсулярной коре и безымянной субстанции свидетельствуют о том, что указанные структуры мозга причастны к формированию целенаправленных движений. Прямые проекции указанных ядер (и гипоталамуса) на кардиоваскулярные центры продолговатого мозга могут обуславливать выявленные изменения в деятельности сердечно-сосудистой системы животных в период реализации ими целенаправленных движений.

Ключевые слова: оперантный рефлекс, *c-fos* экспрессия, НАДФН-диафоразная реактивность, миндалина, инсулярная кора, крыса.

A.V. Dovgan', O.V. Vlasenko, T.V. Buzyka,
V.A. Maisky, A.I. Pilyavskii, A.V. Maznychenko

**FOOD-PROCURING STEREOTYPE
MOVEMENTS IS ACCOMPANIED BY
CHANGES OF C-FOS GENE EXPRESSION IN
THE AMYGDALA AND MODULATION OF
HEART RATE IN RATS**

The distribution of Fos-immunoreactive (Fos-ir) and NADPH-diaphorase reactive (NADPH-dr-) neurons in the different subnuclei of amygdala and insular cortex (on the level -2,12 to -3,14 mm from bregma), and the associated changes of heart rate (HR) in intact, food-deprived and executed food-procuring movements of rats were studied. In comparison with other groups of animals, the mean number of the Fos-ir neurons in the central nucleus of amygdala (Ce) and the insular cortex (GI/DI) at all studied levels was significantly greater in the executed food-procuring movements in rats. The main focus of localization of the Fos-ir neurons was found in lateral part of the Ce ($58,5 \pm 1,9$ units in 40- μ m-thick section) at the level -2,56 mm. The mean number of Fos-ir neurons was significantly greater also in the lateral and capsular parts of the Ce. The mean number of Fos-ir neurons in the GI/DI was $165,5 \pm 3,2$ cells in section. The number and density of NADPH-d reactive neurons was not significantly different in the brain structures of all animal groups studied. The double stained neurons (Fos-ir + NADPH-dr) were registered in medial, basolateral, anterior cortical amygdaloid nuclei and substantia innominata (SI) in rats after realization food-procuring movements. It was found that realization of food-procuring movements by the forelimb during repeated sessions was accompanied with the gradual decline of mean values of the HR (from 5% to 12% of control level) with subsequent renewal of them to the initial values (tonic component). The analysis of dynamics of the HR changes during realization of separate purposeful motion has shown the transient period of the HR suppression (500 ms), which coincided with the terminal phase of grasping of food pellet (phasic component). We suggest that the revealed focuses of localization of Fos-ir neurons in the lateral and medial subregions of amygdaloid Ce and also GI/DI, and SI testified that these structures of brain are involved in generation of the goal-directed motions. Direct projections of these subnuclei (and hypothalamus) to the cardiovascular centers of the medulla determine the associated regulation of the cardiovascular system function in the period of realization of the goal-directed motions in animals.

Key words: operant reflex, *c-fos* expression, NADPH-d reactivity, amygdala, insular cortex, rat.

M.I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa;

I.I. Mechnikov National University, Odessa;

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Довгань А.В., Власенко О.В., Мазниченко А.В., Пи-

лявский А.И., Майский В.А. Оперантные рефлекс и экспрессия гена *c-fos* в ядрах миндалины и инсультной коре крыс // *Нейрофизиология / Neurophysiology*. – 2011. – **43**, №3. – С. 277–280.

2. Довгань О.В., Власенко О.В., Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В. Топографія Фос-імунореактивних та НАДФН-д-реактивних нейронів у лімбічних структурах основи переднього мозку та гіпоталамусі при реалізації мотивованих стереотипних рухів у щурів // Там само. – 2009. – **41**, № 1. – С. 32–40.
3. Власенко О.В., Бузыка Т.В., Майский В.А., Пилявский А.И., Мазниченко А.В. Активация нейронов медуллярных центров автономной нервной системы крыс при реализации ими мотивированных оперантных движений // Там само. – 2010. – **42**, № 5. – С. 390–404.
4. Власенко О.В., Довгань О.В., Пілявський О.І., Майський В.О., Мазниченко А.В. Зміни *c-fos* експресії та НАДФН-діафоразної активності в різних ядрах гіпоталамуса під час відсторонення від їжі або реалізації оперантних їждобувних рухів у щурів // Там само. – 2009. – **41**, №2. – С. 173–182.
5. Власенко О.В., Рокунець І.Л., Чечель В.В. Телеметрична восьмиканальна система передачі фізіологічних параметрів лабораторних тварин // *Актуальні проблеми сучасної медицини*. – 2010. – **10**, № 1. – С. 9–14.
6. Власенко О.В., Пилявский А.И., Майский В.А., Мазниченко А.В. Fos-иммунореактивность и НАДФН-д-реактивность в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью // *Нейрофизиология / Neurophysiology*. – 2008. – **40**, № 4. – С. 351–361.
7. Мойбенко А.А., Павлюченко В.Б., Даценко В.В., Майский В.А. Роль оксида азота в механизмах формирования рефлекторных вазомоторных реакций // *Успехи физиол. наук*. – 2005. – **36**, № 4. – С. 3–12.
8. Мороз В.М., Йолтухівський М.В., Власенко О.В. Латеральний гіпоталамус і префронтальна кора в організації довільних рухів. – Вінниця-Київ: Центр. метод. кабінет з вищ. мед. освіти, 1998. – 181 с.
9. Пат. 15851 UA, МПК А61В 5/04. Пристрій для телеметричної передачі імпульсної активності нейронів / Мороз В.М., Чечель В.В., Власенко О.В., Рокунець І.Л., Йолтухівський М.В. (UA); – Він. нац. мед. ун. ім М.І. Пирогова. – № u2005 12762; опубл. 17.07.2006, Бюл. № 7.
10. Ally A. Ventrolateral medullary control of cardiovascular activity during muscle contraction // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1998. – **23**. – P. 65–86.
11. Anokhin K.V., Ryabinin A.E., Sudakov K.V. Expression of the *c-fos* gene in the mouse brain during the acquisition of defensive behavior habits // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 2001. – **31**. – P. 139–143.
12. Barot S.K., Bernstein I.L. Polycose taste pre-exposure fails to influence behavioral and neural induces of taste novelty // *Behav. Neurosci.* – 2005. – **119**. – P. 1640–1647.
13. Batten T.F., Gamboa-Esteves F.O., Saha S.A. Evidence for peptide co-transmission in retrograde- and anterograde-labelled central nucleus of amygdala neurones projecting

- to NTS // *Auton. Neurosci.* – 2002. – **98**. – P. 28–32.
14. Dampney R.A., Horiuchi J. Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using *c-fos* gene expression // *Prog. Neurobiol.* – 2003. – **71**. – P. 359–384.
 15. Gallagher M., Graham P.W., Holland P.C. The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior // *J. Neurosci.* – 1990. – **10**. – P. 1906–1911.
 16. Herdegen T., Leah J.D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins // *Brain Res. Rev.* – 1998. – **28**. – P. 370–490.
 17. Hsu S.-M., Raine L., Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures // *J. Histochem. Cytochem.* – 1981. – **29**. – P. 577–580.
 18. Kleim J.A., Lussnig E., Schwarz E.R., Comery T.A., Greenough W.T. Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning // *J. Neurosci.* – 1996. – **16**. – P. 4529–4535.
 19. Knapska E., Radwanska K., Werka T., Kaczmarek L. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 1113–1173.
 20. Koh M.T., Wilkins E.E., Bernstein I.L. Novel tastes elevate *c-fos* expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning // *Behav. Neurosci.* – 2003. – **117**. – P. 1416–1422.
 21. Krukoff T.L., Khalili P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 1997. – **377**. – P. 509–519.
 22. Maisky V.A., Datsenko V.V., Moibenko A.A., Bugaychenko L.A., Pilyavskii A.I., Kostyukov A.I., Kalezic I., Johansson H. NO-generating neurons in the medullary cardiovascular centers of rodents and carnivores // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2003. – **136**. – P. 605–612.
 23. Maisky V.A., Pilyavskii A.I., Kalezic I., Ljubisavljevic M., Kostyukov A.I., Windhorst U., Johansson H. NADPH-diaphorase activity and *c-fos* expression in medullary neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // *Auton. Neurosci.* – 2002. – **101**. – P. 1–12.
 24. Manning B.H., Martin W.J., Meng I.D. The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception // *Neuroscience.* – 2003. – **120**. – P. 1157–1170.
 25. Maznychenko A.V., Pilyavskii A.I., Kostyukov A.I., Lyskov E., Vlasenko O.V., Maisky V.A. Coupling of *c-fos* expression in the spinal cord and amygdala induced by dorsal neck muscles fatigue // *Histochem. Cell Biol.* – 2007. – **128**. – P. 85–90.
 26. Meller S.T., Gebhart G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord // *Pain.* – 1993. – **52**. – P. 127–136.
 27. Monfils M.H., Plautz E.J., Kleim J.A. In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience // *Neuroscientist.* – 2005. – **11**. – P. 471–483.
 28. Neugebauer V., Li W., Bird G.C., Han J.S. The amygdala and persistent pain // *Neuroscientist.* – 2004. – **10**. – P. 221–234.
 29. Okere C.O., Kaba H., Higuchi T. Importance of endogenous nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and amygdala in mediating the response to capsaicin // *J. Comp. Neurol.* – 2000. – **423**. – P. 670–686.
 30. Park T.H., Carr K.D. Neuroanatomical patterns of *fos*-like immunoreactivity induced by a palatable meal and meal-paired environment in saline- and naltrexone-treated rats // *Brain Res.* – 1998. – **805**. – P. 169–180.
 31. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – San Diego: Acad. Press, 1997.
 32. Pilyavskii A.I., Maznychenko A.V., Maisky V.A., Kostyukov A.I., Hellstrom F., Windhorst U. Capsaicin-induced effects on *c-fos* expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – **521**. – P. 70–78.
 33. Saha S. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2005. – **32**. – P. 450–456.
 34. Sequeira H., Ba-M'hamed S. Pyramidal control of heart rate and arterial pressure in cats // *Arch. Ital. Biol.* – 1999. – **137**. – P. 47–62.
 35. Sequeira H., Viltart O., Ba-M'hamed S., Poulain P. Cortical control of somato-cardiovascular integration: neuroanatomical studies // *Brain Res. Bull.* – 2000. – **53**. – P. 87–93.
 36. Swanson L.W., Petrovich G.D. What is the amygdala? // *Trends Neurosci.* – 1998. – **21**. – P. 323–331.
 37. Usunoff K.G., Itzev D.E., Rolfs A., Schmitt O., Wree A. Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat // *Anat. Embryol. (Berl.)*. – 2006. – **211**. – P. 721–737.
 38. Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // *Neuroscience.* – 1992. – **46**. – P. 755–784.

Вінницьк. нац. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова МОЗ України;
 Одеський нац. ун-т ім. І.І. Мечникова;
 Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
 E-mail: vlasenko@vsmu.vinnica.ua

Матеріал надійшов до
 редакції 13.03.2012