

О. В. ВЛАСЕНКО¹, Е. П. МАНЬКОВСКАЯ², А. В. МАЗНИЧЕНКО²,
А. И. ПИЛЯВСКИЙ², В. А. МАЙСКИЙ²

ИЗМЕНЕНИЯ FOS-ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ В МОТОРНОЙ КОРЕ КРЫС, РЕАЛИЗУЮЩИХ ОПЕРАНТНЫЕ ДВИЖЕНИЯ, ПОСЛЕ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ БЛОКАТОРА NO-СИНТАЗЫ

Поступила 14.08.2012.

Проведено сравнительное изучение иммунореактивности по отношению к белку *c-Fos* в первичной моторной коре (области *MI*) мозга крыс. Выявлена специфика соответствующих паттернов во II–VI слоях этой зоны у интактных животных и крыс, реализовавших оперантные пищедобывательные рефлексы, в контроле и после предварительных системных инъекций блокатора нейронной синтазы оксида азота (nNOS) 7-нитроиндазола (7-NI). Средние значения плотности распределения Fos-иммунопозитивных (Fos-ип-) нейронов во II–III слоях области *MI* на уровнях +2.7 и +2.2 мм от брегмы у крыс после предварительной инъекции 7-NI, а также у животных, реализующих оперантные рефлексы, были достоверно ниже, чем в группе контроля. В глубоких же слоях коры (IV–VI) данной зоны у крыс, реализовавших оперантные пищедобывательные рефлексы, после инъекции 7-NI обнаруживалось достоверно большее количество Fos-ип-нейронов на стороне мозга, контралатеральной по отношению к рабочей конечности. Предполагается, что генерирующие NO НАДФ-Н-диафоразореактивные клетки зоны *MI* и афферентные проекции от подкорковых лимбических центров, расположенные в этой области, участвуют в формировании специфических паттернов нейронной активности в исследованных слоях коры. Подавление активности nNOS при системном введении животным 7-NI может разнонаправлено модулировать нейронную активность в поверхностных и глубоких слоях *MI* как у контрольных крыс, так и у животных, реализующих оперантные пищедобывательные рефлексы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *c-Fos*, нейронная NO-синтаза (nNOS), блокатор синтеза NO 7-NI, моторная кора, оперантный пищедобывательный рефлекс.

ВВЕДЕНИЕ

Нейронная синтаза оксида азота (nNOS), которая обеспечивает продукцию NO, обнаруживается в ГАМК-содержащих кортикальных интернейронах [1], а также в афферентных холинергических волокнах, поступающих в кору из безымянной субстанции и ядра Мейнерта [2, 3]. Клетки, содержащие в себе nNOS, могут быть идентифицированы гистохимически согласно наличию в них фермента НАДФ-Н-диафоразы (НАДФ-Н-д). Недавно было установлено, что функциональное выключение

NOS-содержащих нейронов приводит к развитию процесса растормаживания в корковых нейронных сетях [4].

Известно, что экспрессия гена *c-fos* находится в тесной связи с интенсивностью нейронной активности в тех или иных структурах мозга, в том числе в неокортексе. В период выработки и реализации животными повторных оперантных пищедобывательных движений были выявлены специфические паттерны экспрессии белка ***c-Fos*** в различных слоях первичной моторной зоны коры мозга крыс [5].

В настоящем исследовании с использованием иммуногистохимической и гистохимической методик мы провели сравнительное исследование особенностей распределения Fos-иммунопозитивных (Fos-ип-) и НАДФ-Н-диафоразореактивных (НАДФ-Н-др-) нейронов в различных слоях области *MI* мозга крыс

¹ Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова МЗ Украины (Украина).

² Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: vlasenko@vsmu.vinnica.ua (О. В. Власенко).

emankovskaya@gmail.com (Е. П. Маньковская)

(в пределах представительства передней конечности). Соответствующие характеристики сравнивались у интактных крыс и животных после повторных реализаций оперантных пищедобывательных рефлексов в условиях нормального функционирования системы nNOS и подавления синтеза NO в результате предварительных системных инъекций блокатора данной системы 7-нитроиндазола (7-NI).

МЕТОДИКА

Были исследованы четыре группы крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г (по четыре животных в каждой). Группу 1 составили интактные животные, группу 2 – также интактные крысы, которым за 60 мин до перфузии и забора материала внутрибрюшинно инъецировали 30 мг/кг 7-NI (“Sigma”, США). Животные групп 3 и 4 с высоким уровнем пищевой мотивации (голодание в течение суток) осуществляли многократные стереотипные пищедобывательные оперантные движения – захват шариков корма передней конечностью из трубовидной кормушки. Такая оперантная моторная активность реализовывалась в ходе 12 ежедневных тренировочных сеансов длительностью по 30 мин. Крысам группы 4 за 30 мин до начала последнего тренировочного сеанса делались инъекции 30 мг/кг 7-NI. Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с Европейской директивой Совета сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС).

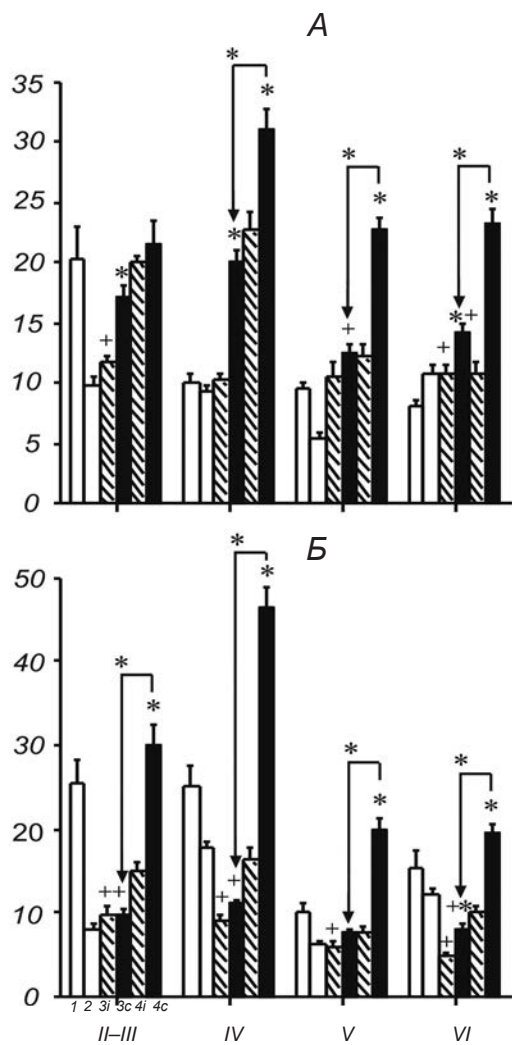
Крыс групп 1 и 2 и экспериментальных животных групп 3 и 4 (последних – через 1.5 ч после окончания финальной тренировки) под глубоким наркозом (пентобарбитал натрия, 90 мг/кг, внутрибрюшинно; “Sigma”, США) перфузировали интракардиально через восходящую аорту фиксатором (4 %-ным раствором параформальдегида на фосфатном буфере). Головной мозг каждого животного извлекали, дополнительно фиксировали и выдерживали в растворе сахарозы (с целью криопротекции). На замораживающем микротоме изготавливали срезы мозга толщиной 40 мкм для дальнейшей иммуногистохимической и гистохимической обработки. Процедуры фиксации и окрашивания были подробно описаны ранее [6, 7].

В качестве индексов плотности Fos-ип-клеток подсчитывали их количество в единичных срезах мозга в пределах участков препаратов размером 200×200 мкм². Подсчет проводили во II–III,

IV, V и VI слоях зоны *MI* на фронтальных уровнях +2.7 и +2.2 мм от брегмы по атласу [8]; рассчитывали средние значения этих индексов ± ошибка среднего. Полученные значения сравнивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа вариаций (ANOVA). Если различия между средними были найдены, дополнительно применяли *post-hoc*-анализ Ньюмена–Кеулса. Межгрупповые различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В моторной коре интактных крыс основные скопления Fos-ип-нейронов и самая высокая их плотность регистрировались на уровнях +2.7 и +2.2 мм ростральнее брегмы во II и III слоях зоны *MI* в области представительства передней конечности – 20.4 ± 2.6 и 25.2 ± 2.4 единицы в тест-участках соответственно. В более глубоких слоях *MI* плотность распределения Fos-ип-нейронов на этих уровнях была примерно вдвое ниже. У крыс группы 2 (не выполнявших оперантных движений) Fos-иммунопозитивность в поверхностных слоях *MI* после ведения 7-NI оказалась значительно более слабой. Индексы плотности распределения Fos-ип-нейронов во II–III слоях коры животных данной группы на уровнях +2.7 и +2.2 мм от брегмы составляли лишь 8.2 ± 0.7 и 9.8 ± 0.8 (т. е. были примерно в два с половиной раза меньшими, чем в группе 1; $P < 0.05$) (рис. 1). По сравнению с интактными крысами группы 1 у животных, реализовавших оперантные пищедобывательные движения (группа 3), также наблюдались заметно меньшие значения средней плотности Fos-ип-нейронов во II–III слоях зоны *MI* на исследованных фронтальных уровнях. Так, на уровне +2.7 мм от брегмы средняя плотность в указанных слоях на контралатеральной стороне мозга по отношению к рабочей конечности составляла 17.4 ± 0.9 , а на уровне +2.2 мм – 9.9 ± 0.7 единицы. В то же время количество таких нейронов в более глубоких слоях было сравнимо с таковым в условиях контроля. У крыс же группы 4 (выполнявших оперантные движения) плотность Fos-ип-нейронов в контралатеральной (по отношению к рабочей конечности) зоне *MI* после предварительного блокирования NO-синтазы была существенно выше, чем аналогичные показатели у животных остальных трех групп (рис. 1). Так, контралатерально в IV слое зоны *MI* средние индексы плотности меченых нейронов на уровнях



Р и с. 1. Диаграммы средних значений плотности ($M \pm s.e.m$) Fos-иммунопозитивных (Fos-ип-) нейронов (их количество на тест-площади 200×200 мкм² в срезе толщиной 40 мкм) во II–VI слоях первичной моторной коры (MI) на фронтальных уровнях мозга +2.7 (А) и +2.2 (Б) мм от брегмы.

Под горизонтальной осью приведены номера групп (1–4) животных с обозначением ипси- (i) и контралатеральной (c) сторон мозга по отношению к рабочей левой конечности: 1 – средняя плотность Fos-ип-нейронов в MI у интактных контрольных животных, 2 – у животных после системных инъекций 7-нитроиндазола (7-NI), 3 – у крыс, реализовавших оперантные движения и 4 – у животных, выполнявших оперантные движения и подвергнутых системным инъекциям 7-NI. Звездочками над колонками указаны случаи достоверных различий ($P < 0.05$) плотности меченых нейронов на ипси- и контралатеральной сторонах мозга у крыс группы 3 или 4; звездочками над стрелками – случаи достоверных различий плотности нейронов на контралатеральной стороне мозга у крыс групп 3 и 4, а крестиками – у крыс групп 3 и 1 (контрольной) или 4 и 1.

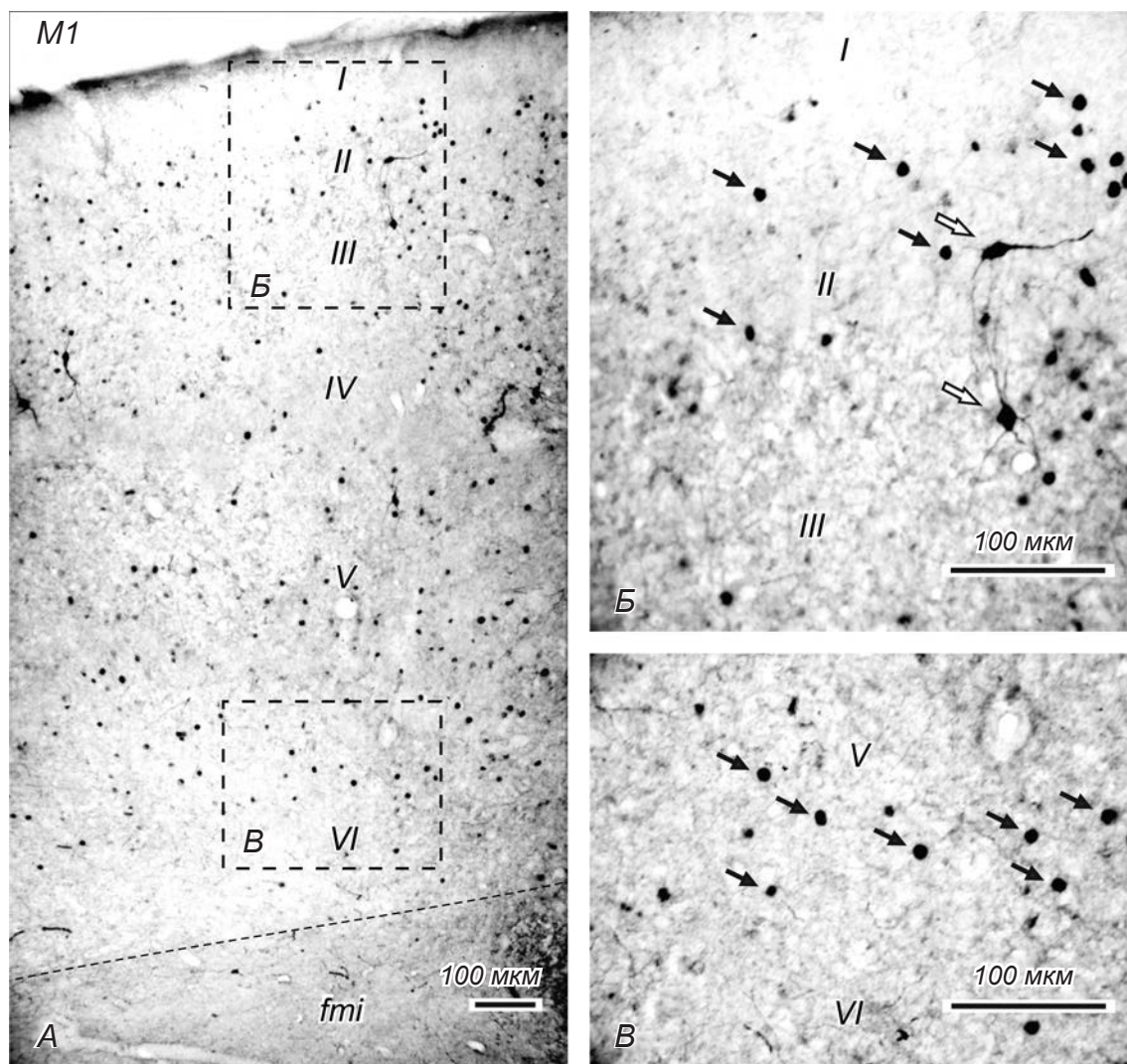
Р и с. 1. Діаграми середніх значень щільності ($M \pm s.e.m$) Fos-імунопозитивних нейронів (їх кількостей на тест-площі 200×200 мкм² у зрізі товщиною 40 мкм) у II–VI шарах первинної моторної кори на фронтальних рівнях мозку +2.7 (А) та +2.2 (Б) мм від брегми.

+2.2 и +2.7 мм от брегмы составляли 46.6 ± 2.2 и 31.1 ± 1.8 соответственно. Значительные количества Fos-ип-нейронов у животных группы 4 регистрировались в зоне MI контралатеральной стороны мозга также в остальных (II–III, V и VI) слоях коры (А, Б). Средние значения индексов плотности в этих слоях на уровне + 2.7 мм от брегмы составляли 21.7 ± 1.9 , 22.8 ± 1.0 и 23.2 ± 1.3 единицы соответственно.

Проявления НАДФ-Н-д-активности регистрировались в I–VI слоях MI у животных всех групп. При этом подобную реактивность демонстрировали только непиримидные нейроны и многочисленные афферентные волокна, восходящие в кору [2, 9]. Введение 7-NI не вызвало существенного уменьшения количества НАДФ-Н-др-единиц, поскольку указанный блокатор подавляет лишь собственно процесс генерации NO, не влияя на содер-

жание кофермента, вовлеченного в данный процесс (НАДФ-Н-диафоразы) [7].

Таким образом, мы подтвердили наличие достаточно выраженного дорсо-вентрального градиента плотности Fos-ип-нейронов в кортикальной зоне MI. Значительная плотность таких нейронов обнаруживалась во II и III слоях MI у интактных животных «оперантной» группы 2, наблюдаемые без блокирования NO-синтазы перед забором материала, могут быть связаны с пластическими изменениями в коре. Такие изменения обусловлены закреплением моторных навыков соответствующих пищедобывательных рефлексов, когда для поддержания уровня оперантной активности уже не требуется большой массы активированных кортикальных нейронов и происходит перераспределение количеств активных единиц между моторной корой и другими церебральными структурами, связанное с устойчивой выработкой двигательного автоматизма. В то же время существенное количество таких клеток в этих условиях сохраняется в глубоких слоях (IV и V). Достоверно большие ($P < 0.05$) значения плотности Fos-ип-нейронов во всех слоях MI на контралатеральной стороне мозга у крыс после предварительной системной инъекций 7-NI,



Р и с. 2. Микрофотографии Fos-иммунопозитивных (Fos-ип-) нейронов (окрашенные ядра) и НАДФ-Н-диафоразореактивных (НАДФ-Н-др) клеток в I–VI слоях первичной моторной коры на ипсилатеральной (относительно рабочей конечности) стороне мозга крысы с предварительной инъекцией блокатора нейронной NO-синтазы.

Черными стрелками обозначены Fos-ип-ядра, белыми – НАДФ-Н-др-нейроны и волокна. Прямоугольные участки, выделенные пунктирными линиями на *A*, представлены на *Б* и *В* с большим увеличением. *fmi* – малые щипцы мозолистого тела.

Р и с. 2. Мікрофотографії Fos-імунопозитивних нейронів (забарвлені ядра) та НАДФ-Н-діафоразореактивних клітин у I–VI шарах первинної моторної кори на іпсилатеральному (щодо робочої кінцівки) боці мозку щура з попередньою ін'єкцією блокатора нейронної NO-синтази.

по-видимому, связаны со значительным снижением активности тормозных NOS-содержащих нейронов в коре мозга [1, 10, 11].

Результаты настоящей работы дают основания полагать, что состояние системы NOS в моторной коре мозга и количество с-Fos-позитивных клеток в этой зоне соотносятся довольно сложным обра-

зом. Введение блокатора nNOS животным, которые не реализовывали специфической рефлекторной моторной активности и у которых присутствовало заметное количество Fos-ип-нейронов (прежде всего, в поверхностных слоях коры), обуславливало уменьшение числа таких единиц. В отличие от этого, у животных, длительно реализовывав-

ших оперантные пищедобывательные движения, после введения блокатора nNOS в моторной коре наблюдалось явно увеличенное количество Fos-ип-единиц, причем существенное количество таких клеток отмечалось именно в глубоких слоях коры (IV и V) контралатерально рабочей конечности, т. е. как раз в тех кортикальных локусах, которые наиболее непосредственно вовлечены в управление указанной моторной активностью (где формируются непосредственные кортикальные моторные команды на выполнение соответствующих движений). Таким образом, введение блокатора nNOS 7-NI определенным образом акцентирует различия между неактивированным и активированным состояниями моторной коры, снижая количество Fos-ип-нейронов в состоянии моторного покоя и в целом повышая количество таких единиц у животных, реализовавших интенсивную пищедобывательную моторную активность. Очевидно, что механизмы подобного феномена – взаимозависимости интенсивностей синтеза NO и экспрессии белка «быстрого реагирования» c-Fos – требуют специальных исследований.

О. В. Власенко¹, О. П. Маньківська², А. В. Мазниченко²,
О. І. Пілявський², В. О. Майський²

ЗМІНИ РІВНЯ FOS-ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ У МОТОРНІЙ КОРИ ЩУРІВ, ЯКІ РЕАЛІЗУВАЛИ ОПЕРАНТНІ РУХИ, ПІСЛЯ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕННЯ БЛОКАТОРА NO-СИНТАЗИ

¹ Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України (Україна).

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Проведено порівняльне вивчення імунореактивності щодо білка c-Fos у первинній моторній корі (області M1) мозку щурів. Виявлена специфіка відповідних патернів у II–VI шарах цієї зони в інтактних тварин і щурів, що реалізували оперантні їжодобувні рефлексії в умовах високої харчової мотивації в контролі та після попередніх системних ін'єкцій блокатора нейронної синтази оксиду азоту (nNOS) 7-нітроіндазолу (7-NI). Середні значення щільності розподілу Fos-імунопозитивних (Fos-іп-) нейронів у II–III шарах області M1 на рівнях +2.7 та +2.2 мм від брегми у щурів після попередньої ін'єкції 7-NI, а також у тварин, що реалізували оперантні рефлексії, були вірогідно нижчими, ніж у групі контролю. У глибоких же шарах кори (IV–VI) даної зони у щурів, що реалізували оперантні їжодобувні реф-

лексії, після ін'єкції 7-NI виявлялася вірогідно більша кількість Fos-іп-нейронів на боці мозку, контралатеральному щодо робочої кінцівки. Висловлено припущення, що розташовані в зоні M1 НАДФН-діафоразореактивні (ті що генерують NO) нейрони та аферентні проєкції від підкоркових лімбічних центрів мозку, беруть участь у формуванні специфічних патернів нейронної активності в досліджених шарах кори. Пригнічення активності (nNOS) при системному введенні тваринам 7-NI може різноспрямовано модулювати нейронну активність у поверхневих та глибоких шарах M1 як у контрольних щурів, так і у тварин, реалізуючих оперантні їжодобувні рефлексії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. X. H. Jaglin, J. Hjerling-Leffler, G. Fishell, and R. Batista-Brito, "The origin of neocortical nitric oxide synthase-expressing inhibitory neurons," *Front. Neural. Circ.*, **6**, 44 (2012).
2. O. V. Vlasenko, V. A. Maisky, A. V. Maznychenko, et al., "NADPH-diaphorase activity and neurovascular coupling in the rat cerebral cortex," *Фізіол. журн.*, **54**, № 1, 45-53 (2008).
3. M. M. Mesulan, E. J. Mufson, B. H. Wainer, et al., "Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6)," *Neuroscience*, **10**, 1185-1201 (1983).
4. D. Shlosberg, Y. Buskila, Y. Abu-Ghanem, and Y. Amitai, "Spatiotemporal alterations of cortical network activity by selective loss of NOS-expressing interneurons," *Front. Neural. Circ.*, **6**, 3 (2012).
5. О. В. Власенко, А. І. Пілявський, В. А. Майський и др., "Fos-иммунореактивность и НАДФН-д-реактивность в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **40**, № 4, 348-358 (2008).
6. S.-M. Hsu, L. Raine, and H. Fanger, "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures," *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981).
7. S. R. Vincent and H. Kimura, "Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain," *Neuroscience*, **46**, 755-784 (1992).
8. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press, San Diego (1997).
9. C. Iadecola, "Intrinsic signals and functional brain mapping: caution, blood vessels at work," *Cerebr. Cortex*, **12**, 223-224 (2002).
10. S. Yang and C. L. Cox, "Modulation of inhibitory activity by nitric oxide in the thalamus," *J. Neurophysiol.*, **97**, 3386-3395 (2006).
11. M. Silva, D. C. Aguiar, C. R. Diniz, et al., "Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced for expression in overlapping brain regions," *Cell Mol. Neurobiol.*, **32**, 443-453 (2012).
12. O. V. Vlasenko, A. V. Dovgan, V. A. Maisky, et al., "NADPH-diaphorase reactivity and neurovascular coupling in the basal forebrain and motor cortex," *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **39**, № 4/5, 405-407 (2007).