

ТОПОГРАФІЯ ФОС-ІМУНОРЕАКТИВНИХ ТА НАДФН-д-РЕАКТИВНИХ НЕЙРОНІВ У ЛІМБІЧНИХ СТРУКТУРАХ ОСНОВИ ПЕРЕДНЬОГО МОЗКУ ТА ГІПОТАЛАМУСІ ПРИ РЕАЛІЗАЦІЇ МОТИВОВАНИХ ОПЕРАНТНИХ РУХІВ У ЩУРІВ

Надійшла 10.12.08

У лімбічних структурах базальної частини переднього мозку та гіпоталамусі щурів визначали експресію “раннього” гена *c-fos* (маркер нейронної активації) та НАДФН-діафоразну активність (маркер NO-синтази) у нормі, у стані голодування та після реалізації тривалих (що повторювалися чотири–12 разів за хвилину протягом 30 хв) мотивованих стереотипних їждобувних рухів передньої кінцівки. Порівняно з контролем у тварин у стані голоду вірогідно більша ($P < 0.05$) кількість Фос-імунореактивних (Фос-ір-) та НАДФН-діафоразореактивних (НАДФН-др-) нейронів спостерігались у лімбічних структурах – медіальній перегородці (*MS*), ядрах вертикальної та горизонтальної гілок діагональної смужки (*VDB* і *HDB*), великоклітинному преоптичному ядрі (*MCPO*), комплексі безіменна субстанція – базальне ядро Мейнерта блідої кулі (*SI-GP(B)*), а також в ядрі покришки (*LDTg*), медіальній частині блідої кулі (*MGP*), паравентрикулярному та латеральному ядрах гіпоталамуса (*Pa* і *LH*) і острівцях Калеха (*ICj* і *ICjM*). У щурів експериментальної групи (тих, що виконували оперантні рухи) у лімбічних структурах та ядрах моста виявлялася більша середня щільність мічених нейронів у такій послідовності: $LDTg < SI < MCPO < GP(B) < MS < VDB < HDB$. Найбільша середня щільність Фос-ір-нейронів (13.8 ± 0.9 забарвленого ядра на ділянці зрізу 200×200 мкм²) була зареєстрована в *HDB*. В ядрах гіпоталамуса у щурів у стані голодування експресія *c-fos* була вдвічі вищою, ніж у контролі. Після реалізації оперантних рухів її інтенсивність у *LH* була дещо меншою, а в *Pa* – більшою. Найбільша щільність НАДФН-др-нейронів була виявлена в *Pa* (303.4 ± 18.7 клітини), в *ICj* і *ICjM* (287 ± 11.6 і 260 ± 8.7 нейрона відповідно) та *MGP* (93 ± 6.7 міченої клітини). В експериментальних щурів аналіз розподілу мічених нейронів показав високу щільність клітин із подвійною міткою (Фос + НАДФН-д-позитивність) у *Pa*, *MGP*, *ICj* та *ICjM*. Відмічена специфіка зміни експресії *c-fos* та НАДФН-д-реактивності в гіпоталамусі, вірогідно, корелює з формуванням мотиваційних сигналів, пов’язаних із затримкою та подачею їжі. Зміни нейронної активності в лімбічних структурах відображають їх причетність до формування програм їждобувних рухів та їх реалізації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мотивація, оперантний рефлекс, експресія *c-fos*, НАДФН-д, оксид азоту, лімбічні структури, гіпоталамус.

ВСТУП

Моторна кора великих півкуль та лімбічні структури базальної частини переднього мозку у людини і тварин є ключовими церебральними структурами,

котрі забезпечують формування мотивованих рухових програм і реалізацію оперантних (інструментальних) рефлексів [1]. Нещодавно було показано, що гіпоталамус відіграє провідну роль в ініціації як мотиваційно-афективного, так і вегетативного компонентів при реалізації таких програм [2–4]. Результати електрофізіологічних досліджень дозволяють стверджувати, що латеральний гіпоталамус є найважливішим компонентом активації лімбічних підкоркових центрів і кори мозку, без-

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

² Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: vlasenko@vsmu.vinnica.ua (О. В. Власенко).

посередньо причетних до керування їждобувними рухами [2]. Решта гіпоталамічних ядер також можуть брати участь в ініціації оперантних рефлексів та керуванні ними, але рівень активації нейронів у цих ядрах у стані високої харчової мотивації (голодування) або при виконанні їждобувних оперантних рефлексів детально не досліджувався.

Одержані раніше на щурах дані імуногістохімічних досліджень [5] свідчать про те, що в лімбічних структурах переднього мозку – медіальній пергородці, ядрах вертикальної та горизонтальної гілок діагональної смужки, а також великоклітинному ядрі та безіменній субстанції разом з базальним ядром Мейнерта – містяться чотири групи холінергічних нейронів (СН1–СН4 відповідно). У моторній корі виявлені численні холінергічні проєкції від структур основи переднього мозку [6]. Експериментальне руйнування останніх призводить до порушення компонента досягнення цілі в перебігу їждобувних рухів [7]. У вказаних лімбічних структурах присутні також NO-генеруючі нейрони. Велика кількість таких клітин були знайдені нами в паравентрикулярному та супраоптичному ядрах гіпоталамуса [8, 9]. Застосування блокаторів синтази NO призводило до зниження активності даного ензиму в гіпоталамусі щурів, і це також супроводжувалося пригніченням поведінки, пов'язаної з харчуванням [10]. Показано, що NO-генеруючі нейронні системи причетні до регуляції регіонального церебрального кровообігу (РЦКО). Про це свідчить тісна кореляція між інтенсивністю сумарної активності NO-генеруючих нейронів у корі (непірамідні ГАМК-ергічні нейрони) і нейронів базальної частини переднього мозку та станом РЦКО [4, 11–14].

Метою нашого дослідження було виявити особливості розподілу нейронів з підвищеним рівнем активації в лімбічних підкоркових центрах та паравентрикулярному й латеральному ядрах гіпоталамуса у тварин (щурів) у стані голодування або при реалізації інтенсивної мотивованої їждобувної моторної активності. Вивчався кількісний розподіл Фос-імунореактивних (Фос-ір-), НАДФН-діафоразореактивних (НАДФН-др-) одиниць та нейронів із подвійним забарвленням (Фос- + НАДФН-д-позитивних клітин) у вказаних структурах. Одержані дані свідчать, про те, що кількість активованих нейронів у гіпоталамусі та холінергічних структурах щурів, котрі знаходяться у стані голодування, значно перевищує таку у контрольних тварин. У щурів у період реалізації мотивованих їждобувних рухів

ця кількість дещо менша, але в цілому теж перевищує контрольні значення.

МЕТОДИКА

Експериментальні групи. У дослідях були використані три групи щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г. Інтактна група 1 ($n = 4$) отримувала достатнє стандартне харчування й слугувала контролем. Щури групи 2 ($n = 4$) голодували протягом трьох днів при вільному доступі до води. У тварин групи 3 створювалася достатня харчова мотивація (голодування протягом доби перед кожним сеансом тренування), і у них вироблявся оперантний їждобувний рефлекс. Тренувальні сеанси тривалістю 30 хв проводилися щоденно протягом 12 днів. Щури навчалися реалізовувати стереотипні рухи захоплення передньою лівою кінцівкою та її пальцями харчових кульок з годівниці (чотири–12 захватів їжі за хвилину, близько 150–200 штук за один сеанс). Усі експериментальні процедури були виконані відповідно до Європейської директиви Ради співтовариств від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Виготовлення зрізів мозку. Щурів груп 1, 2 та 3 (останніх – через 2 год після закінчення завершального тренувального сеансу) під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, внутрішньоочеревинно; “Sigma”, США) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ, 0.1 М, 250 мл), що містить у собі 0.2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Перфузію продовжували 4 %-вим параформальдегідом, розчиненим у 500 мл СФБ (рН 7.3). Головний мозок кожної тварини швидко виділяли й додатково фіксували в цьому розчині протягом 12 год. Потім блоки тканини мозку з метою кріопротекції витримували 48 год при 4 °С у 30 %-вому розчині сахарози, приготованому на СФБ. На заморожуючому мікромомі виготовляли фронтальні зрізи товщиною 40 мкм, котрі збирали в лунки із СФБ для подальшого імуногістохімічного й гістохімічного забарвлення.

Фос-імуногістохімія. Виявлення Фос-ір-ядер (ядер мічених нейронів) проводили за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл щодо ядерного білка c-Fos (Ab-5; “Oncogene Research”, США) та комерційного набору ABC (PK 4001; “Vector”, США) [15, 16]. Мічені нейрони

ідентифікували по темно-коричневому забарвленню їх ядер при збільшеннях $\times 250$ або $\times 400$. Підрахунок Фос-ір-ядер нейронів у структурах головного мозку проводився білатерально за допомогою оптичного мікроскопа; їхня локалізація визначалася за атласом [17].

НАДФН-діафоразна гістохімія. Для виявлення НАДФН-др-нейронів зрізи додатково витримували 1 год при 37°C у СФБ (0.1 М, рН 7.3), що містив у собі 0.3 % детергента Triton X-100, 0.2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0.5 мг/мл редукованого β -НАДФН (“Sigma”, США) [18]. НАДФН-др-нейрони визначали за блакитним забарвленням їхньої цитоплазми та дендритів.

Статистика. Щільність Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів (кількість мічених клітин на площах зрізів мозку 200×200 мкм²) підраховували в медіальній перегородці (MS), ядрах вертикальної (VDB) і горизонтальної (HDB) гілок діагональної смужки, великоклітинному преоптичному ядрі (MCPO), безіменній субстанції (SI), базальному ядрі Мейнерта у блідій кулі GP(B), медіальній частині блідої кулі (MGP), ніжкомостовому (PPTg) і латеродорсальному (LDTg) ядрах покривки, ядрах латерального (LH) і паравентрикулярного (Pa) гіпоталамуса, острівцях Калеха (ICj) та великому острівці Калеха (ICjM) на рівнях від +0.7 до -9.1 мм від брегми [17]. Обстежуючи три-чотири зрізи окремих досліджуваних рівнів головного мозку кожної тварини, розраховували середню щільність Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів \pm похибка середнього. Значення щільності мічених клітин у різних структурах мозку різних груп щурів порівнювали за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу варіацій (ANOVA) і додатково post hoc-аналізу Ньюмена-Кеулса. Міжгрупові різниці вважалися вірогідними при $P < 0.05$.

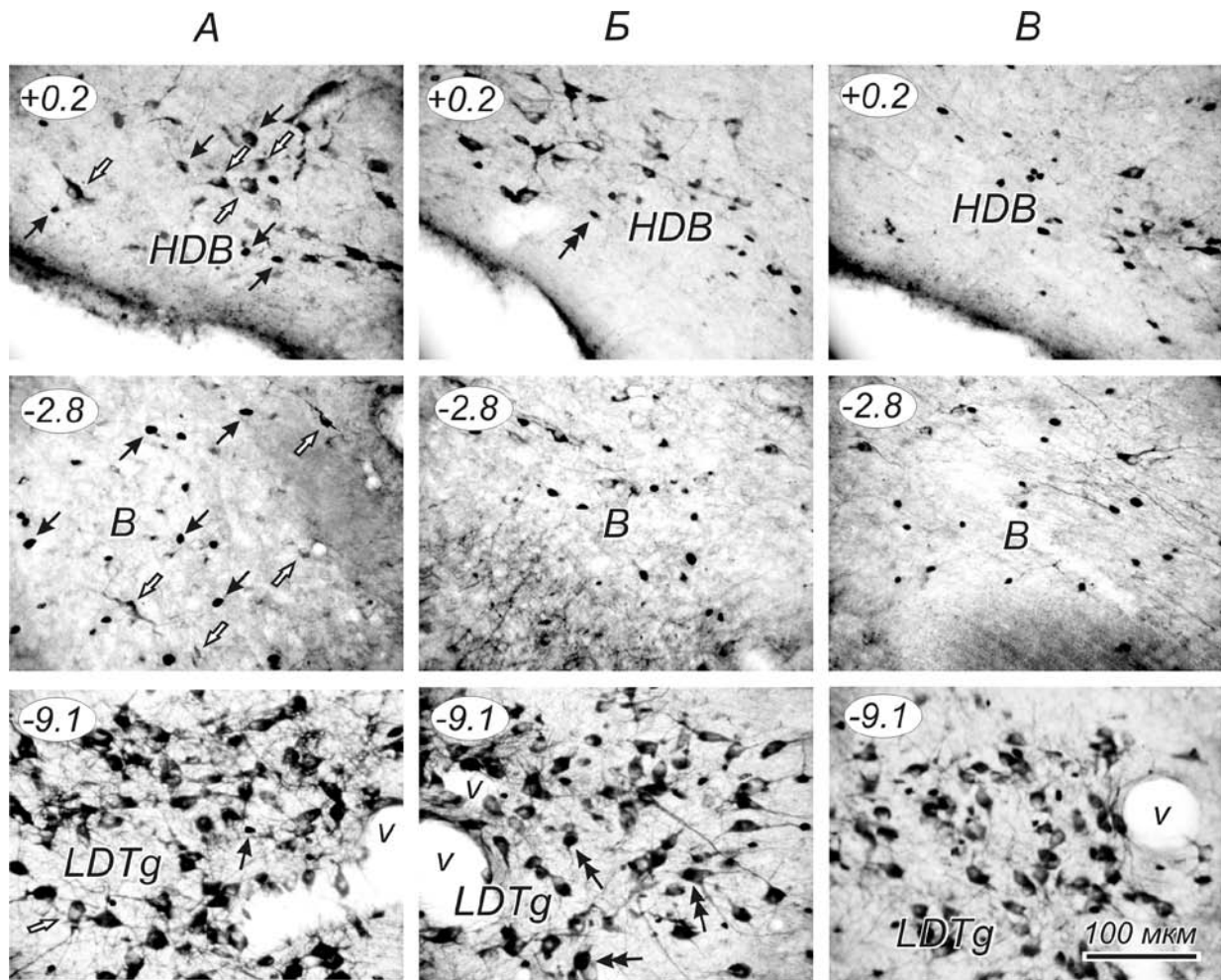
РЕЗУЛЬТАТИ

Формування моторної програми та реєстрація рухів. Як вже вказувалося, формування стійкої моторної програми оперантного їждобувного рефлексу (напрацювання твариною навички реалізувати введення передньої кінцівки до камери-годівниці та захват їжі пальцями) здійснювалося протягом 12 днів у послідовних (раз на добу) тренувальних сеансах у щурів, котрі знаходились у стані досить високої харчової мотивації. Тривалість таких рухів складала близько 600 мс (рахуючи від моменту відри-

ву кінцівки від підлоги експериментальної камери до моменту успішного захоплення харчової кульки) [2]. При невдалій першій спробі, коли харчова кулька не захоплювалася, друга спроба починалася рухом кінцівки від входу в годівницю; у такому разі тривалість руху була значно меншою. Реалізація оперантних рефлексорних рухів голодною твариною призводила до проявів у неї виражених мотиваційно-афективних реакцій: щур приймав характерну стійку, у нього спостерігались інтенсивні періодичні рухи голови, очей, щелеп і язика.

Фос-імунопозитивність і НАДФН-д-реактивність у лімбічних структурах. Фос-імунореактивність була зареєстрована в усіх лімбічних структурах базальної частини переднього мозку (MS, VDB, HDB і MCPO – SI – B). Як було встановлено раніше, у цих структурах локалізуються відомі групи холінергічних нейронів CH1–CH4 [5]. Фос-ір-нейрони в усіх трьох групах тварин були також виявлені в ядрах покривки моста (PPTg і LDTg), де знаходяться великі скупчення холінергічних нейронів каудальніших груп (CH5 і CH6). У контрольних тварин значення середньої щільності Фос-ір-нейронів збільшувались у наступній послідовності: MCPO < SI < VDB < HDB < MS < GP(B), причому найбільш висока щільність Фос-ір-нейронів (11.3 ± 1.2 забарвленого ядра на ділянці зрізу 200×200 мкм²) спостерігалася на каудальних рівнях ядра Мейнерта (B) (рис. 1, Г, 2). У голодуючих тварин порівняно з тваринами контрольної групи виявлялися статистично вірогідно вищі значення середньої щільності мічених нейронів ($P < 0.05$) у більшості вказаних лімбічних структур мозку, за винятком GP(B) і PPTg (рис. 2). Слід зазначити, що в MS, VDB і HDB середня щільність Фос-ір-нейронів у контрольних щурів складала більше восьми, а при голодуванні – більше 15 мічених клітин у межах тест-ділянок. У комплексі ядер SI–B щільність мічених нейронів на ростральних рівнях мало відрізнялася (від +0.2 до +0.7 мм від брегми), тоді як на каудальних рівнях (від -2.3 до -2.8 мм від брегми) її рівень був значно вищим (рис. 2, А, Б).

У щурів, що виконували оперантні рухи, у лімбічних структурах базальної частини переднього мозку та ядрах моста середні щільності мічених нейронів розподілялись у такій послідовності: PPTg < LDTg < SI < MCPO < GP(B) < MS < VDB < HDB (рис. 2). Необхідно відзначити, що найбільша середня щільність Фос-ір-нейронів (13.8 ± 0.9 одиниці) була зареєстрована в HDB – джерелі висхідних проєкцій до нюхової кульки [5]. Цікавою



Р и с. 1. Мікрофотографії Фос-імунореактивних та НАДФН-діафоразореактивних нейронів у холінергічних структурах правої півкулі мозку контрольних (А), голодуючих (Б) щурів, а також щурів, що виконували оперантні їждобувні рухи лівою кінцівкою (Б).

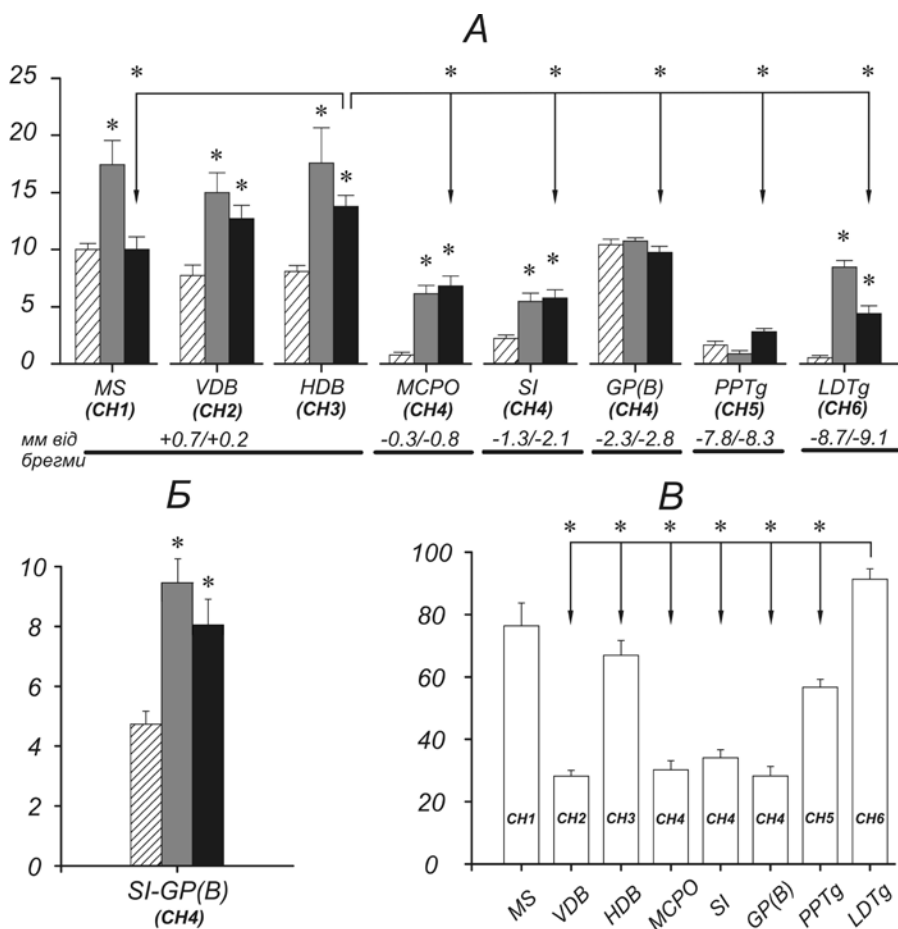
Фронтальні рівні: +0.2, -2.8 та -9.1 мм від брегми, за атласом [17]. Чорними стрілками позначені Фос-імунореактивні ядра мічених нейронів, білими – НАДФН-діафоразореактивні нейрони, подвійними – клітини з подвійним забарвленням, *HDB* – ядро горизонтальної гілки діагональної смужки, *B* – базальне ядро Мейнерта; *LDTg* – латеродорсальне ядро покривки; *v* – мікросудини. Масштабна лінія 100 мкм відповідає всім фрагментам.

знахідкою було й те, що у голодуючих щурів та у тварин після тренування (групи 2 і 3) у лімбічних структурах основи переднього мозку й моста Фос-ір-нейрони практично рівномірно розподілялися по обидва боки мозку. Крім того, у базальному ядрі Мейнерта (*B*) – основному джерелі висхідних аферентних проєкцій у кору мозку – щільність Фос-ір-нейронів у тварин груп 2 та 3 була достатньо високою, але відмінність від контролю не досягла рівня вірогідності. Тільки в комплексі ядер *SI-B* голодуючих або “тренуваних” щурів можна було спостерігати істотно більшу щільність Фос-ір-нейронів ($P < 0.05$) порівняно з контролем (Б).

Розподіл Фос-ір- та НАДФН-др-клітин у лімбічних структурах і гіпоталамусі. НАДФН-д-позитивні нейрони локалізувалися у всіх лімбічних структурах переднього мозку та покривці моста (рис. 1). Дуже висока щільність таких нейронів виявлялася в *LDTg*, *MS*, *HDB* і *PPTg*. Якщо в *MS* спостерігалися тільки слабо забарвлені нейрони малого розміру (10–12 мкм у діаметрі), то в *HDB* і особливо в ядрах стовбура (*PPTg* і *LDTg*) локалізувалися мультиполярні нейрони з великим діаметром соми (20–25 мкм), у котрих були інтенсивно забарвлені як соми, так і дендрити. Необхідно зазначити, що нейрони з подвійною міткою (Фос + НАДФН-д-

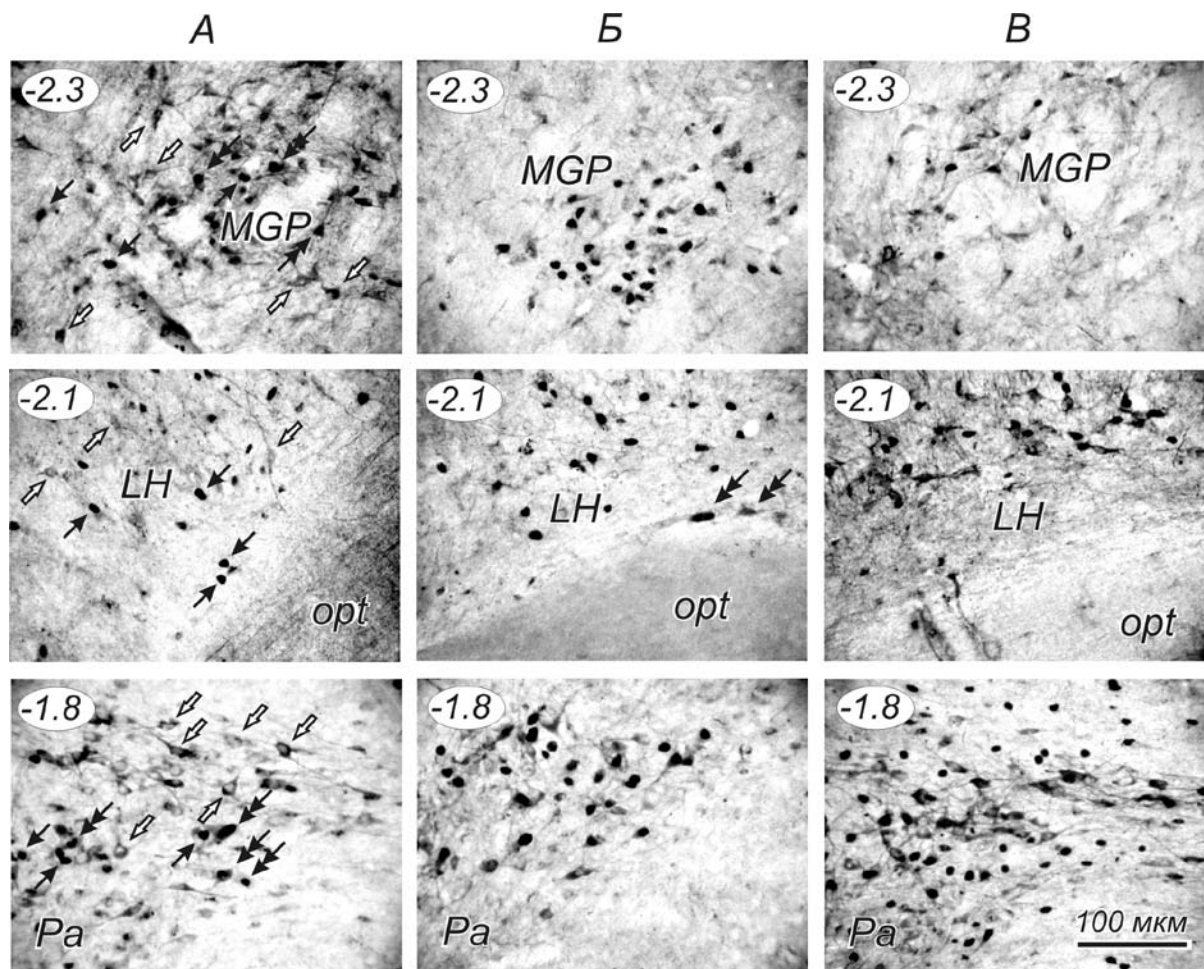
позитивні) виявлялися тільки в *HDB* і *LDTg* у тварин груп 2 та 3 (Б, Ж). Відносна кількість таких нейронів у *HDB* і внутрішній капсулі та ядрі Мейнерта (В) не перевищувала 5 % усіх Фос-ір-одиниць. У *LDTg* відмічалася більша кількість нейронів з подвійним забарвленням (до 10 %). Найбільша частка нейронів з подвійним забарвленням (майже 50 %) у всіх груп тварин містилася в *MGP* (рис. 3, А–В). Висока щільність НАДФН-др-нейронів була характерна для *Pa*, *ICjM* та *ICj* (рис. 4). Доцільно відмітити, що скупчення таких інтенсивно забарвлених нейронів в *ICjM* та *ICj* часто були пронизані артеріолами різно-

го діаметра (30–70 мкм), які могли простежуватися дорсальніше в *VDB*, *HDB*, а також у *SI*. У контролі максимальна щільність НАДФН-др-нейронів в окремому зрізі (унілатерально) в *ICjM* складала 260.0 ± 8.7 клітини на ділянці 200×200 мкм² та 287.0 ± 11.6 клітини в *ICj* (рис. 4), але тільки дуже невелика частина таких NO-генеруючих нейронів (<1 %) демонструвала Фос-імунореактивність. У щурів після періоду голодування середня щільність Фос-ір-нейронів в *ICjM* та *ICj* була значно вищою (65–85 одиниць з подвійним забарвленням). У тварин, котрі реалізували їждобувні рухи, в *ICj* вона досягала 90 одиниць.



Р и с. 2. Діаграми значень середньої щільності Фос-імунореактивних та НАДФН-діафоразореактивних нейронів у лімбічних структурах та ядрах покривки.

Показані середня щільність мічених нейронів \pm похибка середнього в різних структурах на різних фронтальних рівнях мозку (від + 0.7 до -9.1 мм від брегми, за атласом [17]) у зрізі 40 мкм завтовшки в межах ділянки 200×200 мкм². Заштриховані, сірі й чорні стовпчики на А та Б – відповідно середня щільність Фос-імунореактивних нейронів у мозку контрольних і голодуючих щурів, а також тварин, що виконували оперантні їждобувні рухи лівою кінцівкою; білі стовпчики на В – середня щільність НАДФН-діафоразореактивних нейронів. Зірочками над стовпчиками вказані випадки вірогідних різниць середньої щільності мічених нейронів у структурах мозку щурів голодуючої групи та тварин, що виконували оперантні їждобувні рухи, відносно контролю, зірочками над стрілками – відмінностей показників у різних структурах у групі щурів, що виконували оперантні їждобувні рухи (* $P < 0.05$). *MS* – медіальна перегородка; *VDB* – ядро вертикальної гілки діагональної смужки; *MCPO* – великоклітинне преоптичне ядро; *SI* – безіменна субстанція; *GP(B)* – базальне ядро Мейнерта у блідій кулі; *PPTg* – ніжкомостове ядро покривки. Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.



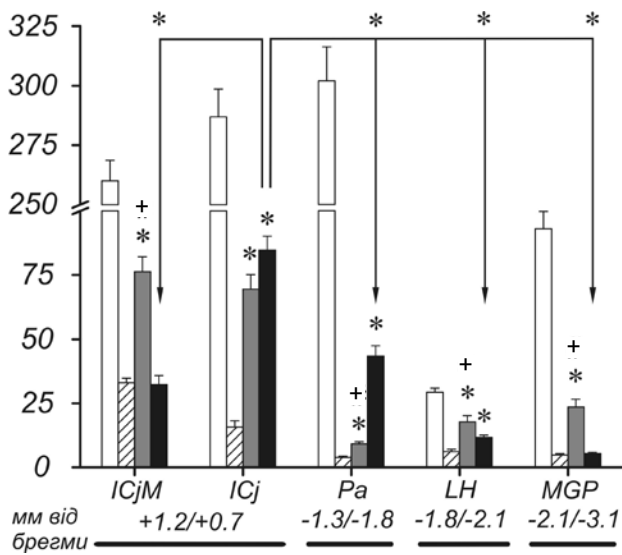
Р и с. 3. Мікрофотографії Фос-імунореактивних та НАДФН-діафоразореактивних нейронів у різних лімбічних структурах правої півкулі мозку контрольних (А) і голодуючих (Б), а також тих щурів, що виконували оперантні їждобувні рухи лівою кінцівкою (В). Фронтальні рівні: -2.3, -2.2 та -1.8 мм від брегми, за атласом [17]. Подвійними чорними стрілками позначені нейрони з подвійним забарвленням. *MGP* – медіальна частина білої кулі; *LH* і *Pa* – латеральне та паравентрикулярне ядра гіпоталамуса відповідно; *opt* – оптичний тракт. Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 1.

У гіпоталамусі у голодуючих щурів (група 2) рівень експресії *c-fos* у *LH* та *Pa* був майже вдвічі вищим, ніж у контролі. Проте після реалізації оперантних рухів (щери групи 3) у *Pa* він виявився дещо меншим, а в *LH* – значно більшим (рис. 3, Г-З, 4). Якщо в контролі в *LH* не було знайдено нейронів з подвійною міткою, певна кількість гіпоталамічних нейронів спостерігались у щурів після голодування або здійснення мотивованих їждобувних рухів. Кількість нейронів з подвійним забарвленням у цьому ядрі досягала 10 % кількості всіх Фос-ір-одиниць. Необхідно відмітити, що у тварин, реалізуючих рухи, у *Pa* спостерігали чис-

ленні як Фос-ір-нейрони, так і клітини з подвійною міткою (рис. 3; 4).

ОБГОВОРЕННЯ

В основі формування та реорганізації (консолідації й реконсолідації) моторних програм і закріплення експериментальних умовних рефлексів, як відомо [19–21], значною мірою лежать молекулярні механізми синтезу білків, що кодуються “ранніми” генами (*c-fos*). Через кілька годин після експресії *c-fos* (маркера підвищення нейронної активності)



Р и с. 4. Діаграми значень середньої щільності Фос-імунореактивних та НАДФН-діафоразореактивних нейронів в острівцях Калеха та ядрах гіпоталамуса. Хрестиками над стовпчиками вказані випадки вірогідних різниць середньої щільності мічених нейронів у мозку голодуючих шурів і тварин, що виконували оперантні їжодобувні рухи (* $P < 0.05$). *ICjM* – великий острівець Калеха; *ICj* – острівці Калеха. Решта позначень ті ж самі, що й на рис. 2 і 3.

спостерігається друга хвиля синтезу білків, які кодуються “пізними” генами. Експресія цих білків на тривалий час змінює функціональні властивості нейронів. Тому є підстави вважати, що вивчення експресії раннього гена *c-fos* та НАДФН-д-активності дасть змогу оцінити модуляцію нейронної активності в лімбічних структурах переднього мозку і гіпоталамусі (латеральному й паравентрикулярному ядрах) у перебігу формування та реалізації оперантних їжодобувних рефлексів, мотивованих станом голодування.

Як виявилось, у стані голодування та при реалізації інтенсивних напрацьованих оперантних рухів рееструються статистично вірогідно вищі порівняно з контролем рівні експресії *c-fos* у лімбічних холінергічних ядрах – медіальній перегородці (*MS*), ядрах вертикальної та горизонтальної гілок діагональної смужки (*VDB* і *HDB*), великоклітинному преоптичному ядрі (*MCPO*), безіменній субстанції (*SI*), базальному ядрі Мейнерта, острівцях Калеха (*ICjM*, *ICj*), а також у латеральному й паравентрикулярному ядрах гіпоталамуса (*LH* і *Pa*).

Експресія *c-fos* у лімбічних структурах. Лімбічні структури базальної частини переднього мозку відіграють важливу роль у модуляції кортикальної активності [22]. У свою чергу, збільшення рівнів кор-

тикальної/субкортикальної нейронної активності, як уже показано [14, 23, 24], корелює з посиленням РЦКО. Цей феномен відомий як функціональна гіперемія мозку. Такий тісний зв’язок кортикальної/субкортикальної нейронної активності з РЦКО забезпечує функціональну адаптацію, полегшуючи функціонування механізмів пластичності, навчання та пам’яті. Треба також зазначити, що такий агент, як NO, є важливою ланкою в механізмах нейроваскулярного “зчеплення”. Відомо, що джерелами висхідних ніттергічних проєкцій у кору є групи холінергічних нейронів *CH1-CH4* у базальній частині переднього мозку [5, 6]. Ці холінергічні нейрони вміщують фермент NO-синтазу і, таким чином, можуть вивільнювати об’ємний медіатор NO із своїх терміналей у гіпокампі, нюховій кульці та корі [12]. Проте слід брати до уваги, що холінергічні нейрони згаданих чотирьох груп перемішані в лімбічних структурах з ГАМК-ергічними та глутаматергічними нейронами; останні також є джерелами висхідних проєкцій у кору мозку [25].

У нашому дослідженні виявлена значна кількість (50 % та навіть більше) нейронів з подвійним забарвленням (Фос-ір + НАДФН-др) у гіпоталамусі (*Pa*), блідій кулі (*MGP*) та острівцях Калеха (*ICjM*, *ICj*). Щільність НАДФН-др-нейронів у структурах мозку відповідала такій послідовності: $Pa > ICj > ICjM > MGP > LH$. Вважається, що впливи NO-системи на виділення глутамату та ГАМК у вказаних структурах є важливим фактором, який сприяє залученню цих структур у формування та реалізацію їжодобувних рухів [10].

Необхідно зазначити, що в *HDB*, де рееструвалась інтенсивна експресія *c-fos*, локалізовані NO-генеруючі клітини. Вони є джерелами висхідних холінергічних проєкцій у нюхову кульку [5]. Тому можливо, що найбільш висока щільність Фос-ір-нейронів і значна – НАДФН-др-клітин у *HDB* у шурів у стані високої харчової мотивації пов’язані з надходженням у мозок активуючих впливів ольфакторних подразнень. Необхідно підкреслити, що в досліджуваних нами структурах мозку, окрім *Pa*, *ICjM*, *ICj* і *MGP*, були присутні тільки поодинокі нейрони з подвійним забарвленням. Припускається, що NO-генеруючі нейрони, локалізовані в даних структурах, мають дуже високі пороги щодо активації експресії *c-fos*. Саме це й зумовлює невелику кількість вказаних “подвійних” клітин. Проте на моделях розвитку стресу у шурів, індукованого довготривалим обмеженням їх рухомості, були знайдені збільшена кількість NO-генеруючих нейронів та

інтенсивне подвійне їх забарвлення в ядрах діагональної смужки Брока (*VDB* і *HDB*) [26].

Експресія *c-fos* і НАДФН-д-реактивність у гіпоталамусі. У моторних і лімбічних зонах кори у тварин у процесі закріплення умовних рефлексів активну функціональну роль відіграють гальмівні процеси, тоді як у мигдалеподібному тілі превалюють процеси збудження [27–29]. Раніше також підкреслювалося важливе значення гіпоталамічних структур для організації мотиваційно зумовлених поведінкових моторних реакцій, тобто для закріплення й реалізації оперантних рефлексів [2, 30, 31]. Щільність НАДФН-др- (НО-генеруючих) нейронів у лімбічних структурах і гіпоталамусі в наших дослідженнях виявилася досить високою [18, 26, 32].

Гіпоталамус займає особливе місце в інтеграції “сигналів голоду” та “сигналів насичення”, при цьому *LH* переважно виконує роль “центра голоду”, а вентромедіальний (*VM*) – “центра насичення” [33]. В умовах наших експериментів високі рівні експресії *c-fos* у гіпоталамусі є ознакою інтенсивного залучення даного комплексу структур у розвиток мотиваційних та емоційних аспектів їждобувної поведінки. Варто нагадати, що високий рівень експресії *c-fos* у *Pa* (ростральні рівні) після здійснення значної кількості рухів, спрямованих на захват їжі, корелює з характерним відносним пригніченням нейронної активності в корі [28, 29, 34] та мигдалеподібному тілі [35]. Треба зазначити, що така тенденція змін експресії *c-fos* не відмічалася при розрахунках в окремо взятому базальному ядрі Мейнерта *GP(B)*, проте вона ставала досить помітною після сумачії даних щодо комплексу *SI–GP(B)* (рис. 2, *Б*). Вказувалося, що зміни фізіологічного стану певної нервової структури ініціюються специфічними сигналами та відтворюються в характерних патернах нейронної активності в окремих підрозділах такої функціональної системи. Результати досліджень з використанням електрофізіологічних та магніторезонансних методик показали, що у тварин у стані голодування або у тварин, що здійснюють мотивовану активність, орієнтовану на здобування їжі, електрична активність нейронів в орбітофронтальній корі [29, 34], мигдалеподібному тілі [36] та *LH* посилюється [37]. Проте інтенсивність відповідних магніторезонансних сигналів у гіпоталамусі як у людей [38], так і в експериментальних тварин (щурів) після споживання глюкози значно знижувалася [35]. Застосування інсуліну зумовлювало реципрокне збудження нейронів у *LH*

[39]. Такі дані узгоджуються з результатами наших імуногістохімічних досліджень. У щурів у стані голодування спостерігався високий рівень Фос-імунореактивності у фронтальній та моторній областях кори, а також у мигдалеподібному тілі, тоді як після реалізації їждобувних рухів цей показник був помітно зниженим [28, 29].

Результати порівняльного дослідження розподілу Фос-імунореактивності в структурах базальної частини переднього мозку і гіпоталамусі в контролі, у стані голодування та в разі реалізації мотивованої моторної активності (захватів їжі) вказують на активне залучення згаданих структур у формування оперантних (інструментальних) їждобувних рефлексів. Виявлена специфіка експресії *c-fos* у гіпоталамусі може бути пов’язана із формуванням мотиваційних сигналів, індукованих голодом, у той час як активність структур базальної частини переднього мозку відображає причетність останніх до формування моторної програми їждобувних рухів та її реалізації. Збільшення кількості нейронів з подвійною Фос та НАДФН-д-позитивність в *Pa*, *MGP* і *ICj* у таких тварин свідчить про те, що НО-сигнали відіграють помітну роль у формуванні та посиленні мотивованих їждобувних рефлексів.

Роботу виконано за підтримки гранта “Молекулярні основи функціонування геному (2007-2008)” НАН України.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон, *Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения*, Высш. шк., Москва (1991).
2. В. М. Мороз, М. В. Йолтухівський, О. В. Власенко, *Латеральний гіпоталамус і префронтальна кора в організації довільних рухів*, Центр. метод. кабінет з вищ. мед. освіти, Вінниця, Київ (1998).
3. O. V. Vlasenko, A. V. Dovgan', V. A. Maisky, et al., “NADPH-diaphorase reactivity and neurovascular coupling in the basal forebrain and motor cortex,” *Нейрофізіологія / Neurophysiology*, **39**, № 4/5, 405-407 (2007).
4. H. Girouard and C. Iadecola, “Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease,” *J. Appl. Physiol.*, **100**, 328-335 (2006).
5. M. M. Mesulam, E. J. Mufson, B. H. Wainer, and A. I. Levey, “Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6),” *Neuroscience*, **10**, 1185-1201 (1983).
6. D. B. Rye, B. H. Wainer, M. M. Mesulam, et al., “Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase,” *Neuroscience*, **13**, 627-643 (1984).

7. S. E. Jacobs and S. L. Juliano, "The impact of basal forebrain lesions on the ability of rats to perform a sensory discrimination task involving barrel cortex," *J. Neurosci.*, **15**, 1099-1109 (1995).
8. О. В. Довгань, В. О. Майський, О. І. Пілявський, А. В. Мазниченко, "Дослідження НАДФН-діафоро-реактивних нейронів та їх взаємозв'язок із мікросудинами в базальних лімбічних структурах переднього мозку і гіпоталамусі", *Фізіол. журн.*, **53**, № 5, 35-46 (2007).
9. A. V. Maznychenko, A. I. Pilyavskii, O. V. Vlasenko, and V. A. Maisky, "Fatigue of the dorsal neck muscles initiates *c-fos* expression in the rat spinal cord and hypothalamus," *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **38**, № 4, 354-357 (2006).
10. R. Vettor, R. Fabris, C. Pagano, and G. Federspil, "Neuroendocrine regulation of eating behavior," *J. Endocrinol. Invest.*, **25**, 836-854 (2002).
11. A. Sato and Y. Sato, "Cerebral cortical vasodilatation in response to stimulation of cholinergic fibers originating in the nucleus basalis of Meynert," *J. Auton. Nerv. Syst.*, **30**, S137-S140 (1990).
12. X. K. Tong and E. Hamel, "Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex: cellular basis for cortical blood flow regulation," *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 2769-2780 (2000).
13. E. Hamel, "Cholinergic modulation of the cortical microvascular bed," *Prog. Brain Res.*, **145**, 171-178 (2004).
14. O. V. Vlasenko, V. A. Maisky, A. V. Maznychenko, and A. I. Pilyavskii, "NADPH-diaphorase activity and neurovascular coupling in the rat cerebral cortex," *Фізіол. журн.*, **54**, № 1, 45-53 (2008).
15. 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).
16. A. I. Pilyavskii, A. V. Maznychenko, V. A. Maisky, et al., "Capsaicin-induced effects on *c-fos* expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord," *Eur. J. Pharmacol.*, **521**, 70-78 (2005).
17. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press, San Diego (1997).
18. S. R. Vincent and H. Kimura, "Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain," *Neuroscience*, **46**, 755-784 (1992).
19. R. Bourtchouladze, T. Abel, N. Berman, et al., "Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA," *Learn Mem.*, **5**, 365-374 (1998).
20. T. Herdegen and J. D. Leah, "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. - Brain Res. Rev.*, **28**, 370-490 (1998).
21. Е. В. Муравьева, К. В. Анохин, "Участие синтеза белка в реконсолидации памяти в разное время после обучения условнорефлекторному замиранию у мышей", *Журн. высш. нерв. деятельности*, **56**, № 2, 274-281 (2006).
22. Q. Gu, "Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity," *Neuroscience*, **111**, 815-835 (2002).
23. C. Iadecola, "Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link?" *Trends Neurosci.*, **16**, 206-214 (1993).
24. E. Hamel, "Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone," *J. Appl. Physiol.*, **100**, 1059-1064 (2006).
25. I. Gritti, P. Henny, F. Galloni, et al., "Stereological estimates of the basal forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters," *Neuroscience*, **143**, 1051-1064 (2006).
26. T. L. Krukoff and P. Khalili, "Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain," *J. Comp. Neurol.*, **377**, 509-519 (1997).
27. C. Herry and N. Mons, "Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala," *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 781-790 (2004).
28. О. В. Власенко, О. В. Довгань, "Експресія *c-fos* як показник функціональної взаємодії фронтальної кори і лімбічних структур головного мозку під час їждобувних стереотипних рухів у щурів", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **40**, № 3, 256-259 (2008).
29. О. В. Власенко, А. И. Пилыавский, В. А. Майский, А. В. Мазниченко, "Fos-иммунореактивность и НАДФН-реактивность в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **40**, № 4, 351-361 (2008).
30. S. Aou, A. Takaki, Z. Karádi, et al., "Functional heterogeneity of the monkey lateral hypothalamus in the control of feeding," *Brain Res. Bull.*, **27**, 451-455 (1991).
31. H. M. Sinnamon, "Preoptic and hypothalamic neurons and the initiation of locomotion in the anesthetized rat," *Prog. Neurobiol.*, **41**, 323-344 (1993).
32. О. В. Власенко, В. О. Майський, А. В. Мазниченко та ін., "Дослідження експресії *c-fos* і НАДФН-діафоро-реактивності у спинному та головному мозку при розвитку стомлення м'язів шиї у щурів", *Фізіол. журн.*, **52**, № 6, 3-14 (2006).
33. T. Ono, K. Sasaki, and R. Shibata, "Feeding- and chemical-related activity of ventromedial hypothalamic neurones in freely behaving rats," *J. Physiol.*, **394**, 221-237 (1987).
34. E. T. Rolls, Z. J. Sienkiewicz, and S. Yaxley, "Hunger modulates the responses to gustatory stimuli of single neurons in the caudolateral orbitofrontal cortex of the macaque monkey," *Eur. J. Neurosci.*, **1**, 53-60 (1989).
35. S. Mahankali, Y. Liu, Y. Pu, et al., "In vivo fMRI demonstration of hypothalamic function following intraperitoneal glucose administration in a rat model," *Magn. Reson. Med.*, **43**, 155-159 (2000).
36. Y. Nakano, Y. Oomura, L. Lénárd, et al., "Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala," *Brain Res.*, **399**, 167-172 (1986).
37. M. J. Burton, E. T. Rolls, and F. Mora, "Effects of hunger on the responses of neurons in the lateral hypothalamus to the sight and taste of food," *Exp. Neurol.*, **51**, 668-677 (1976).
38. P. A. Smeets, C. de Graaf, A. Stafleu, et al., "Functional MRI of human hypothalamic responses following glucose ingestion," *Neuroimage*, **24**, 363-368 (2005).
39. I. E. de Araujo, R. Gutierrez, A. J. Oliveira-Maia, et al., "Neural ensemble coding of satiety states," *Neuron*, **51**, 483-494 (2006).