

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

## Ламінарний розподіл активних нейронів у спинному мозку при реалізації харчодобувних стереотипних рухів у щурів

*Порівняльне дослідження експресії раннього гена *c-fos* (маркера нейронної активності) і НАДФН-діафоразної реактивності (НАДФН-др) проводилося в шийному відділі спинного мозку контрольних (інтактних) щурів, після триденного голодування тварин і після реалізації тривалих (4–12 повторень за хвилину протягом 30 хв) мотивованих стереотипних харчодобувних рухів передньою кінцівкою. У порівнянні з контролем, у щурів у стані голоду і у тварин, які виконували рухи, спрямовані на захоплення їжі, кількість Фос-імунореактивних (Фос-ір) клітин у дорсальному і вентральному розі в 40-мікрометровому фронтальному зрізі була достовірно більшою ( $P < 0,05$ ). Кількість Фос-ір-нейронів у більшості шарів сірої речовини спинного мозку у щурів, що знаходяться в стані голоду, перевищувала кількість таких клітин у мозку тварин, що тривало виконували стереотипні рухи. Підвищена Фос-імунореактивність у поверхневих (2і, 3) і глибоких (4, 5) шарах дорсального рогу, очевидно, була викликана сигналами від периферичних і супраспінальних структур. Мічені Фос-ір-клітини були виявлені в шарах 6–8 і 9, що вказує на активність інтернейронів і мотонейронів, залучених у формування оперантних рухів передньою кінцівкою. У тварин усіх груп спостерігалася однаково висока щільність НАДФН-др/NO-генеруючих нейронів у сегментах С6/С7 у желатинозній субстанції (шар 2і), а також у шарах 7 і 10. НАДФН-др-клітини та Фос-ір-нейрони були перемішані в шарах сірої речовини мозку, однак подвійного забарвлення клітин не спостерігалось. Можна припустити, що НАДФН-др/NO-генеруючі нейрони спинного мозку не активуються при реалізації досліджуваних оперантних рефлексів, на відміну від реакцій, що містять ноцицептивні компоненти.*

*Ключові слова:* оперантний рефлекс, експресія *c-fos*, НАДФН-д реактивність, спинний мозок, щур.

### ВСТУП

Давно встановлено, що експресія гена “раннього реагування” *c-fos* знаходиться у чіткому зв’язку з інтенсивністю нейронної активності у різних ділянках спинного [14] та головного [22] мозку. У своїх ранніх роботах ми також використали метод імуногістохімічної демонстрації експресії *c-fos* для виявлення нейронної активації у різних шарах спинного мозку та визначення центральних нейронних ланцюгів передачі ноцицептивних м’язових сигналів до лімбічних і гіпоталамічних центрів головного мозку у щурів і кішок; паралельно вивчався

і розподіл НАДФН-діафоразореактивності (НАДФН-др) у досліджуваних зонах мозку [2, 20, 24]. Важливою знахідкою в цих дослідженнях було те, що експресія *c-fos* або наявність Фос-імунореактивних- (Фос-ір-) нейронів, реєструвалася при різноманітній ноцицептивній стимуляції і запаленні м’язів, головним чином у поверхневих шарах сірої речовини спинного мозку (шар 1 та верхня частина шару 2 (2о)), а також у шийці дорсального рога (шар 5). Подвійне мічення (Фос-ір і НАДФН-др) нейронів було зареєстроване в структурах головного мозку, головним чином у гіпоталамусі та мигдалеподібному тілі [20].

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

Слід відмітити, що характерні патерни експресії *c-fos* у корі головного мозку і, особливо, у моторній корі великих півкуль щурів, що реалізували мотивовані стереотипні умовно-рефлекторні (оперантні) рухи передньою кінцівкою, дуже відрізняються від патернів експресії *c-fos* у корі щурів у нормі або під час розвитку м'язового болю. Нами вперше було показано, що у моторній зоні кори щільність розподілу Фос-ір-нейронів у тварин, натренованих протягом 2 тиж реалізувати оперантні харчодобувні рефлекси (захват харчових кульок передньою кінцівкою), була достовірно меншою у порівнянні з контрольними тваринами [3].

Вивчення пластичних змін при закріпленні оперантних рефлексів у тварин, традиційно фокусувалося на центрах головного мозку та ігнорувалося значення таких змін у спинному мозку, тобто на рівні кінцевого шляху реалізації моторних програм. Але і раніше висувалися припущення, що моторна кора та спинний мозок мають змогу значною мірою змінювати свою структуру і функцію у відповідь на інтенсивні та тривалі рухові акти [7, 8, 11]. Також встановлено, що закріплення моторних програм змінює щільність ГАМКергічних терміналей на спінальних мотонейронах [26]. Однак внесок структур спинного мозку, насамперед його шийного відділу, в закріплення моторних програм залишається ще недостатньо вивченим.

Метою цього дослідження було виявлення ламінарного розподілу Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів та їх кількісного аналізу в шийному відділі спинного мозку контрольних щурів і тварин у стані голодування, а також після реалізації повторних стереотипних рухів передньою кінцівкою в умовах високої мотивації – досягнення і захват їжі. Припускається, що такий аналіз Фос-імунореактивності дасть змогу виявити ділянки сірої речовини спинного мозку, які беруть особливу участь на кінцевому шляху в формуванні і реалізації закріпленої

моторної програми стереотипних харчодобувних рухів передньою кінцівкою, а також встановити функціонально пов'язані структурні зміни нейронної реорганізації в таких ділянках і можливу причетність спінальних НАДФН-др-нейронів (НО-генеруючих клітин) до таких змін.

## МЕТОДИКА

*Експериментальні групи та стимуляційний протокол.* В експериментах було використано три групи щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г. До 1-ї (контрольної) групи увійшли інтактні тварини (n=4); до 2-ї – тварини, які голодували протягом 3 діб при вільному доступі до води (n=4); до 3-ї групи – тварини, які виконували харчодобувні рухи (n=4). Мотивовані голодом (24 год) тварини 3-ї групи у послідовних сесіях (12 тренувальних сесій по 30 хв протягом 12 діб, 4–12 захватів їжі за хвилину) оперантного рефлексу виробляли стереотипний рух передньою лівою кінцівкою та пальцями для захоплення харчових кульок (близько 120–360 штук за одну сесію) з годівниці. Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

*Перфузія.* Щурів 1-ї, 2-ї (та 3-ї груп, через 2 год після тренування) під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, „Sigma”, США, внутрішньоочередово) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Далі перфузію продовжували 4%-м параформальдегідом, розчиненим у 0,2 моль/л фосфатному буфері (ФБ); рН 7,3. Сегменти шийного потовщення (С6 та С7) спинного мозку кожної тварини швидко виділяли та фіксували протягом 12 год, а потім для кріопротекції витримували 48 год при 4°C у 30 %-му розчині сахарози, який готувався

на 0,1 моль/л ФБ. На заморожувальному мікромомі були зроблені зрізи (40 мкм завтовшки), які збирали у лунки з СФБ для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного забарвлення.

**Фос-імуногістохімія.** Фос-ір-ядра (мічені нейрони) виявляли за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної 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) [5, 13, 24]. Фос-ір-ядра нейронів у шарах спинного мозку підраховували під мікроскопом, а їх локалізацію визначали за атласом [23]. Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер при збільшеннях у 250 та 400 крат.

**НАДФН-діафоразна гістохімія.** Для виявлення НАДФН-др-нейронів забарвлені на *c-Fos* зрізи витримували 1 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ, який містив 0,3 % детергента Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого β-НАДФН („Sigma”, США) [25]. НАДФН-др-нейрони ідентифікували у зрізах мозку за блакитним забарвленням їх цитоплазми.

**Статистика.** Кількість Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів підраховували у шийних сегментах С6/С7 у шарах 1–10 сірої речовини спинного мозку щурів 1-ї та 2-ї групи унілатерально, а 3-ї групи – іпсилатерально, за атласом [23]. Щоб отримати середню кількість ± стандартна похибка середнього Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів, використовували близько 8–12 подвійно забарвлених зрізів від досліджуваних рівнів спинного мозку кожної тварини. Порівнювали середні кількості забарвлених клітин за допомогою однопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Варіаційні фактори мали такі

умови: групи тварин та шари сірої речовини спинного мозку. Достовірність визначали як  $P < 0,05$ . Якщо різниця між середніми була знайдена, застосовували апостеріорний критерій Ньюмена – Кеулса.

## РЕЗУЛЬТАТИ

**Експресія *c-fos* у спинному мозку у нормі та під час голодування щурів.** Середня кількість Фос-ір-клітин (мічених нейронів) у шийних сегментах С6/С7 (рівні представництва передніх кінцівок) контрольних тварин була незначною – 5–7 клітин у 40-мікрометровому фронтальному зрізі. Однак у мозку щурів після довготривалого голодування у порівнянні із нормою середня кількість мічених нейронів була достовірно більшою у шарах 1–9 сірої речовини спинного мозку ( $P < 0,05$ ). Висока щільність Фос-ір-нейронів відмічалася в желатинозній субстанції (шар 2і –  $6,5 \pm 0,5$  мічених клітин на зріз), власному ядрі (шари 3 та 4 –  $20,05 \pm 0,9$  та  $5,6 \pm 0,4$  Фос-ір-клітин відповідно) та у шарі 7 (інтермедіальна зона вентрального рога –  $5,8 \pm 0,6$  Фос-ір-нейронів) з максимальною щільністю мічених нейронів у шарі 3 дорсального рога сірої речовини. Від 7 до 12 мічених нейронів було зареєстровано у вентральному розі (шари 7–10) цих сегментів і невелика кількість у латеральному спінальному ядрі з обох боків мозку. Додатково відзначимо активність у латеральних і медіальних моторних ядрах (2–3 Фос-ір-клітини великих розмірів, близько 40 мкм у діаметрі, на зріз; рис. 1). Таким чином, рівень Фос-імунореактивності в різних шарах сірої речовини сегментів шийного потовщення С6/С7 у тварин після голодування представлено у такій послідовності: шар 3 > шар 2 > шар 7 > шар 4. Мікрофотографії (рис. 2) фронтального зрізу шийного сегмента С7 спинного мозку щура після голодування демонструють активність експресії *c-fos* у різних шарах сірої речовини. Відмічаються поодинокі

мічені клітини великих розмірів у поверхневих шарах 1 і 2, власному ядрі, шийці дорсального рога (шар 5) та інтермедіальній зоні сірої речовини.

*Посилення експресії c-fos у спинному мозку щурів після реалізації оперантних харчодобувних рухів.* У порівнянні з інтактними щурами у мозку тварин, що виконували харчодобувні рухи лівою передньою кінцівкою після 30-хвилинної реалізації моторної програми оперантного рефлексу, спостерігалася достовірно більша кількість Фос-ір-нейронів у шарах 1–5 ( $P < 0,05$ ). Найбільша середня кількість мічених клітин у мозку щурів 3-ї групи була виявлена у шарах 2, 3 і 4 ( $9,2 \pm 1,2$ ,  $6,05 \pm 0,5$  та  $5,8 \pm 0,6$  відповідно,  $P < 0,05$ ) сегментів С6/С7 (див. рис. 1). Невелике число мічених нейронів спостерігалось також і в інших шарах (1 та 5–10) дорсального та вентрального рогів. Рівні експресії c-fos в різних шарах сірої речовини цих сегментів спинного мозку у тварин після реалізації оперантних харчодобувних рухів визнача-

лися у такій послідовності: шар 2 > шар 3 > шар 4 > шари 1, 5–10. Слід відмітити, що загальна інтенсивність експресії c-fos була значно вищою у мозку тварин у стані голодування у порівнянні з тваринами, які виконували оперантні харчодобувні рухи. Однак патерни ламінарного розподілу мічених нейронів значно не змінювались. Основні фокуси локалізації мічених клітин в обох випадках залишалися у тих самих регіонах – жеатинозна субстанція та власне ядро сірої речовини спинного мозку. Мікрофотографії зрізу сегмента С7 спинного мозку щура після виконання харчодобувних рухів ілюструють активність Фос-ір-нейронів у поверхневих шарах дорсального рога (рис. 3, а) та Фос-імунореактивність у моторному ядрі та зоні навколо центрального каналу (див. рис. 3, б, в).

*НАДФН-діафоразна реактивність та її колокалізація з Фос-імунореактивністю у спинному мозку.* На відміну від Фос-імунореактивних ядер чорного кольору, НАДФН-др-нейрони диференціювалися за

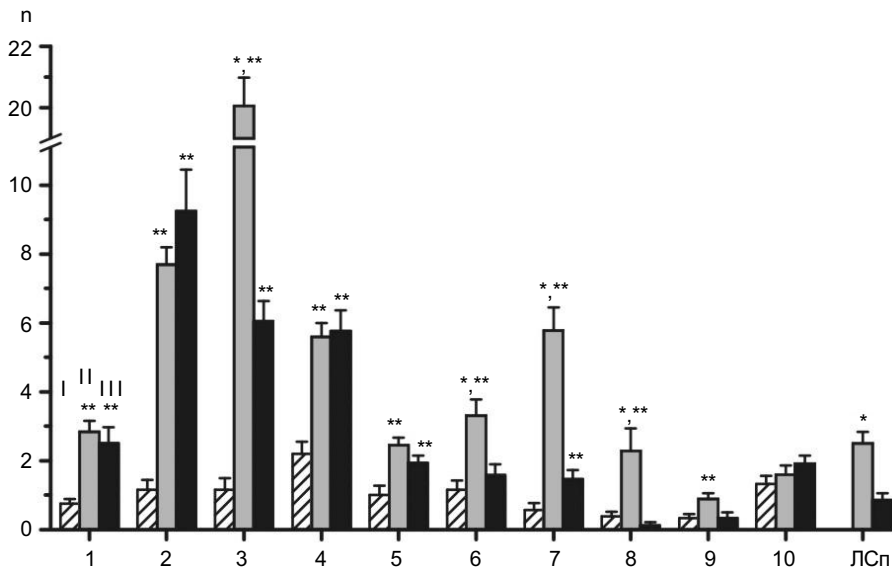


Рис. 1. Розподіл середньої кількості (n) ± стандартна похибка середнього Фос-імунореактивних нейронів на зріз у шарах 1–10 та латеральному спінальному ядрі (ЛСп) у шийному потовщенні (С6/С7). I, II, III – середня кількість мічених нейронів (унілатерально для щурів груп 1 і 2 та іпсилатерально для щурів 3-ї групи) в мозку тварин трьох груп: інтактна, при голодуванні та після виконання стереотипних харчодобувних рухів відповідно. \* $P < 0,05$  між значеннями середньої кількості мічених нейронів у мозку тварин, які голодують і таких, що виконували оперантні харчодобувні рухи; \*\* $P < 0,05$  відмінності показників тварин, які голодують, або тих, що виконували оперантні харчодобувні рухи у порівнянні з інтактними щурами

блакитним забарвленням їх цитоплазми, ядра таких клітин не забарвлювалися. НАДФН-др-клітини у тварин усіх трьох груп були зареєстровані в одних і тих самих ділянках сірої речовини, але достовірної різниці між середніми значеннями кількості позитивних нейронів у шарах 1–10 спинного мозку тварин різних груп знайдено не було (рис. 4). Позитивні NO-генеруючі клітини розташовувалися по всій довжині желатинозної субстанції та, головним чином, у медіальних зонах сірої речовини та навколо центрального каналу (рис. 5). У сірій речовині мозку досліджуваних тварин спостерігалися інтенсивно та слабо забарвлені клітини, так звані позитивні нейрони I та II типу. Для статистичної оцінки середніх значень кількості НАДФН-др-нейронів враховували тільки інтенсивно

забарвлені клітини великих розмірів [18]. НАДФН-др-/NO-генеруючі нейрони у фронтальних зрізах мозку локалізувалися у желатинозній субстанції, у власному ядрі, шийці дорсального рога та у вентральному розі за виключенням моторних ядер. У мозку тварин 2-ї та 3-ї групи НАДФН-др-нейрони I типу були перемішані з Фос-ір-нейронами, особливо у шарах 2 і 3 сегментів шийного потовщення С6/С7, де була виявлена досить висока щільність мічених клітин. У цих шарах також наявні НАДФН-др-нейрони II типу, в яких подвійного забарвлення (Фос-ір і НАДФН-др) нами виявлено не було.

## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати наших досліджень експресії *c-fos* у спінальних нейронах щурів прямо

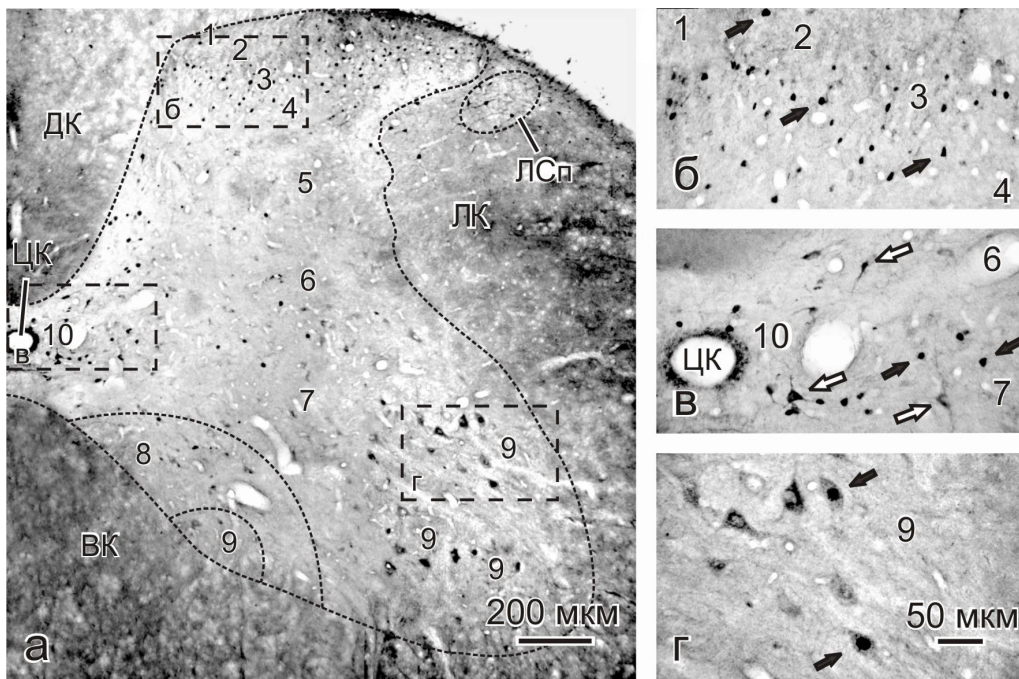


Рис. 2. Фос-імунореактивні та НАДФН-діафоразореактивні нейрони на фронтальному зрізі шийного сегмента С7 (праворуч) спинного мозку щура після голодування. Зони локалізації позитивних Фос-ір- та НАДФН-др-нейронів у шарах 1–10 дорсального і вентрального рога на (а), які позначені пунктирними лініями, представлені при великому збільшенні на б–г; б – велике скупчення Фос-ір-клітин у шарі 3 сірої речовини спинного мозку; в – позитивні клітини в інтермедіальній ділянці (шар 7), та зони навколо центрального каналу (шар 10); г – мічені мотонейрони в латеральному моторному ядрі. Чорні стрілки – Фос-ір-ядра, білі – НАДФН-др-нейрони. Структури: ВК, ДК та ЛК – вентральний, дорсальний та латеральний канатики; ЛСп – латеральне спінальне ядро; ЦК – центральний канал. Масштабна лінія на а – 200 мкм, на б–г – 50 мкм

вказують на те, що довготривале тренування тварини на виконання комплексної моторної програми захоплення їжі з годівниці передньою кінцівкою (закріплення оперантного рефлексу) і її остання реалізація через 12 діб тренування призводять до достовірно більшої кількості Фос-ір-нейронів (білатерально) в дорсальному та вентральному рогах шийного потовщення спинного мозку. Нами виявлені специфічні патерни експресії *c-fos* у спинному мозку як у щурів після тривалого голодування, так і у щурів після реалізації оперантних рефлексів (харчодобувні рухи). У щурів 2-ї та 3-ї групи, зона інтенсивної експресії *c-fos* у дорсальному розі покривала власне ядро і желатинозну субстанцію (шар 2i), а у вентральному – інтермедіальну сіру речовину, включаючи і моторні ядра, де були зареєстровані інтенсивно забарвлені ядра мотонейронів (див. рис. 2, г, 3, б). Відмітимо, що топографія Фос-ір-нейронів

мала медіальний характер локалізації у сірій речовині спинного мозку (див. рис. 5). Ці патерни експресії *c-fos* відрізнялися від патернів в умовах ноцицептивної або стомлювальної стимуляції м'язів кінцівок, коли основні фокуси Фос-імунореактивності були локалізовані у поверхневих шарах (1 і 2o) та шийці дорсального рога. Причому під час ноцицептивних або стомлювальних подразнень м'язів кінцівок не було зареєстровано мічених мотонейронів [2, 20, 24]. Важливо відмітити, що в нашій роботі Фос-ір-нейрони були локалізовані в ділянках, які традиційно пов'язують з передачею неноцицептивних сигналів [7, 15, 16]. Нейрони в цих регіонах отримують входи від аферентів великого та середнього діаметрів (групи I та II) м'язів, сухожилок і шкіри [10]. Така розбіжність у розподілі експресії *c-fos* у спинному мозку добре підтверджує той факт, що характерні патерни ламінарного розподілу Фос-ір-

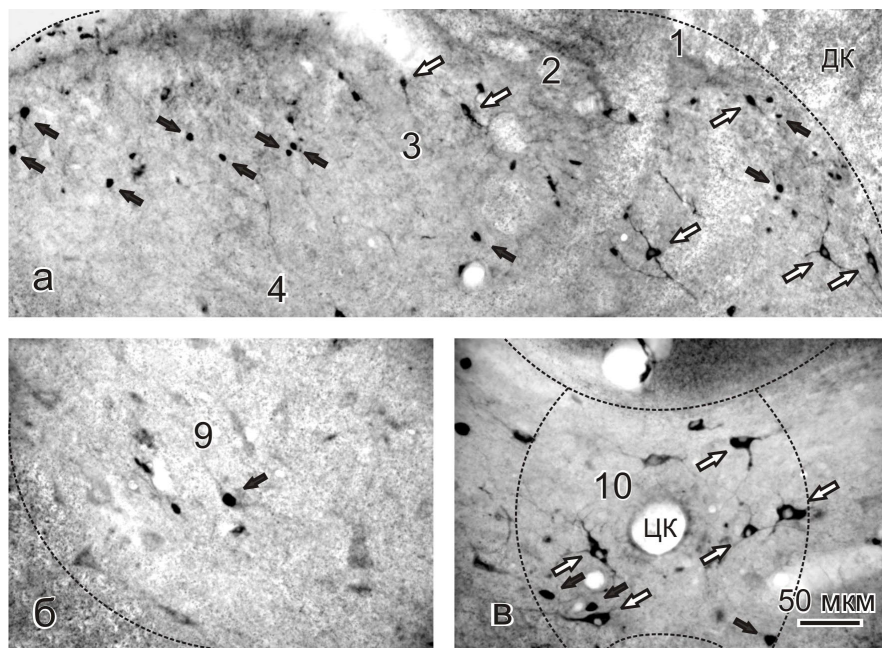


Рис. 3. Фос-імунореактивні та НАДФН-діафоразореактивні нейрони на фронтальному зрізі шийного сегмента С7 (ліворуч) спинного мозку щура після реалізації тваринами харчодобувних рефлексів: а – мічені нейрони у шарах 1–4 сірої речовини спинного мозку, б – моторне ядро (шар 9), в – зона навколо центрального каналу (шар 10). Чорні стрілки – Фос-ір-ядра, білі – НАДФН-др-нейрони. Структури: ДК – дорсальний канатик; ЦК – центральний канал. Масштабна лінія на а–в – 50 мкм



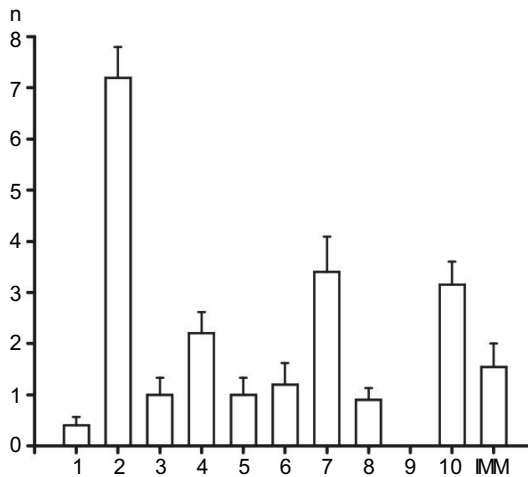


Рис. 4. Розподіл середньої кількості ( $n$ )  $\pm$  стандартна похибка середнього НАДФН-діафоразореактивних нейронів I типу на зріз (унілатерально) у шарах 1–10 та інтермедіомедіальному ядрі (ИММ) сірої речовини шийного потовщення С6/С7 спинного мозку у інтактних щурів. Патерни розподілу таких нейронів у тварин, які голодують, та тварин після виконання стереотипних харчодобувних рухів достовірно не відрізнялися

нейронів утворюються завдяки стимулам різної модальності. У ділянках сірої речовини, які отримують невеликі входи, локалізуються як збуджувальні, так і гальмівні спінальні інтернейрони, які входять до ланцюгів пропріоспінальних комісуральних і висхідних спіноцеребральних шляхів. Відома і пряма проекція аферентів групи Ia на іпсилатеральні групи

мотонейронів, а через комісуральні зв'язки – й на мотонейрони протилежного боку спинного мозку [9].

Раніше вже було показано, що ходіння (30–60 хв) щурів по самохідній доріжці, яке не призводило до стомлення м'язів кінцівок, викликало активацію нейронів у ділянках сірої речовини шийних сегментів, в яких розташовуються нейрони, що реагують на неноцицептивні стимули [8, 15]. У нашій моделі оперантного рефлексу при виконанні тваринами 30-хвилинної моторної програми нестормлювальних рухів передньою кінцівкою також була зареєстрована експресія *c-fos* у цих ділянках.

Відомо, що формування моторних навичок (напрацювання оперантного рефлексу) протягом багатьох днів пов'язане зі структурними та функціональними змінами у мозку [17, 21], а напрацювання оперантного рефлексу може призводити до змін щільності синапсів у спинному мозку та моторній корі і навіть до ініціації ангиогенезу [7]. У нашій попередній роботі виявлені ознаки звуження фокусів нейронної активації в моторній і лімбічній корі головного мозку під час закріплення моторних навичок. Такі функціональні зміни у корі, можливо, пов'язані з посиленням гальмівних механізмів, які відіграють важливу роль у розвитку феномена навчання [3].

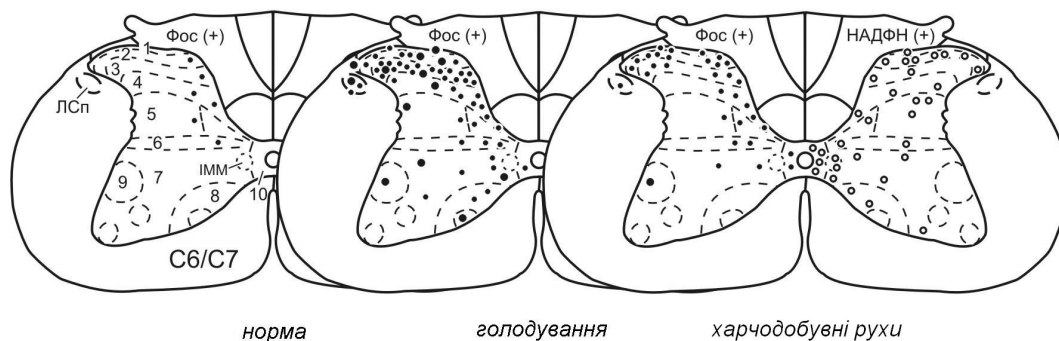


Рис. 5. Фронтальні зрізи шийного потовщення (сегменти С6/С7) з показниками середньої щільності Фос-імунореактивних (точки) та НАДФН-діафоразореактивних (кружечки) нейронів у шарах 1–10, латеральному спінальному ядрі (ЛСп) та інтермедіомедіальному ядрі (ИММ) сірої речовини спинного мозку. Малі та великі точки відображають локалізацію малих і великих Фос-ір-нейронів відповідно

Результати цієї роботи демонструють, що напрацювання тваринами стереотипних рухів протягом 12 діб призводить до змін активації спінальних нейронів, які залежать від специфіки поведінкових вимог моторної задачі. Полегшення аферентних входів груп Ia і II м'язових і шкірних аферентів можуть призводити не тільки до пластичних змін структури та функції спинного мозку, але і до паралельних подібних пластичних змін у корі головного мозку при напрацюванні харчодобувних рухів [1, 4].

Слід зазначити, що у тварин 2-ї та 3-ї групи, особливо 2-ї (при голодуванні), ми реєстрували велику кількість Fos-ір-нейронів у латеральному спінальному ядрі (ЛСп) з обох боків спинного мозку. Як відомо, ЛСп розташовується у дорсальній ділянці латерального канатика в усіх гризунів і задіяне насамперед у передаванні в таламус ноцицептивної інформації [6]. Нейрони цього ядра є також джерелами прямих проєкцій до гіпоталамуса. Нещодавно було зроблене припущення, що ЛСп функціонує як інтегративне ядро і залучене в автономну та гомеостатичну функцію, а також має відношення до розвитку мотиваційно-афективних реакцій, які мають прямий зв'язок з автономними реакціями [7, 12].

Наші результати показують, що розподіл НАДФН-др/НО-генеруючих нейронів та їх середня кількість в 40-мікрометровому зрізі мозку шийного потовщення у щурів 2-ї та 3-ї групи якісно та кількісно не відрізнялися від таких нейронів у мозку контрольних щурів. Також ми не виявили у сірій речовині мозку подвійно мічених (Fos-ір і НАДФН-др) спінальних нейронів як у контрольних, так і у інших груп тварин. Відомо, що НАДФН-др/НО-генеруючі нейрони у спинному мозку ідентифікуються як пропріоспінальні або інтрасегментарні [19].

Підсумовуючи, можна вважати що, описані патерни розподілу спінальних Fos-ір-нейронів шийного відділу спинного мозку відображають можливу причетність цих

популяцій інтернейронів і мотонейронів до формування та реалізації харчодобувних рухів передньою кінцівкою. Відсутність ознак Fos-імунореактивності в НАДФН-др-клітинах, при здійсненні цілеспрямованих рухів, можливо, є одним із доказів того, що такі рухи не мають ноцицептивного компонента. Такі нейрони задіяні здебільшого при надходженні до спинного мозку імпульсації від ноцицептивних рецепторів [24].

Роботу виконано за підтримки гранту „Молекулярні основи функціонування геному (2009–2010)” НАН України.

**О.В. Власенко, А.В. Довгань, В.А. Майский, А.И. Пилявский, А.В. Мазниченко**

#### **ЛАМИНАРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СПИНАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ, КОТОРЫЕ АКТИВИРУЮТСЯ В СОСТОЯНИИ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ ИЛИ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ПИЩЕДОБЫВАТЕЛЬНЫХ СТЕРЕОТИПНЫХ ДВИЖЕНИЙ У КРЫС**

Сравнительное исследование экспрессии раннего гена *c-fos* (маркера нейронной активности) и НАДФН-диафоразной реактивности (НАДФН-др) проводили в шейном отделе спинного мозга контрольных (интактных) крыс после трехдневного голодания животных и после реализации длительных (4–12 повторений в минуту в течение 30 мин) мотивированных стереотипных пищедобывательных движений передней конечностью. По сравнению с контролем, у крыс в состоянии голода и животных, которые выполняли движения, направленные на захват пищи, количество Fos-иммунореактивных (Fos-ир) клеток в дорсальном и вентральном роге в 40-микрометровом фронтальном срезе было достоверно выше ( $P < 0,05$ ). Количество Fos-ир нейронов в большинстве слоев серого вещества мозга крыс, находящихся в состоянии голода, отчетливо превышало количество таких клеток в мозгу животных, длительно выполнявших стереотипные движения. Повышенная Fos-иммунореактивность в поверхностных (2i, 3) и глубоких (4, 5) слоях дорсального рога, очевидно, была вызвана сигналами от периферических и супраспинальных структур. Меченые Fos-ир клетки были обнаружены в слоях 6–8 и 9, что указывает на активность интернейронов и мотонейронов, вовлеченных в формирование оперантных движений передней конечностью. У животных всех групп наблюдалась одинаково высокая плотность НАДФН-др/НО-генерирующих нейронов в сегментах С6/С7 в желатинозной субстанции (слой 2i), а также слоях 7 и 10. НАДФН-др-клетки и Fos-ир-нейроны были перемешаны в слоях серого вещества



мозга, однак двойного окрашивания не наблюдалось. Можно предположить, что НАДФН-др/NO-генерирующие нейроны спинного мозга не активируются при реализации изучаемых оперантных рефлексов в отличие от реакций, содержащих ноцицептивные компоненты.

Ключевые слова: оперантный рефлекс, экспрессия *c-fos*, НАДФН-диафоразная реактивность, спинной мозг, крыса.

**O.V. Vlasenko, O.V. Dovgan', V.A. Maisky,  
A.I. Pilyavskii, A.V. Maznychenko**

### LAMINAR DISTRIBUTION OF THE ACTIVE SPINAL NEURONS DURING THE FEEDING-RELATED STEREOTYPED MOVEMENTS IN THE RAT

The comparative study of expression of early *c-fos*-gene (marker of neuronal activation) and NADPH-diaphorase reactivity (NADPH-dr) was performed in the cervical spinal cord of rats in the control (intact) animal, in the state of starvation and after realization of long-lasting (repeated 4 to 12 times per minute for 30 min) motivated stereotyped food-procuring forelimb movements. In comparison with control rats; in the starving rats or rats showed forelimb movement to reach-to-grasp the food, the number of Fos-immunoreactive (Fos-ir) cells in the dorsal and ventral horns of a 40- $\mu$ m-thick slice was significantly greater ( $P < 0.05$ ). The number of Fos-ir neurons in the starving state clearly exceeded that in the most layers after realization of movements. Increase of Fos immunoreactivity in the superficial (2i, 3) and deeper (4, 5) layers of the dorsal horn was initiated, evidently, by signals from peripheral and supraspinal structures. We also found labelled cells within layers 6–8, and 9 demonstrating the activity of interneurons and motoneurons directly involved into generation of operant forelimb movements. According to our data, high density of NADPH-dr/NO-generating neurons in the C6/C7 segments are observed in the substance gelatinosa (layer 2i) and layers 7 and 10. NADPH-dr cells and Fos-ir neurons were intermixed within the layers but did not demonstrate double-labelling. It is possible to suggest that NADPH-dr/NO-generating cells of the spinal cord did not operate under realization of the studied operant reflexes, which did not include nociceptive component.

Key words: operant reflex, expression *c-fos*, NADPH-diaphorase reactivity, spinal cord, rat.

*M.I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa;*

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

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Власенко О.В., Довгань О.В., Пілявський О.І., Майський В.О., Мазниченко А.В. Зміни експресії *c-fos* та НАДФН-діафоразної активності в різних ядрах гіпоталамуса під час відсторонення від їжі або реалізації оперантних їждобувних рухів у щурів // *Нейрофізіологія / Neurophysiology.* – 2009. – **41**, №2. – С. 173–182.
2. Власенко О.В., Майський В.О., Мазниченко А.В., Пілявський О.І., Мороз В.М. Дослідження експресії *c-fos* і НАДФН-діафоразної активності у спинному та головному мозку при розвитку стомлення м'язів ший у щурів // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, №6. – С. 3–14.
3. Власенко О.В., Пілявський А.І., Майський В.А., Мазниченко А.В. Fos-імунореактивність і НАДФН-д-реактивність в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2008. – **40**, №4. – С. 351–361.
4. Довгань О.В., Власенко О.В., Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В. Топографія Fos-імунореактивних та НАДФН-д-реактивних нейронів у лімбічних структурах основи переднього мозку та гіпоталамусі при реалізації мотивованих стереотипних рухів у щурів // *Нейрофізіологія / Neurophysiology.* – 2009. – **41**, №1. – С. 19–27.
5. Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В., Даценко В.В., Павлюченко В.Б., Костюков О.І., Мойбенко О.О. Центральні нейронні ланцюги рефлексу Бекольда-Яріша у щурів // *Фізіол. журн.* – 2005. – **51**, №2. – С. 24–38.
6. Abbadie C., Skinner K., Mitrovic I., Basbaum A.I. Neurons in the dorsal column white matter of the spinal cord: complex neuropil in an unexpected location // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – **96**. – P. 260–265.
7. Adkins D.L., Boychuk J., Remple M.S., Kleim J.A. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord // *J. Appl. Physiol.* – 2006. – **101**. – P. 1776–1782.
8. Ahn S.N., Guu J.J., Tobin A.J., Edgerton V.R., Tillakaratne N.J. Use of *c-fos* to identify activity-dependent spinal neurons after stepping in intact adult rats // *Spinal Cord.* – 2006. – **44**. – P. 547–559.
9. Bannatyne B.A., Edgley S.A., Hammar I., Jankowska E., Maxwell D.J. Differential projections of excitatory and inhibitory dorsal horn interneurons relaying information from group II muscle afferents in the cat spinal cord // *J. Neurosci.* – 2006. – **26**. – P. 2871–2880.
10. Brown A.G. Organization of the Spinal Cord. The Anatomy and Physiology of Identified Neurons. – New York: Springer, 1981. – 238 p.
11. Dai X., Noga B.R., Douglas J.R., Jordan L.M. Localization of spinal neurons activated during locomotion using the *c-fos* immunohistochemical method // *J. Neurophysiol.* – 2005. – **93**. – P. 3442–3452.
12. Gamboa-Esteves F.O., Tavares I., Almeida A., Batten T.F., McWilliam P.N., Lima D. Projection sites of superficial and deep spinal dorsal horn cells in the nucleus tractus solitarii of the rat // *Brain Res.* – 2001. – **921**. – P. 195–205.
13. 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.
14. Hunt S.P., Pini A., Evan G. Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation // *Nature*. – 1987. – **328**. – P. 632–634.
  15. Jasmin L., Gogas K.R., Ahlgren S.C., Levine J.D., Basbaum A.I. Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat // *Neurosci.* – 1994. – **58**. – P. 275–286.
  16. Kalueff A.V., Maisky V.A., Pilyavskii A.I., Makarchuk N.E. Persistent *c-fos* expression and NADPH-d reactivity in the medulla and the lumbar spinal cord in rat with short-term peripheral anosmia // *Neurosci. Lett.* – 2001. – **301**. – P. 131–134.
  17. 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 // *Neurosci.* – 1996. – **16**. – P. 4529–4535.
  18. Luth H.J., Hedlich A., Hilbig H., Winkelmann E., Mayer B. Morphological analyses of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase positive structures in human visual cortex // *J. Neurocytol.* – 1994. – **23**. – P. 770–782.
  19. Marsala J., Lukacova N., Cizkova D., Lukac I., Kucharova K., Marsala M. Premotor nitric oxide synthase immunoreactive pathway connecting lumbar segments with the ventral motor nucleus of the cervical enlargement in the dog // *J. Chem. Neuroanat.* – 2004. – **27**. – P. 43–54.
  20. 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.
  21. 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.
  22. Morgan J.I., Cohen D.R., Hempstead J.L., Curran T. Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure // *Science*. 1987. – **237**. – P. 192–197.
  23. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. – San Diego: Acad. Press, 1997.
  24. Pilyavskii A.I., Maisky V.A., Kalezić I., Ljubisavljevic M., Kostyukov A.I., Windhorst U., Johansson H. *c-fos* expression and NADPH-diaphorase reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // *Brain Res.* – 2001. – **923**. – P. 91–102.
  25. Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // *Neuroscience.* – 1992. – **46**. – P. 755–784.
  26. Wang Y., Pillai S., Wolpaw J.R., Chen X.Y. Motor learning changes GABAergic terminals on spinal motoneurons in normal rats // *Eur. J. Neurosci.* – 2006. – **23**. – P. 141–150.

Вінницьк. нац. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова;  
 Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ  
 E-mail: maznychenko@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до  
 редакції 05.04.2010