

О.В. ВласенкоВінницький національний медичний
університет імені М.І. Пирогова**СИСТЕМНА ОРГАНІЗАЦІЯ МОЗКОВИХ
СТРУКТУР ПРИ РЕАЛІЗАЦІЇ
ОПЕРАНТНОГО ЇЖОДОБУВНОГО
РЕФЛЕКСУ В ЩУРІВ****Ключові слова:** оперантний
рефлекс, ген *c-fos*, структури мозку,
щур.**Резюме.** Сформульовано концепцію часово-просторової взаємодії нейронних систем мозку в процесі вироблення та реалізації програми оперантного їждобувного рефлексу в експериментальних тварин. Під час реалізації рефлексу імуногістохімічно виявлено експресію білка ранньої відповіді *c-Fos*, пов'язану з активацією нейронів структур мозку, які задіяні у формування моторної програми. Посилену експресію *c-Fos* було виявлено в низці мотиваційних, сенсорних та моторних центрів. Серед мотиваційних структур найбільша активність спостерігалася в мигдалеподібному комплексі, гіпоталамусі, а також у холінергічних нейронах безіменної субстанції, базальному ядрі Мейнерта та нейронах острівців Калеха. До комплексної реакції організму у процесі реалізації оперантних рефлексів залучені такі автономні центри як ядро самотного шляху, подвійне ядро, дорсальне моторне ядро блукаючого нерва, ростровентролатеральне і каудовентролатеральне ретикулярні ядра довгастого мозку. Висхідні впливи мотиваційних і автономних центрів опосередковуються через інсулярну і медіальну префронтальну кору, тобто кортикальну мережу, пов'язані з емоційними та когнітивними процесами. Серед сенсорних структур ЦНС найбільшу активність нейронів було виявлено у спинномозкових пластинках 2-5, у сенсорній корі, каудальній частині спинномозкового ядра трійчастого нерва, передньому нюховому ядрі, піриформній корі. Серед структур, найбезпосередніше задіяних у контроль моторних компонентів поведінки, інтенсивні зміни експресії *c-Fos* відбувалися в спинномозкових пластинках 6-8 і 9, латеральному ядрі мозочка, у каудатопутамені, вентролатеральному ядрі таламуса і власне в моторній корі. Кора реалізує свої керуючі функції на завершальному етапі формування програми, отримуючи всю необхідну аферентну інформацію від моторних, мотиваційних і сенсорних центрів та виробляючи низхідну кортикальну моторну команду.**Вступ**

Процес формування рухових навичок супроводжується активацією великої кількості мозкових структур, які взаємодіють між собою, утворюючи системи для досягнення корисного пристосованого результату. І хоча класичні схеми взаємодії нервових центрів опубліковані вже давно [1], нові дослідження дозволяють уточнювати, доповнювати і описувати подібні схеми навіть у людей [2]. Видається логічним, що для кожного поведінкового акту створюється особлива схема, яка має відмінності, але побудована за загальним принципом і має спільні риси із схемами взаємодії нервових центрів при подібних реакціях організму. Однією з експериментальних моделей, яка широко використовується в сучасних дослідженнях, є

вироблення у щурів оперантного їждобувного рефлексу [3]. В наших попередніх роботах методом імуногістохімічного виявлення активності нейронних систем мозку за допомогою експресії гену *c-fos* досліджено зміни в окремих нервових центрах [4-8], але інтегрованої схеми діяльності нервових центрів ще не було описано. Дана робота узагальнює результати наших досліджень у вигляді схеми взаємодії мотиваційних, сенсорних та моторних центрів.

Мета дослідження

Створити моделі часово-просторових процесів активації нейронних систем мозку щура під час реалізації моторного компоненту оперантного їждобувного рефлексу.

Матеріал і методи

У досліджах були використані дві групи щурів-самців лінії Вістар масою 250-300 г. Інтактна група 1 (n = 4) отримувала достатнє стандартне харчування й слугувала контролем. У тварин групи 2 (n = 4) створювали харчову мотивацію (при вільному доступі до води голодуванням протягом 3 діб і вироблення оперантного їждобувного рефлексу) [3]. Тренувальні сеанси тривалістю 30 хв проводилися щоденно протягом 12 днів. Щури навчалися реалізовувати стереотипні рухи захоплення однією з передніх кінцівок харчових кульок з годівниці (чотири-12 хватів їжі за хвилину, близько 50-200 штук за один сеанс). Усі експериментальні процедури були виконані відповідно до Європейської директиви Ради співтовариств від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Щурів груп 1, 2 (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 містив 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°C у 30 % розчині сахарози, приготованому на СФБ. На заморожуючому мікромомі виготовляли фронтальні зрізи товщиною 40 мкм, які збирали в лунки із СФБ для подальшого імуногістохімічного забарвлення. Виявлення Fos-імунореактивних-ядер (Fos-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). Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер при збільшенні 250 або 400. Підрахунок Fos-ір-ядер нейронів у структурах головного мозку проводили білатерально за допомогою оптичного мікроскопа; локалізацію структур визначали за атласом [9], щільність Fos-ір-нейронів підраховували (кількість мічених клітин на площах зрізів мозку 200 x 200 мкм²). Обстежуючи три-чотири зрізи окремих досліджуваних рівнів головного мозку кожної тварини, розраховували середню щільність Fos-ір-нейронів ± похибку 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 $P < 0,05$.

Обговорення результатів дослідження

Оцінка результатів проходила у кілька етапів: по-перше, візуально оцінювали і відбирали центри, в яких Fos-імунореактивні нейрони мали більшу щільність, ніж оточуючі структури. По-друге, на серійних фронтальних зрізах оцінювали середню щільність Fos-ір нейронів відібраних структур. На третьому етапі ми аналізували можливі механізми залучення відібраних структур до реалізації оперантного рефлексу і до можливих зв'язків із моторною корою.

У лімбічній корі була знайдена невисока густина розподілу мічених нейронів в 5 шарі в порівнянні з основними фокусами локалізації (у 2 і 3 шарах). Так, у вторинній поясній корі щільність розподілу Fos-ір нейронів в 5 шарі була менша приблизно в три рази ($12,8 \pm 2,4$ Fos-ір клітин на рівні + 0,2 мм) у порівнянні з їх середньою щільністю у 2 і 3 шарах ($45,0 \pm 5,1$ Fos-ір клітин на рівні + 0,2 мм). Однак на інших рівнях (від 2,7 до 1,6 ростральніше брегми) в 5 шарі виявлялася висока щільність Fos-ір клітин. Необхідно відзначити, що найбільш крупні ядра (10-12 мкм в діаметрі) реєструвалися в 5 шарі як в лімбічних, так і моторних областях кори. Можливо, що ці ядра належали великим пірамідним нейронам, локалізованим в цьому шарі кори. Нейрони, локалізовані в 4 і 6 шарах, мали більш дрібні (5 мкм в діаметрі) зафарбовані ядра.

Як виявилось, при реалізації інтенсивних напружених оперантних рухів реєструються статистично вірогідно вищі порівняно з контролем рівні експресії c-fos у лімбічних холінергічних ядрах - медіальній перегородці, ядрах вертикальної та горизонтальної гілок діагональної смужки, великоклітинному преоптичному ядрі, безіменній субстанції, базальному ядрі Мейнерта, острівцях Калеха, а також у латеральному й паравентрикулярному ядрах гіпоталамуса.

У нижній лімбічній корі на рівні + 2,7 мм в експериментальних у порівнянні з контрольними тваринами було знайдено статистично достовірно більш високу щільність порівняно з контролем стан реалізації мотивованих стереотипних рухів передньої кінцівки зумовлювали статистично вірогідно вищі ($p < 0,05$) рівня експресії c-fos білатерально у нюховому ядрі мигдалеподібного тіла,

у грушоподібній, прелімбічній і нижній лімбічній корі на рівні +2.7 мм. Проте на рівні максимального перерізу медіальної префронтальної кори (+ 2,2 мм від брегми) середня щільність Fos-ір-нейронів була вірогідно нижчою ($p < 0,05$) іпсилатерально порівняно з такою на контралатеральному боці в усіх шарах кори. Наприклад, у прелімбічній корі у шарах 2 і 3 вона складала $10,6 \pm 1,5$ та $32,3 \pm 3,6$ мічених нейрона на один зріз іпси- та контралатерально, відповідно. Послідовність середніх значень щільності Fos-ір-нейронів у структурах основи переднього мозку у щурів контрольної та експериментальної груп на рівні + 2,7 мм була наступною: піриформна кора > прелімбічна кора > нижня лімбічна кора > переднє нюхове ядро мигдалеподібного тіла > прилегле ядро (серцевина).

Експресія c-fos в моторній корі після реалізації стереотипних рухів передньою кінцівкою мала свої топографічні особливості. У порівнянні з тваринами контрольної групи, у тварин експериментальної групи (14 доби тренування) було відмічене достовірно менша середня густина мічених нейронів в 2-4 і 6 шарах первинної моторної кори на рівнях + 2,2 мм і 1,6 мм, і в шарах 2-4 на рівні + 0,2 мм. Окім моторної кори, високий рівень активності виявлено у таких моторних центрах як релейні ядра таламусу (вентролатеральне та вентромедіальне, іпсилатерально), латеральне (зубчасте) ядро мозочка (контралатерально робочій кінцівці), червоне ядро (контралатерально), у хвостатому ядрі (білатерально), а також функціонально пов'язаній з хвостатим ядром латеральній частині чорної субстанції і латеральній частині компактної частини чорної субстанції.

Експресія c-fos в дорсолатеральному стріатумі мозку щурів характеризується інтенсивним проявом на зрізах мозку тварин контрольної і експериментальних груп у хвостатому ядрі на каудальних рівнях його перерізу (від - 1,4 до - 2,56 мм каудальніше брегми). У інтактних тварин загальний розподіл Fos-ір-нейронів у хвостатому ядрі був рівномірним на обох сторонах мозку. Середня кількість мічених клітин склало $106,5 \pm 4,2$; $109,1 \pm 5,9$; $91,2 \pm 4,0$ і $84,1 \pm 1,7$ одиниць на рівнях - 1,4; - 1,8; - 2,12 і - 2,56 мм каудальніше брегми, відповідно. У голодуючих щурів спостерігали суттєво низький рівень c-fos експресії у двох півкулях мозку на усіх досліджених рівнях.

Експресія c-fos в структурах довгастого мозку в контролі і після реалізації їждобувних оперантних рухів також мала характерні ознаки. У контрольних тварин базовий рівень c-fos експресії був достатньо високим у дорсомедіальних і вент-

ролатеральних ділянках довгастого мозку по усій його довжині. Fos-імунореактивність реєструвалася в автономних (ядрі одинокого тракту, паратригеминальному ядрі, каудовентральному і ростовентролатеральному ретикулярних ядрах), ретикулярних (дорсальна частина ретикулярного ядра довгастого мозку, інтрамедіальне ретикулярне ядро) і сенсорному (спинальне тричасте ядро інтерполярна частина) ядрах.

Експресія c-fos у спинному мозку в нормі та під час голодування щурів мала наступні характеристики. Середня кількість Fos-ір-клітин (мічених нейронів) у шийних сегментах С6/С7 (рівні представництва передніх кінцівок) контрольних тварин була незначною - 5-7 клітин у 40-мкм фронтальному зрізі. Однак у мозку щурів після голодування порівняно з нормою середня кількість мічених нейронів була достовірно більшою у шарах 1-9 сірої речовини спинного мозку ($p < 0,05$).

Висока щільність Fos-ір-нейронів відмічалась 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 $5,6 \pm 0,4$ Fos-ір-клітин, відповідно) та у шарі 7 (інтермедіальна зона вентрального рога - $5,8 \pm 0,6$ Fos-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) даних сегментів, та невелика кількість у латеральному спінальному ядрі з обох боків мозку. Додатково відзначимо активність у латеральних та медіальних моторних ядрах (2-3 Fos-ір-клітини великих розмірів, близько 40 мкм у діаметрі, на зрізі). Рівень Fos-ір в різних шарах сірої речовини сегментів шийного потовщення С6/С7 у тварин після голодування представляється у такій послідовності: шар 3 > шар 2 > шар 7 > шар 4.

Таким чином, імуногістохімічне виявлення різних структур головного мозку експресії білка ранньої відповіді c-Fos в нейронах під час реалізації дослідженого рефлекса дає можливість ідентифікувати церебральні нейронні системи і запропонувати власну модифікацію схеми [1], враховуючи особливості реалізації оперантного рефлексу (рис.).

Висновки

1. Процес вироблення у щурів оперантного їждобувного рефлексу супроводжується посиленою експресією білка ранньої відповіді c-Fos у мотиваційних, сенсорних та моторних центрах головного та спинного мозку.

2. Формування моторної програми еферентної

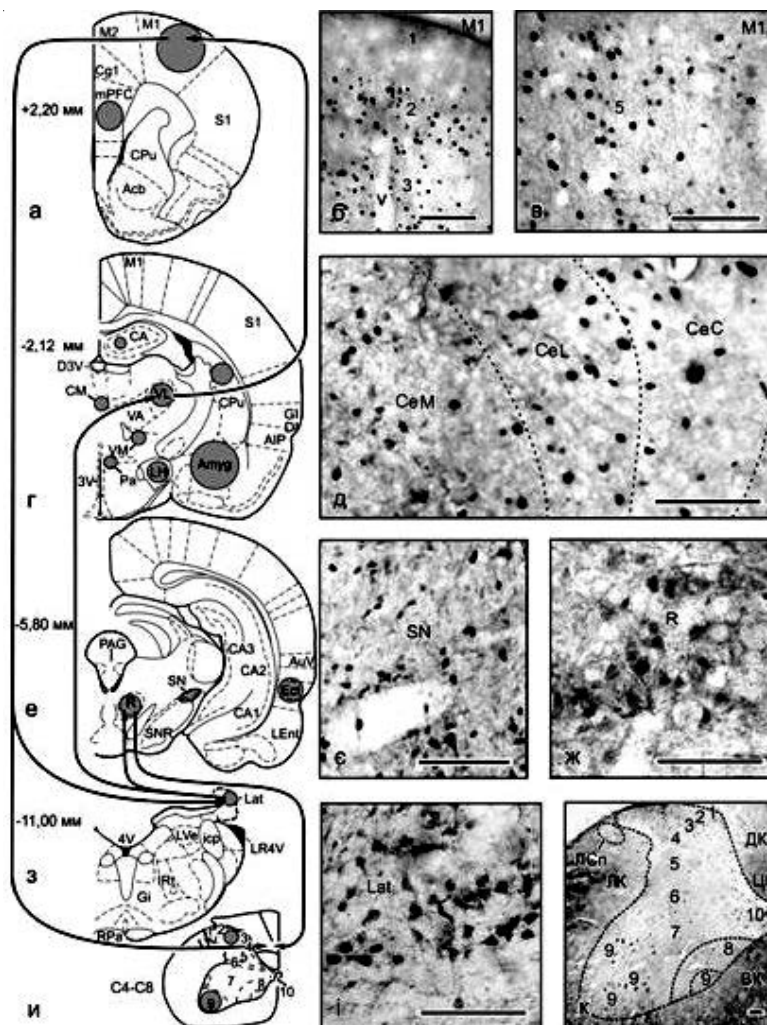


Рис. Схема взаємодії структур мозку із моторною корою під час реалізації оперантного їждобувного рефлексу (ліва колонка) та мікрофотографії Fos-імунореактивних нейронів структур, залучених до системної реакції (права колонка) за Р. Шмідтом [1] із доповненнями. Фронтальні зрізи мозку різних рівнів: а - первинної моторної кори (M1) (+2,2 мм від брегми), г - мигдалеподібного тіла (Amyg) та латерального гіпоталамуса (LH), вентролатерального ядра таламуса (VL) (-2,1 мм), е - червоного ядра (R) (-5,8 мм), з - латерального ядра мозочка (Lat) (-11,0 мм), и - сегментів (C4-C8) спинного мозку. Мікрофотографії: б, в - M1, д - Amyg, е - чорної субстанції, ж - R, и - Lat, к - C4-C8. Масштабна лінія - 100 мкм, відноситься до усіх фрагментів.

відповіді відбувається за обов'язкової активації та надходження інформації з таких мотиваційних центрів як мигдалеподібний комплекс, гіпоталамус і таких сенсорних як переднє нюхове ядро, 2, 3 і 4, 5 спинномозкові пластини, піриформна та сенсорна кора.

3. Активація таких рухових центрів як латеральне ядро мозочка, каудатопутамен, вентролатеральне ядро таламуса забезпечує можливість моторній корі реалізувати свої керуючі функції через низхідну кортикальну моторну команду на інтер- та мотонейрони 6-8 і 9 пластин шийного потовщення спинного мозку.

Перспективи подальших досліджень вбачаються у використанні цієї методики для моделювання патологічних процесів у ЦНС і встановлення участі мозкових структур у

формуванні різноманітних симптомокомплексів.

Література. 1. Физиология человека / В 4-х томах. Т. I. Пер. с англ. / Под ред. Р.Шмидта и Г.Тевса. - М. : Мир, 1985. - 266 с. 2. Tzvi E. Delineating the cortico-striatal-cerebellar network in implicit motor sequence learning / E. Tzvi, T.F. Munte, U.M. Kramer // Neuroimage. - 2014. - V.94. - P. 222-230. 3. Особливості формування параметрів їждобувних рухів щурів в умовах вільної поведінки / В. М. Мороз, М. В. Йолтуховский, О. В. Власенко, І. Л. Рокунець, М. М. Йолтуховский // Вісн. Вінницького національного мед. університету. - 2010. - Т. 4, № 1, С. 1-14. 4. Fos-імунореактивність и НАДФН-д-реактивність в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью / О. В. Власенко, А. И. Пилявский, В. А. Майский, А. В. Мазниченко // Нейрофизиология/Neurophysiology. - 2008. - Т. 40, № 4. - С. 348-358. 5. Власенко О. В. Експресія с-fos як показник функціональної взаємодії фронтальної кори і лімбічних структур головного мозку під час їждобувних стереотипних рухів у щурів / О. В. Власенко, О. В. Довгань // Нейрофизиология/Neurophysiology. - 2008. - Т. 40, № 3. - С. 256-259. 6. Топографія Фос-імунореактивних та НАДФН-д-реактивних

нейронів у лімбічних структурах основи переднього мозку та гіпоталамусі при реалізації мотивованих оперантних рухів у щурів / О. В. Довгань, О. В. Власенко, В. О. Майський, О. І. Пілявський, А. В. Мазниченко // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. - 2009. - Т. 41, № 1. - С. 32-40. 7. Ламінарний розподіл активних нейронів у спинному мозку при реалізації їждобувних стереотипних рухів у щурів / О. В. Власенко, О. В. Довгань, В. О. Майський, О. І. Пілявський, А. В. Мазниченко // *Фізіол. ж.* - 2010. - Т. 56, № 4. - С. 86-95. 8. Активация нейронов в автономных центрах продолговатого мозга при реализации мотивированных оперантных движений у крыс / О. В. Власенко, Т. В. Бузька, В. А. Майский, А. И. Пилявский, А. В. Мазниченко // *Нейрофизиология/Neurophysiology*. - 2010. - Т. 42, № 5. - С. 390-404. 9. Paxinos G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson. - San Diego: Acad. Press, 1997. - 197 p.

СИСТЕМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОЗГОВЫХ СТРУКТУР ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ОПЕРАНТНОГО ПИЩЕДОБЫВАТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА У КРЫС

О. В. Власенко

Резюме. Сформулирована концепция временно-пространственной взаимодействия нейронных систем мозга в процессе выработки и реализации программы оперантного пищевого рефлекса у крыс. Иммуногистохимически обнаружено экспрессию белка раннего ответа c-Fos, связанную с активацией нейронов структур мозга, которые задействованы в формировании моторной программы. Усиленную экспрессию c-Fos было обнаружено в ряде мотивационных, сенсорных и моторных центров. Среди мотивационных структур наибольшая активность наблюдалась в миндалевидном комплексе, гипоталамусе, а также в холинергических нейронах безымянной субстанции, базальном ядре Мейнерта и нейронах островков Калеха.

В комплексной реакции организма в процессе реализации оперантного рефлекса вовлечены такие автономные центры как ядро одинокого пути, двойное ядро, дорсальное моторное ядро блуждающего нерва, ростоventролатеральне и каудовентролатеральне ретикулярные ядра продолговатого мозга. Восходящие влияния мотивационных и автономных центров опосредуются инсулярной и медильной префронтальной корой, то есть кортикальными сетями, связанными с эмоциональными и когнитивными процессами. Среди сенсорных структур ЦНС наибольшую активность нейронов было обнаружено в спинномозговых пластинках 2 - 5, в сенсорной коре, каудальной части спинномозгового ядра тройничного нерва, переднем обонятельном ядре, пириформной коре. Среди структур, задействованных в контроль моторных компонентов поведения, интенсивные изменения экспрессии c-Fos происходили в спинномозговых пластинках 6 - 8 и 9, латеральном ядре мозжечка, в кау-

датопутаме, вентролатеральном ядре таламуса и, собственно, в моторной коре. Кора генерирует моторную команду на завершающем этапе формирования программы, получая всю необходимую афферентную информацию от двигательных, мотивационных и сенсорных центров.

Ключевые слова: оперантный рефлекс, ген c-fos, структуры мозга, крыса.

SYSTEMIC ORGANIZATION OF BRAIN STRUCTURES IN REALIZATION OF OPERANT FOOD-PROCURING REFLEX IN RATS

O. V. Vlasenko

Abstract. A concept of time-space interaction of neuronal systems in the process of developing and implementing the program of operant food-getting reflex in rats was formulated. Expression of early response protein c-Fos-associated with activation of brain structures neurons that are involved in the development of motor program was revealed immunohistochemically. Enhanced c-Fos expression was detected in a number of motivational, sensory and motor centers. Among motivational structures the highest activity was observed in amygdala, hypothalamus, as well as in cholinergic neurons of substantia innominata, nucleus basalis of Meynert and neurons of Calleja islands.

In complex reaction of organism in the process of implementation of operant reflex autonomous centers such as nucl. tractus solitarius, nucl. ambiguous, dorsal motor nucleus of n. vagus, and rostroventrolateral and caudoventrolateral reticular nuclei of medulla oblongata are involved. Rising influence of motivational and autonomous centers is mediated by insular and medial prefrontal cortex, i.e. cortical networks, connected with emotional and cognitive processes. Among the sensory structures of CNS neurons the greatest activity was found in 2-5 layers in the spinal cord, in the sensory cortex, caudal part of spinal nucleus of trigeminal nerve, anterior olfactory nucleus, piriform cortex. Among structures involved in control of motor components of behavior, intense changes of the c-Fos expression were found in 6-8, 9 layers in the cervical spinal cord, lateral nucleus of cerebellum, caudatoputamen, thalamus ventrolateral nucleus and in motor cortex proper. Cortex gets all the necessary afferent information from motor, motivational and sensory centers, generates motor command in the final stage of program formation.

Key words: operant reflex, c-fos gene, brain structures, rat.

Pirogov National Memorial Medical University (Vinnitsya)

lin. and experim. pathol. - 2015. - Vol. 14, №1 (51). - P. 35-39.

Надійшла до редакції 27.02.2015

Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький

© О. В. Власенко, 2015