

О. В. ВЛАСЕНКО¹, О. В. ДОВГАНЬ¹, О. І. ПІЛЯВСЬКИЙ²,
О. О. МАЙСЬКИЙ², А. В. МАЗНИЧЕНКО²

ЗМІНИ ЕКСПРЕСІЇ *c-fos* ТА НАДФН-ДІАФОРАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В СТРУКТУРАХ ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ, ПОВ'ЯЗАНІ З ХАРЧОВОЮ ДЕПРИВАЦІЄЮ ТА РЕАЛІЗАЦІЄЮ ОПЕРАНТНИХ ЇЖОДОБУВНИХ РУХІВ

Надійшла 20.03.09

Досліджували експресію раннього гена *c-fos* (маркера нейронної активації) та НАДФН-діафоруазну реактивність (НАДФН-др) у різних структурах гіпоталамуса щурів у нормі, у стані голодування та після реалізації тривалих (чотири–12 разів за 1 хв протягом 30 хв) мотивованих стереотипних їжодобувних рухів передньою кінцівкою. Порівняно з контролем у щурів у стані голодування щільність (кількість одиниць у 40-мікрометровому зрізі на тест-ділянці 200 × 200 мкм²) Fos-імунореактивних (Fos-ір) нейронів була вірогідно більшою ($P < 0.05$) у мілкоклітинній частині паравентрикулярного ядра (*Pa*), супраоптичному (*SO*) й медіальному преоптичному (*MPO*) ядрах, передній гіпоталамічній області (*AH*) та латеральному гіпоталамічному ядрі (*LH*). У дорсомедіальному (*DMD*) і вентромедіальному (*VMHD*) гіпоталамічних ядрах цей показник не відрізнявся від контрольних значень. Після реалізації твариною інтенсивних унілатеральних оперантних рухів вища щільність мічених нейронів (порівняно з такою у контрольних та голодуючих тварин) була виявлена в *Pa*, *SO*, *MPO* та *DMD*, менша – у *LH* та *VMH*. НАДФН-др-нейрони (тобто ті, що вміщують NO-синтазу) спостерігались у багатьох ядрах гіпоталамуса, а найбільша щільність таких NO-генеруючих нейронів була зареєстрована в *Pa*, *SO*, *MPO* і *DMD*. Переважна більшість Fos-ір- та НАДФН-др-нейронів у тварин після реалізації стереотипних їжодобувних рухів були виявлені в *Pa* та *SO*. Відмічена специфіка змін кількості Fos-ір- та НАДФН-др-нейронів в ядрах гіпоталамуса, вірогідно, відображає причетність цих структур до регулювання автономних функцій при реалізації оперантних рефлексів та адаптації функції серцево-судинної системи щодо відповідного інтенсивного фізичного та емоційного навантаження.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мотивація, оперантний їжодобувний рефлекс, *c-fos*-експресія, синтаза оксиду азоту, гіпоталамус.

ВСТУП

Організація аферентних та еферентних зв'язків гіпоталамуса свідчить про те, що цей комплекс структур є виключно важливим мозковим центром, причетним до виконання соматичних, вегетативних та ендокринних функцій. Аферентні впливи, які надходять до гіпоталамуса, інтегруються в його численних ядрах, а вихідні впливи, сигнали з яких

надходять до центральних структур і координують моторні та ендокринні функції, істотною мірою пов'язані з регуляцією харчової поведінки та клітинного метаболізму [1]. Різні ядра гіпоталамуса мають між собою реципрокні структурно-функціональні зв'язки [2–4]. Особливу увагу привертають взаємні проєкції нейронних структур дорсомедіальних (*DMD*) і паравентрикулярних (*Pa*) ядер з латеральним ядром (*LH*) [5–7], оскільки *DMD* і *LH* входять до складу „часового механізму” циклічного генератора прийому їжі [8].

Раніше було показано, що після тривалого відсторонення тварин від їжі (харчової депривації) відбувалося помітне збільшення клітинної актив-

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

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

ності (згідно з характером експресії *c-fos*) у таких ядрах, як *LH* і *Pa* [9, 10]. У той же час білатеральне руйнування цих ядер не призводило до зникнення їжодобувної поведінки [11]. Тому можна припустити, що в ініціації та регуляції їжодобувної поведінки беруть участь також інші ядра гіпоталамуса [12] та субпопуляції нейронів інших фенотипів. До таких нейронів, можливо, відносяться клітини, які генерують оксид азоту (NO). Концентрація нейронної ізоформи синтази NO (NOS) у гіпоталамусі досить значна [13]. Було встановлено, що інтрагіпоталамічні ін'єкції попередників NO відчутно впливають на вивільнення як збуджуючих, так і гальмівних медіаторів у супраоптичному ядрі (*SO*) [14], а інактивація гена нейронної NOS призводить до зниження секреції вазопресину (на відміну від такої окситоцину) [15].

Метою нашого дослідження було встановлення розподілу Fos-імунореактивних (Fos-ір) та НАДФН-д-реактивних (НАДФН-др) нейронів у різних ядрах гіпоталамуса в умовах голодування тварин (відсторонення від їжі, харчової депривації) та після посилення моторної активності, спрямованої на досягнення й захват їжі (унілатеральних оперантних їжодобувних рухів передньою кінцівкою) [10]. Особливу увагу було приділено вивченню змін у тих ядрах гіпоталамуса, які причетні до прямих або опосередкованих впливів на коркові та підкоркові структури, задіяні у формуванні моторних команд.

МЕТОДИКА

Експериментальні групи. У дослідах були використані три групи щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г: група 1 – контрольна ($n = 4$), група 2 – тварини, які голодували протягом трьох днів при вільному доступі до води ($n = 4$), і група 3 – тварини, які виконували мотивовані оперантні їжодобувні рухи ($n = 4$). У тварин групи 3, що знаходились у стані харчової мотивації (голодування протягом дня перед кожним тренуванням), виробляли стереотипні оперантні рефлекторні рухи передньою лівою кінцівкою і пальцями, які забезпечували захоплення харчових кульок з годівниці (близько 150–200 штук за один сеанс, чотири–12 захватів їжі на 1 хв; 12 тренувальних сеансів по 30 хв протягом 12 днів). Усі експериментальні процедури були виконані відповідно до Європейської директиви Ради співтовариств від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Фіксація. Щурів груп 1, 2 та 3 (останніх – через 2 год після закінчення 12-ї тренувальної сесії) під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, внутрішньоочеревинно; «Sigma», США) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером – ФБ (250 мл), що вміщував 0.2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Перфузію продовжували 4 %-вим параформальдегідом, розчиненим у ФБ (0.1 М, 500 мл, рН 7.3). Головний мозок кожної тварини швидко виділяли й додатково фіксували протягом 12 год, а потім з метою кріопroteкції витримували 48 год при 4 °С у 30 %-вому розчині сахарози, що готували на ФБ. На заморожувачому мікромі виготовляли фронтальні зрізи мозку товщиною 40 мкм, котрі збирали в лунки із сольовим ФБ для подальшого імуногістохімічного й гістохімічного забарвлення.

Fos-імуногістохімія. Виявлення 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) [16, 17]. Підрахунок Fos-ір-ядер нейронів у структурах гіпоталамуса здійснювався із застосуванням оптичного мікроскопа при збільшеннях $\times 250$ або $\times 400$; локалізація відповідних клітин визначалася за атласом [18]. Мічені нейрони ідентифікували по темно-коричневому забарвленню їх ядер.

НАДФН-діафоразна гістохімія. Для виявлення НАДФН-др-нейронів зрізи додатково витримували 1 год при 37 °С у ФБ (0.1 М, рН 7.3), що вміщував 0.3 % детергента Triton X-100, 0.2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0.5 мг/мл редукованого β -НАДФН («Sigma», США) [19]. НАДФН-др-нейрони ідентифікували в зрізах мозку за блакитним забарвленням їхньої цитоплазми.

Статистика. Щільність Fos-ір-, НАДФН-др-нейронів та клітин з подвійним забарвленням (кількість мічених клітин на тест-площах зрізів мозку 200×200 мкм²) підраховували в передній гіпоталамічній ділянці (*AH*), дорсальній частині *DMD*, дорсальній і вентральній частинах латеральної гіпоталамічної області (*LHD* і *LHV* відповідно), медіальному преоптичному ядрі (*MPO*) та *SO*, передній та медіальній (міллоклітинній) частинах паравентрикулярного гіпоталамічного ядра (*PaAP* та *PaMP* відповідно), сірому горбику (*TC*), а також у дорсальній і вентральній частинах вентрального

гіпоталамічного ядра (*VMHD* і *VMHV* відповідно) на рівнях від -1.3 до -2.8 мм від брегми (за атласом [18]). Середня щільність Fos-ір- та НАДФН-др-нейронів у зрізі мозку товщиною 40 мкм на тест-площах ядер гіпоталамуса розраховувалася згідно з даними по трьох-чотирьох зрізах, отриманих від кожної тварини всіх трьох груп. Для кожної структури підраховували до 20 значень щільності мічених нейронів та клітин з подвійним міченням у межах окремих тест-ділянок. Значення середніх щільностей мічених клітин у різних структурах гіпоталамуса 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

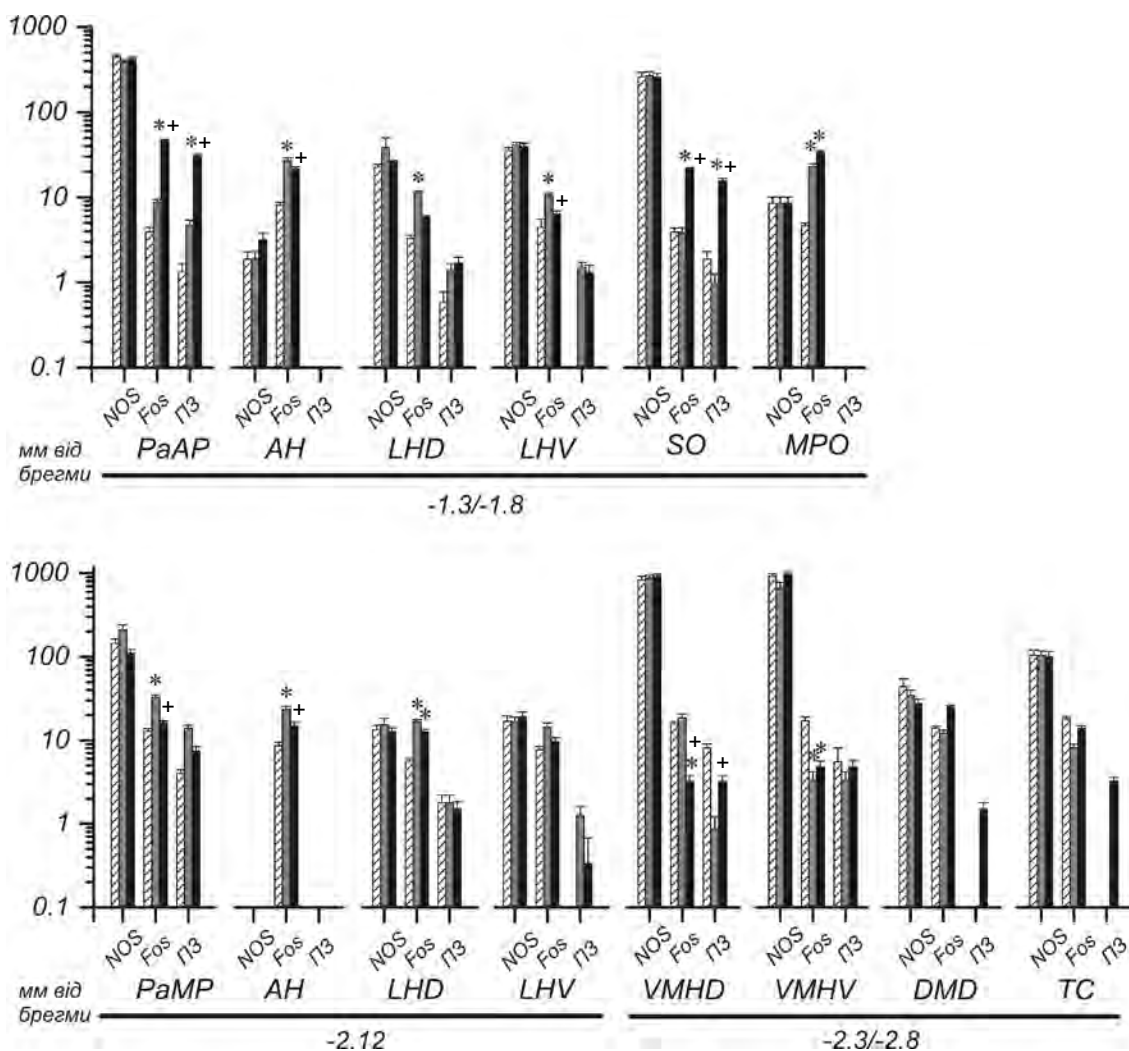
Fos-імунореактивність в ядрах гіпоталамуса. Істотна Fos-імунореактивність була зареєстрована у піддослідних тварин усіх трьох груп в ядрах переднього (*AH*), латерального (*LHD*, *LHV*), дорсомедіального (*DMD*) і вентромедіального (*VMHD*, *VMHV*) відділів гіпоталамуса, а також у *Pa*, *SO*, *MPO* і *TC* на його ростральному ($-1.3...-1.8$ мм від брегми) і середньому ($-2.12...-2.8$ мм) рівнях. У щурів контрольної групи щільність Fos-ір-клітин на ростральних рівнях у *PaAP*, *LHD*, *LHV*, *SO* та *MPO* була незначною (три–п'ять мічених клітин у 40-мікрометровому зрізі на площі 200×200 мкм²). На рівні ж -2.12 мм щільність таких клітин була вищою, досягаючи п'яти–семи Fos-ір-клітин у *LHD* і *LHV* і близько 12 клітин у *PaMP*. Відмітимо, що в *AH* на цих рівнях щільність імунореактивних клітин складала близько восьми одиниць. На рівнях $-2.3...-2.8$ мм у *VMHD*, *VMHV*, *DMD* та *TC* середня щільність Fos-ір-нейронів була значно вищою (у межах 14–18 клітин) (рис. 1). Таким чином, у різних гіпоталамічних ядрах контрольної групи тварин спостерігалася наступна послідовність значень середньої щільності мічених Fos-ір-нейронів: *LHD* < *LHV* < *AH* < *PaMP* < *DMD* < *VMHD* < *VMHV* < *TC*.

Порівняно з тим, що відмічалася в контролі, у тварин після періоду голодування (група 2) рівень експресії *c-fos* у багатьох гіпоталамічних структурах на рівнях від -1.3 до -2.12 мм від брегми був вірогідно більшим. Найвища середня щільність Fos-ір-нейронів була зареєстрована в *PaMP* (30.1 ± 1.9), *AH* (26.9 ± 2.0) і *MPO* (24.5 ± 2.4 міченого

нейрона в тест-ділянці) (рис. 1; 2), а найменша – у *VMHV* та *SO* (3.3 ± 0.8 та 4.06 ± 0.6 міченої клітини відповідно). У той же час щільність таких клітин у *VMHV* і *TC* на рівнях -2.3 та -2.8 мм була вірогідно нижчою ($P < 0.05$), а у *VMHD* та *DMD* вона взагалі істотно не відрізнялася від контрольних показників ($P > 0.05$) (рис. 1).

Порівняно з контрольними щурами та тваринами після харчової депривації щури, котрі реалізували оперантні рухи (група 3), демонстрували дуже високі значення середньої щільності Fos-ір-нейронів у *PaAP*, *MPO*, *DMD* і *SO* (45.4 ± 2.3 , 35.9 ± 2.5 , 25.1 ± 1.2 та 23.4 ± 0.8 Fos-ір-нейрона відповідно) (рис. 1; 3). Цей показник був досить незначним у *VMHV* та *VMHD* (3.2 ± 0.6 та 4.8 ± 0.8 Fos-ір-клітини відповідно). Відмітимо, що в *PaAP*, яке є одним з основних нейросекреторних ядер гіпоталамуса і джерелом проєкцій у задню долю гіпофіза, середня щільність мічених клітин у тварин групи 2 була в два рази, а у тварин групи 3 – у десять разів більшою, ніж відповідні значення у щурів в групі контролю (рис. 1). Висока щільність Fos-ір-нейронів була зареєстрована у голодуючих щурів та тих, що виконували оперантні рухи, також у мігруючих острівцях нейросекреторних нейронів (*Acc*) у межах *LHV* (рис. 2, Б). Важливо відзначити, що у щурів груп 2 та 3 Fos-ір-нейрони майже рівномірно розподілялися в різних структурах переднього й середнього гіпоталамуса по обидва боки мозку, тобто ознак іпси- або контралатерального переважання кількості таких одиниць практично не спостерігалася.

НАДФН-д-реактивність в ядрах гіпоталамуса. НАДФН-др-нейрони, тобто клітини, котрі вміщували NOS, були присутні в багатьох структурах гіпоталамуса. Висока щільність таких нейронів (від 300 до 1000 одиниць на площі зрізу 200×200 мкм²) виявлялась у *VMHD*, *VMHV*, *PaAP* та *SO* піддослідних тварин усіх трьох груп (рис. 1). Окремі нейрони проявляли подвійну Fos-позитивність та НАДФН-д-реактивність. У контрольних тварин нейрони з подвійним забарвленням спостерігалися здебільшого в *PaMP* на рівні -2.12 мм та в *VMHD* і *VMHV* на рівнях -2.3 та -2.8 мм від брегми. Середня щільність (Fos + НАДФН-д)-позитивних нейронів у відмічених ядрах дорівнювала 3.8 ± 0.4 , 8.0 ± 1.0 і 5.5 ± 2.5 на тест-ділянку відповідно. У тварин після харчової депривації (група 2) щільність таких нейронів була помітно більшою в *PaMP* (12.9 ± 1.0 нейрона) і незначною в *VMHD* і *VMHV*. Після здійснення щурами численних оперантних рухів



Р и с. 1. Діаграми значень середньої щільності Fos-імунореактивних і НАДФН-діафоразореактивних (NOS-вмісних) нейронів у різних структурах гіпоталамуса.

Заштриховані, сірі й чорні стовпчики – середня щільність (\pm похибка середнього) NOS-, Fos-позитивних та ПЗ (подвійно забарвлених, Fos + НАДФН-д) нейронів відповідно в різних структурах гіпоталамуса (унілатерально на різних фронтальних рівнях від -1.3 до -2.8 мм від брегми, за атласом [18], на тест-площах зрізів мозку 200×200 мкм²). Зірочками над стовпчиками вказані випадки вірогідних різниць ($P < 0.05$) між значеннями середньої щільності мічених нейронів у структурах гіпоталамуса голодуючих щурів та тварин, які виконували оперантні їжодобувні рухи (групи 2 та 3), відносно контролю (група 1), а хрестиками – випадки міжгрупових відмінностей показників у голодуючих тварин і щурів, які виконували оперантні їжодобувні рухи (група 2 порівняно з групою 3). AH – передня гіпоталамічна ділянка; DMD – дорсальна частина дорсомедіального гіпоталамічного ядра; LHD і LHV – дорсальна і вентральна частини латерального гіпоталамічного ядра відповідно; MPO – медіальне преоптичне ядро; PaAP та PaMP – передня та медіальна частини паравентрикулярного гіпоталамічного ядра відповідно; SO – супраоптичне ядро; TC – сірий бугорок; VMHD і VMHV – дорсальна й вентральна частини вентромедіального гіпоталамічного ядра відповідно.

досягнення та захвату їжі (група 3) середня щільність (Fos + НАДФН-д)-позитивних нейронів була значно більшою в PaAP та SO, де вона досягала 30.0 ± 1.8 та 16.6 ± 1.1 клітини на тест-ділянку відповідно. Кількість одиниць з подвійним забарвленням, тобто (Fos + НАДФН-д)-позитивних нейронів,

у тварин даної групи становила близько 70 % загальної кількості Fos-ір-нейронів у цих ядрах (рис. 1). Треба відмітити, що лише поодинокі нейрони з подвійним забарвленням реєструвались у LHD, LHV, DMD і TC, а в AH нейрони з таким забарвленням взагалі виявлені не були.

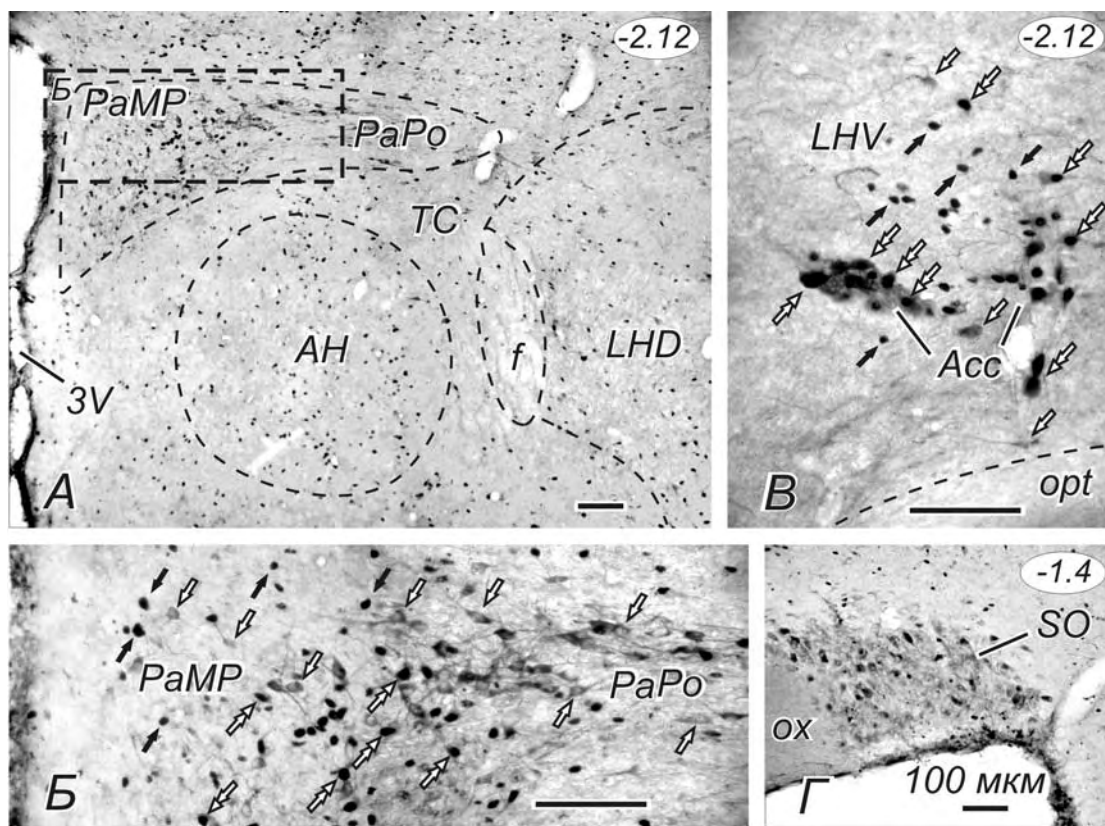
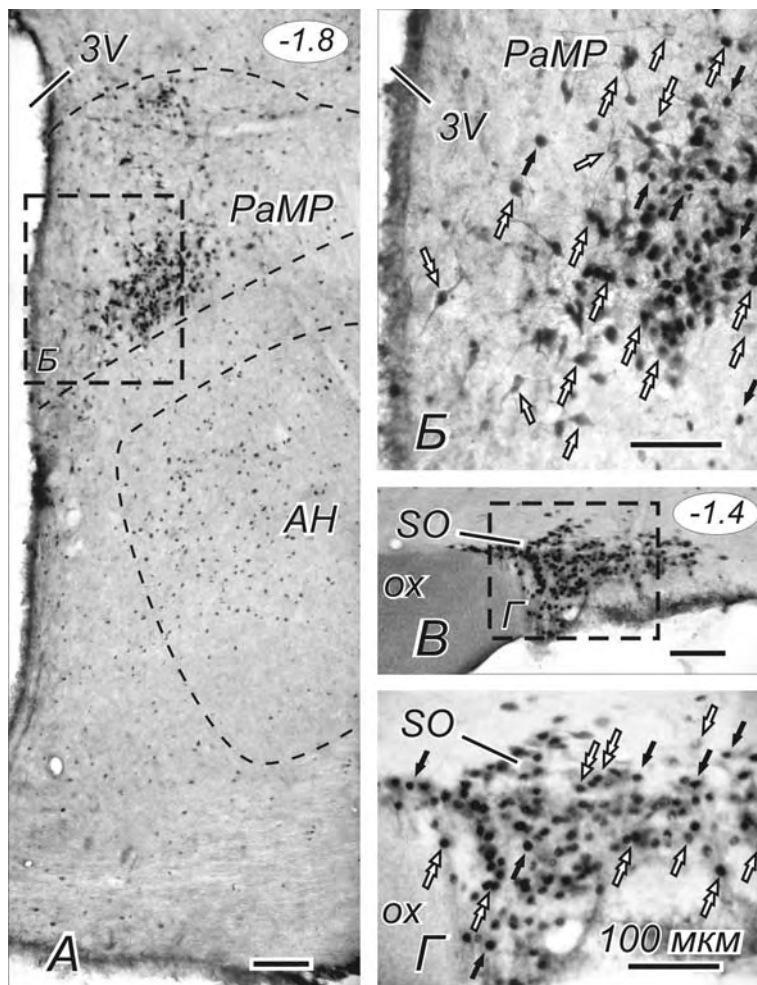


Рис. 2. Мікрофотографії Fos-імунореактивних (Fos-ір) та НАДФН-діафоразореактивних (НАДФН-др) нейронів у різних структурах гіпоталамуса правої півкулі мозку голодуючих щурів; фронтальні рівні -2.12 (A-B) та -1.40 (Г) мм від брегми. Чорними стрілками позначені Fos-ір-ядра мічених нейронів, білими – НАДФН-др-нейрони, подвійними білими – Fos + НАДФН-д-позитивні клітини. *Acc* – додаткові нейросекреторні ядра; *AH* – передня гіпоталамічна область; *f* – склепіння; *LHD* і *LHV* – дорсальна й вентральна частини латерального гіпоталамічного ядра відповідно; *opt* – оптичний тракт; *ох* – оптичний перехрест; *PaMP* і *PaPo* – медіальна (мільоклітинна) і задня (крупноклітинна) частини паравентрикулярного гіпоталамічного ядра відповідно; *SO* – супраоптичне ядро; *TC* – сірий бугорок; *3V* – 3-й мозковий шлуночок. Масштаб 100 мкм дійсний для всіх фрагментів.



Р и с. 3. Мікрофотографії Fos-імунореактивних та НАДФН-діафоразореактивних нейронів у різних структурах гіпоталамуса правої півкулі мозку щурів, що виконували оперантні їжодобувні рухи лівою кінцівкою (група 3), на фронтальних рівнях -1.80 (А, Б) та -1.40 (В, Г) мм від брегми. Позначення ті ж самі, що й на рис. 2.

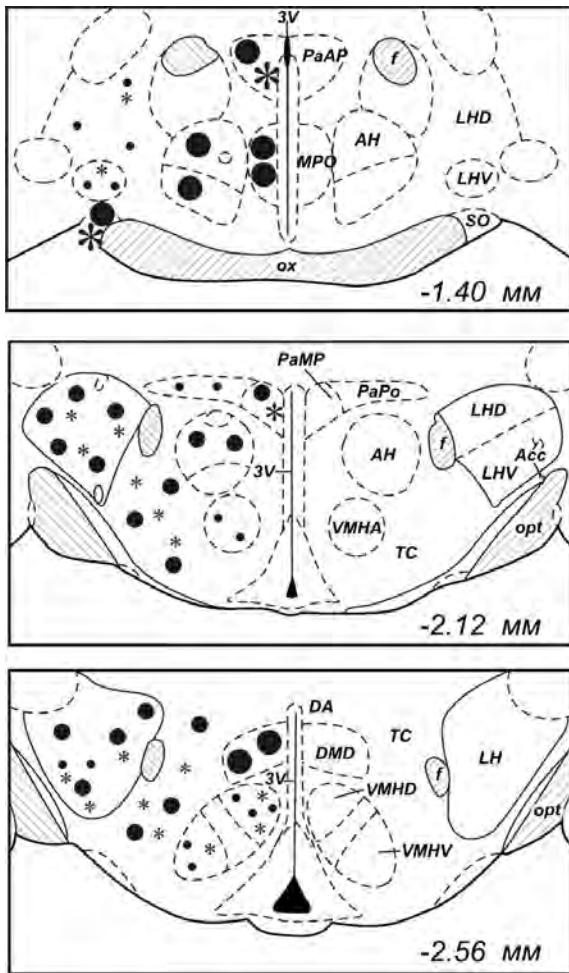


Рис. 4. Схема фронтальних зрізів гіпоталамічних структур переднього мозку щура на рівнях -1.40 , -2.12 та -2.56 мм від брегми з показниками середньої щільності розподілу в них Fos-імунореактивних нейронів (малі чорні крапки – п’ять–10, середні – 11–20, великі – 30–100 одиниць на площі зрізів 200×200 мкм²) і клітин з подвійною Fos + НАДФН-діафороазопозитивністю (малі зірочки – одна–чотири, середні – п’ять–вісім і великі – 18–30 одиниць). Позначення структур ті ж самі, що й на рис. 1 та 2.

ОБГОВОРЕННЯ

Порівняльне дослідження розподілу Fos-імунореактивності та НАДФН-д-реактивності у різних структурах гіпоталамуса ми провели в трьох групах експериментальних тварин, які відрізнялись одна від одної за рівнем харчової мотивації та інтенсивністю моторного компонента їжозалежної поведінки. Вони відносились, відповідно, до контрольної групи, групи голодуючих тварин та тварин, що

здійснювали мотивовані їжодобувні рухи. У протоколі цих досліджень було передбачено, що тварини групи 3 отримували їжу не з відкритої легкодоступної годівниці, а із спеціальної годівниці-циліндра. Щури даної групи повинні були виконувати інтенсивні та досить складні їжодобувні рухи. Їжодобувна моторна активність складалась із рухів досягнення, захвату їжі, вивільнення кінцівки з циліндра та поїдання їжі. Для підсилення моторної складової та збереження високого рівня мотивації експерименти організовували таким чином, що реалізація оперантних їжодобувних рефлексів протягом сеансу не забезпечувала повного насичення тварин групи 3.

У контрольних щурів, які перебували на збалансованому раціоні з вільним доступом до їжі, найбільш інтенсивна експресія *c-fos* була виявлена в *Pa*, медіальній групі гіпоталамічних ядер (*VMHD* і *VMHV*), а також у *DMD* і *TC*. На відміну від контролю у тварин у стані голоду відмічалася значно збільшена кількість Fos-ір-нейронів у переважній частині ядер гіпоталамуса. Найвищі значення щільності спостерігалися в *AH*, *MPO*, *Pa/PaMP* та в латеральних ядрах (*LHD* і *LHV*). Таке підвищення інтенсивності експресії *c-fos* у *Pa* можна співставити з подібними змінами в латеральному гіпоталамусі при очікуванні їжі на проміжній стадії насичення [12]. Активовані нейрони в цих ядрах були ідентифіковані як орексинергічні клітини [20]. Високий рівень активації нейронів в *AH* і *MPO* (які дають проекції в *Pa* та задіяні в реалізацію нейроендокринних функцій) свідчить про участь двох згаданих структур у формуванні харчової мотивації та ініціації їжодобувної поведінки [21]. Вірогідно вищий порівняно з контролем рівень експресії *c-fos* у латеральних ядрах (*LHD* і *LHV*) голодуючих тварин підкреслює той факт, що ці структури є компонентами гіпоталамічного “центру голоду” [22]. Як відомо, згадані ядра у тварин відіграють ключову роль в організації поведінки пошуку винагороди [23], а їх руйнування призводить до афагії [24]. У голодуючих тварин активація нейронів медіальних гіпоталамічних ядер (*VMHD* і *VMHV*), на відміну від такої в латеральних ядрах, була менш вираженою (рис. 1; 2). У *VMHV* спостерігалось навіть деяке пригнічення експресії *c-fos* порівняно з контролем. Вказану медіальну групу ядер включають до гіпоталамічного “центру насичення”, деструкція якого викликає гіперфагію [22]. Робиться припущення, що активація нейронів у *LHD* і *LHV* у стані харчової депривації є одним із внутрішньо-

гіпоталамічних сигналів, пов'язаних з відсутністю насиченості, і це ініціює у даних тварин їжодобувну поведінку [9]. Треба зазначити, що рівні експресії *c-fos* у *SO* і *DMD* щурів груп 1 і 2 вірогідно не розрізнялися.

У тварин групи 3 у *Pa*, *MPO*, *SO* і *DMD* у період здійснення інтенсивних пошукових та власне їжодобувних рухів проявлялося вірогідне збільшення нейронної активності порівняно з її величиною в контролі (рис. 1; 3). Відомо, що надходження сигналів, пов'язаних з харчовою мотивацією та харчовою поведінкою, посилює локомоторну активність та моторні акти, пов'язані з прийомом їжі; це корелює з посиленням експресії *c-fos* у префронтальній корі [25, 26]. Важливо відмітити, що зареєстровані нами ознаки посилення нейронної активності в *Pa*, *MPO*, *SO* та *DMD* у тварин групи 3 спостерігалися паралельно з відносним зниженням такої активності в латеральних і медіальних ядрах гіпоталамуса. Більш того, порівняно з інтенсивністю експресії *c-fos* у *LHD* і *LHV* у *VMHD* і *VMHV* (ядрах, котрі опосередковують розвиток стану насичення) рівень даного корелята високої нейронної активності в згаданих вище ядрах був у два рази меншим. Такі дані свідчать про те, що піддослідні тварини групи 3 не досягали стану повного насичення та зберігали достатньо сильну мотивацію для додаткового пошуку їжі. Певною мірою подібний розподіл Fos-ір-нейронів у цих структурах гіпоталамуса було продемонстровано також після інтенсивної локомоції тварин на тредбані (тобто „нехарчової” моторної активності) [27]. Значення інтенсивності експресії *c-fos* у *DMD* у контролі і в період відсторонення від їжі істотно не розрізнялися. У той же час звертає на себе увагу високий рівень Fos-імунореактивності в цьому ядрі гіпоталамуса у тварин групи 3. Відомо, що нейронні системи *DMD* істотно залучені в розвиток та координацію локомоторної активності [28, 29]. Дана структура надсилає ГАМК-ергічні проєкції в латеральні та медіальні ядра, які також вміщують ГАМК-ергічні нейрони [30]. Логічним є припущення, що *DMD* функціонує як проміжна внутрішньогіпоталамічна структура в ланцюзі передачі гальмівної інформації від латеральних і медіальних ядер до *Pa* [31–33]. При цьому інтенсивність експресії *c-fos* у *Pa* збільшується при розгальмуванні нейронів *DMD* [34]. Таким чином, у тварин групи 3 приріст експресії *c-fos* у *Pa* (а можливо, і в *MPO* та *SO*) відбувається внаслідок ГАМК-опосередкованого пригнічення

активності нейронних систем латеральних і медіальних ядер (треба звернути увагу на низький рівень експресії *c-fos* у даних ядрах, що видно із рис. 1) і наступного розгальмування нейронів у *Pa*. Як можна припустити, до активації внутрішньогіпоталамічних гальмівних зв'язків між *DMD*, *LHD/LHV* і *MHD/VMHV* причетні не тільки впливи від вісцеральних аферентів, а й сигнали від коркових та мозочкових моторних центрів [6, 35–37], котрі формують рухові команди і регулюють інтенсивність оперантних рухів.

Нещодавно було встановлено, що фізичне тренування диференційовано впливає на нейронну активність у комплексі *Pa*–*SO*; такі впливи посилюють активність нейронів, котрі входять до автономних рефлекторних ланцюгів, і пригнічують активність нейросекреторних клітин [38]. *Pa* і *SO* розглядаються як ключові центри гіпоталамуса, що забезпечують регуляцію автономних і ендокринних функцій із залученням NO-ергічних систем [39]. Згідно з нашими даними, у цих структурах гіпоталамуса виявляється вища щільність NOS-вмісних нейронів та нейронів із подвійною міткою – (Fos + НАДФН-д)-позитивних (рис. 1; 4). Відомо, що нейрони різних підрозділів *Pa* є джерелами прямих низхідних шляхів до автономних центрів стовбура мозку та спинного мозку [2, 40, 41]. Показано також, що гальмування функції нейросекреторних окситоцин- та вазопресинвмісних нейронів у гіпоталамусі може відбуватися в результаті надходження NO-ергічних сигналів, які посилюють дію ГАМК-ергічних синаптичних входів до таких клітин [42, 43]. У той же час є дані про те, що NO не причетний до регуляції секреторної функції гіпоталамуса в умовах форсованого плавання тварин [13]. Можна припустити, що висока (Fos + НАДФН-д)-позитивність у *Pa* і *SO* тварин групи 3 також пов'язана з інтенсивною руховою діяльністю цих щурів. Подвійне мічення було характерним здебільшого для гіпоталамічних нейронів, які є джерелами проєкцій до автономних центрів стовбура мозку і спинного мозку і (в меншій мірі) для нейронів великого розміру – згодом, нейроендокринних. Порівнюючи отримані нами дані та результати інших досліджень [12, 27, 44], можна зробити припущення, що сигнали, отримані гіпоталамусом від периферійних та центральних джерел в умовах реалізації інтенсивних рухів [6, 35–37], скеровані на посилення процесів збудження в автономних центрах і забезпечують адаптацію функцій серцево-судинної

системи до фізичного навантаження при реалізації моторних програм оперантних рефлексів. NO-опосередковані сигнали у той же час посилюють і процеси гальмування в цих центрах.

Роботу виконано за підтримки гранта «Молекулярні основи функціонування геному – 2008–2009» НАН України.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. L. W. Swanson and G. J. Mogenson, "Neural mechanisms for the functional coupling of autonomic, endocrine and somatomotor responses in adaptive behavior," *Brain Res.*, **228**, 1-34 (1981).
2. L. W. Swanson and H. G. Kuypers, "The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods," *J. Comp. Neurol.*, **194**, 555-570 (1980).
3. L. L. Bernardis and L. L. Bellinger, "The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **20**, 189-287 (1996).
4. L. L. Bernardis and L. L. Bellinger, "The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **218**, 284-306 (1998).
5. N. S. Canteras, R. B. Simerly, and L. W. Swanson, "Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat," *J. Comp. Neurol.*, **348**, 41-79 (1994).
6. R. H. Thompson and L. W. Swanson, "Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat," *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **27**, 89-118 (1998).
7. M. Mieda, S. C. Williams, J. A. Richardson, et al., "The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12150-12155 (2006).
8. M. Angeles-Castellanos, R. Aguilar-Roblero, and C. Escobar, "c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**, R158-R165 (2004).
9. I. E. de Araujo, R. Gutierrez, A. J. Oliveira-Maia, et al., "Neural ensemble coding of satiety states," *Neuron*, **51**, 483-494 (2006).
10. О. В. Довгань, О. В. Власенко, В. О. Майський та ін., "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*, **41**, № 1, 19-27 (2009).
11. J. E. McMinn, C. W. Wilkinson, P. J. Havel, et al., "Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279**, R695-R703 (2000).
12. A. M. Poulin and E. Timofeeva, "The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats," *Brain Res.*, **1227**, 128-141 (2008).
13. M. Engelmann, G. Wolf, J. Putzke, et al., "Nitric oxide is not involved in the control of vasopressin release during acute forced swimming in rats," *Amino Acids*, **26**, 37-43 (2004).
14. M. Engelmann, G. Wolf, and T. F. Horn, "Release patterns of excitatory and inhibitory amino acids within the hypothalamic supraoptic nucleus in response to direct nitric oxide administration during forced swimming in rats," *Neurosci. Lett.*, **324**, 252-254 (2002).
15. G. F. Orlando, K. Langnaese, C. Schulz, et al., "Neuronal nitric oxide synthase gene inactivation reduces the expression of vasopressin in the hypothalamic paraventricular nucleus and of catecholamine biosynthetic enzymes in the adrenal gland of the mouse," *Stress*, **11**, 42-51 (2008).
16. 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).
17. О. В. Власенко, В. О. Майський, А. В. Мазниченко та ін., "Дослідження експресії *c-fos* і НАДФН-діафоразної активності у спинному та головному мозку при розвитку стремлення м'язів шиї у щурів", *Фізіол. журн.*, **52**, № 6, 3-14 (2006).
18. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press, San Diego (1997).
19. S. R. Vincent and H. Kimura, "Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain," *Neuroscience*, **46**, 755-784 (1992).
20. L. E. Johnstone, T. M. Fong, and G. Leng, "Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats," *Cell Metab.*, **4**, 313-321 (2006).
21. R. B. Simerly and L. W. Swanson, "Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat," *J. Comp. Neurol.*, **270**, 209-242 (1988).
22. T. Ono, K. Sasaki, and R. Shibata, "Feeding- and chemical-related activity of ventromedial hypothalamic neurons in freely behaving rats," *J. Physiol.*, **394**, 221-237 (1987).
23. N. J. Marchant, A. S. Hamlin, and G. P. McNally, "Lateral hypothalamus is required for context-induced reinstatement of extinguished reward seeking," *J. Neurosci.*, **29**, 1331-1342 (2009).
24. P. Teitelbaum and E. Stellar, "Recovery from the failure to eat produced by hypothalamic lesions," *Science*, **120**, 894-895 (1954).
25. C. A. Schiltz, A. E. Kelley, and C. F. Landry, "Acute stress and nicotine cues interact to unveil locomotor arousal and activity-dependent gene expression in the prefrontal cortex," *Biol. Psychiatry*, **61**, 127-135 (2007).
26. О. В. Власенко, А. И. Пилявский, В. А. Майский, А. В. Мазниченко, "Fos-иммунореактивность и НАДФН-д-реактивность в коре больших полушарий крыс, реализующих мотивированные стереотипные движения передней конечностью", *Нейрофизиология / Neurophysiology*, **40**, № 4, 351-361 (2008).
27. H. Soya, A. Mukai, C. C. Deocaris, et al., "Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model," *Neurosci. Res.*, **58**, 341-348 (2007).
28. T. C. Chou, T. E. Scammell, J. J. Gooley, et al., "Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms," *J. Neurosci.*, **23**, 10691-10702 (2003).
29. W. H. Cao, W. Fan, and S. F. Morrison, "Medullary pathways

- mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus,” *Neuroscience*, **126**, 229-240 (2004).
30. H. Kimura and K. Kuriyama, “Distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the rat hypothalamus: functional correlates of GABA with activities of appetite controlling mechanisms,” *J. Neurochem.*, **24**, 903-907 (1975).
31. L. L. Bellinger and L. L. Bernardis, “The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies,” *Physiol. Behav.*, **76**, 431-442 (2002).
32. J. J. Gooley, A. Schomer, and C. B. Saper, “The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms,” *Nat. Neurosci.*, **9**, 398-407 (2006).
33. G. J. Landry, G. R. Yamakawa, I. C. Webb, et al., “The dorsomedial hypothalamic nucleus is not necessary for the expression of circadian food-anticipatory activity in rats,” *J. Biol. Rhythms*, **22**, 467-478 (2007).
34. M. V. Zaretskaia, D. V. Zaretsky, S. Sarkar, et al., “Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus,” *Brain Res.*, **1200**, 39-50 (2008).
35. D. E. Haines and E. Dietrichs, “An HRP study of hypothalamo-cerebellar and cerebello-hypothalamic connections in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*),” *J. Comp. Neurol.*, **229**, 559-575 (1984).
36. C. B. Saper, “Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections,” *J. Comp. Neurol.*, **237**, 21-46 (1985).
37. N. S. Floyd, J. L. Price, A. T. Ferry, et al., “Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat,” *J. Comp. Neurol.*, **432**, 307-328 (2001).
38. K. Jackson, H. M. Silva, W. Zhang, et al., “Exercise training differentially affects intrinsic excitability of autonomic and neuroendocrine neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus,” *J. Neurophysiol.*, **94**, 3211-3220 (2005).
39. J. E. Stern, “Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration?” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **84**, 197-215 (2004).
40. H. G. Kuypers and V. A. Maisky, “Funicular trajectories of descending brain stem pathways in cat,” *Brain Res.*, **136**, 159-165 (1977).
41. P. E. Sawchenko and L. W. Swanson, “Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat,” *J. Comp. Neurol.*, **205**, 260-272 (1982).
42. J. E. Stern and M. Ludwig, “NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs,” *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **280**, R1815-R1822 (2001).
43. D. P. Li, S. R. Chen, and H. L. Pan, “Nitric oxide inhibits spinally projecting paraventricular neurons through potentiation of presynaptic GABA release,” *J. Neurophysiol.*, **88**, 2664-2674 (2002).
44. K. T. Higa-Taniguchi, F. C. Silva, H. M. Silva, et al., “Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats,” *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **292**, R1717-R1727 (2007).