

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *c-fos* В СПИНАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ КРЫС, РЕАЛИЗУЮЩИХ СТЕРЕОТИПНЫЕ ДВИЖЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ПОДАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗЫ

Поступила 19.11.13

В шейном отделе спинного мозга крыс, выполнявших стереотипные оперантные пищеводобывательные движения передней конечностью, с помощью иммуногистохимической методики выявляли нейроны с наличием в их ядрах белка *c-Fos* – продукта экспрессии «раннего» гена *c-fos*, маркера активированного состояния таких нейронов. В указанных условиях исследовали эффекты подавления активности нейронной синтазы оксида азота (nNOS) после системного введения селективного блокатора данного фермента 7-нитроиндазола (7-NI). Основные фокусы Fos-иммунореактивности в сегментах C6 и C7 спинного мозга исследуемых животных в отсутствие воздействия 7-NI были обнаружены ипсилатерально в слоях серого вещества 2i, 3 и 4, а после введения данного блокатора – кроме этого, в слое 6 и в моторных ядрах (слой 9). После реализации крысами пищеводобывательных движений у животных с предварительными инъекциями 7-NI в сегментах C6 и C7 наблюдали достоверно большее общее количество Fos-иммунореактивных нейронов, чем в сером веществе мозга животных без подавления активности nNOS (ипсилатерально по отношению к рабочей конечности – в среднем  $54.4 \pm 0.7$  клетки в срезе толщиной 40 мкм по сравнению с  $31.7 \pm 1.1$ ,  $P < 0.05$ ). Таким образом, экспрессия гена *c-fos* в шейном утолщении спинного мозга крыс, длительно реализующих повторные движения, существенно усиливается в условиях подавления высвобождения оксида азота после системного введения 7-NI.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** Fos- иммунореактивность, нейронная синтаза оксида азота (nNOS), 7-нитроиндазол (7-NI), спинной мозг, оперантные пищеводобывательные движения.

### ВВЕДЕНИЕ

Сенсорные влияния от проприоцепторов мышц играют важную роль в функционировании спинальных моторных центров. Возбуждающие и тормозные интернейроны дорсальных и вентральных рогов спинного мозга, активируемые такими влияниями, а также влияниями, поступающими от надсегментарных центров, являются компонентами сложных нейронных сетей, вовлеченных в контроль двигательной активности. Известно, что у крыс нисходящие проекции от сенсомоторной коры и различных центров ствола мозга распростра-

ются до слоев 4–6 серого вещества спинного мозга, а также распределяются в дорсальной и вентромедиальной частях промежуточной зоны (слой 7) [1]. Такие нисходящие проекции могут модулировать активность спинальных интернейронов, что является ключевым фактором в контроле двигательной активности у животных. Ряд экспериментальных работ были посвящены изучению нейронной активности в головном и спинном мозгу животных, связанной с реализацией различных движений, которые входят в естественный двигательный репертуар [2–4]. Количество данных относительно изменений активности интер- и мотонейронов спинного мозга, активируемых при выполнении животными мотивированных стереотипных движений, однако, пока недостаточно для адекватного понимания механизмов управления такими моторными актами.

В настоящее время для идентификации активированных нейронных популяций в том или ином

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

<sup>2</sup>Винницкий национальный медицинский университет им. Н. И. Пирогова МЗ Украины (Украина).

<sup>3</sup>Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова (Украина).  
Эл. почта: maznychenko@biph.kiev.ua (А. В. Мазниченко).

отделе ЦНС широко используется выявление продукта экспрессии гена «быстрого реагирования» *c-fos* – белка *c-Fos*. Данный белок, как известно, рассматривается в качестве маркера нейронов, находящихся в активированном состоянии. Ранее были обнаружены изменения в пространственном распределении *Fos*-иммунореактивных (*Fos*-ир-) нейронов в спинном мозгу крыс после периода локомоции на тредбане. Меченые нейроны в этих случаях были выявлены в сером веществе шейного и поясничного отделов спинного мозга в тех слоях, где локализуются интернейроны, реагирующие на неболевую стимуляцию [2, 5]. В наших недавних исследованиях были зарегистрированы изменения уровня экспрессии гена *c-fos* в спинном мозгу крыс после длительной реализации оперантных пищевых движений передней конечностью. Нейронная активность в шейных спинальных сегментах в этих условиях была подобна той, которая выявлялась в условиях неноцицептивной стимуляции сегментарных афферентных входов, хотя количество и пространственное распределение активированных клеток в сером веществе несколько различались [4].

Известно, что одной из важных модуляторных систем в спинном мозгу является нитрергическая система, которая обеспечивает синтез оксида азота (NO). Локализация в структурах спинного мозга нейронов, содержащих нейронную синтазу оксида азота (nNOS), является одной из важнейших характеристик спинальных центров, вовлеченных в управление тем или иным видом активности [6, 7]. Показано, что NOS-содержащие клетки могут являться также ГАМК- и глицинергическими нейронами, т. е. тормозными клетками [8, 9]. Продукция этими нейронами объемного медиатора NO влияет на NMDA-опосредованное облегчение синаптической передачи, механизмы центральной сенситизации и спинальной гипералгезии [10]. Предполагается, что модуляция уровня продукции NO должна каким-то образом влиять на активность нейронных сетей, вовлеченных в управление двигательными актами. Системное введение крысам блокатора nNOS 7-нитроиндазола (7-NI), как оказалось, не приводит само по себе к существенным изменениям *Fos*-иммунореактивности в спинном мозгу крыс. Однако недавно мы обнаружили, что введение крысам данного блокатора с последующей вибрационной стимуляцией сухожилия трехглавой мышцы голени обуславливает увеличение уровня *Fos*-иммунореактивности в интер- и мотонейронах

поясничных сегментов спинного мозга [11].

В настоящей работе мы исследовали особенности пространственного и количественного распределения нейронов, которые активировались в шейном отделе спинного мозга крыс после повторных реализаций животными пищедобывательных движений передней конечностью в норме и после подавления активности nNOS селективным блокатором 7-NI.

## МЕТОДИКА

В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 240–290 г. Животные были разделены на пять групп. Группу 1 составили интактные животные, группу 2 – животные, которым внутрибрюшинно инъецировали растворитель 7-NI диметилсульфоксид (ДМСО), группу 3 – крысы, которым внутрибрюшинно инъецировали 7-NI в растворе ДМСО, группу 4 – животные, которые выполняли стереотипные пищедобывательные движения передней конечностью, а группу 5 – крысы, которые выполняли стереотипные пищедобывательные движения после предварительных инъекций 7-NI (во всех группах  $n = 4$ ). Крысам групп 3 и 5 внутрибрюшинно вводили 30 мг/кг 7-NI (“Sigma”, США). Блокатор растворяли в ДМСО; полученный раствор разбавляли дистиллированной водой до конечной концентрации ДМСО 4 %. Показано, что во время максимального подавления активности nNOS, вызванного такими инъекциями 7-NI, существенных изменений среднего артериального давления у крыс не отмечалось [12, 13].

После пищевой депривации в течение 24 ч животные групп 4 и 5 осуществляли захват пищевых шариков из кормушки передней конечностью. Было проведено 12 ежедневных сеансов с выполнением таких движений; длительность отдельных сеансов составляла 30–40 мин. Через 2 ч после окончания каждого эксперимента крыс под глубоким наркозом (пентобарбитал натрия, 90 мг/кг, внутрибрюшинно; “Sigma”, США) перфузировали интракардиально раствором параформальдегида через восходящую аорту. Шейные сегменты спинного мозга (C5 – C7) каждого животного выделяли, дополнительно фиксировали и затем выдерживали в 30 %-ном растворе сахарозы, что обеспечивало криопротекцию ткани мозга. На замораживающем микротоме изготавливали фронтальные срезы спинного мозга толщиной 40 мкм (10–15 срезов от каждого живот-

ного) для дальнейшего иммуногистохимического окрашивания. Выявление Fos-ир-нейронов в срезах мозга проводили с помощью стандартной авидин-биотин-пероксидазной методики [14]; меченые нейроны идентифицировали по темно-коричневой окраске их ядер (Рис. 3). Подсчитывали среднее количество ( $\pm$  ошибка среднего) Fos-ир-нейронов в срезах сегментов *C6* и *C7* спинного мозга унилатерально слева у крыс групп 1–3 и ипсилатерально по отношению к левой рабочей конечности в срезах мозга животных остальных двух групп. С использованием двухпараметрического дисперсионного анализа вариаций (ANOVA) сравнивали значения средних количеств меченых клеток. Если обнаруживались достоверные межгрупповые различия ( $P < 0.05$ ) средних значений, применяли апостериорный критерий Ньюмена – Кеулса.

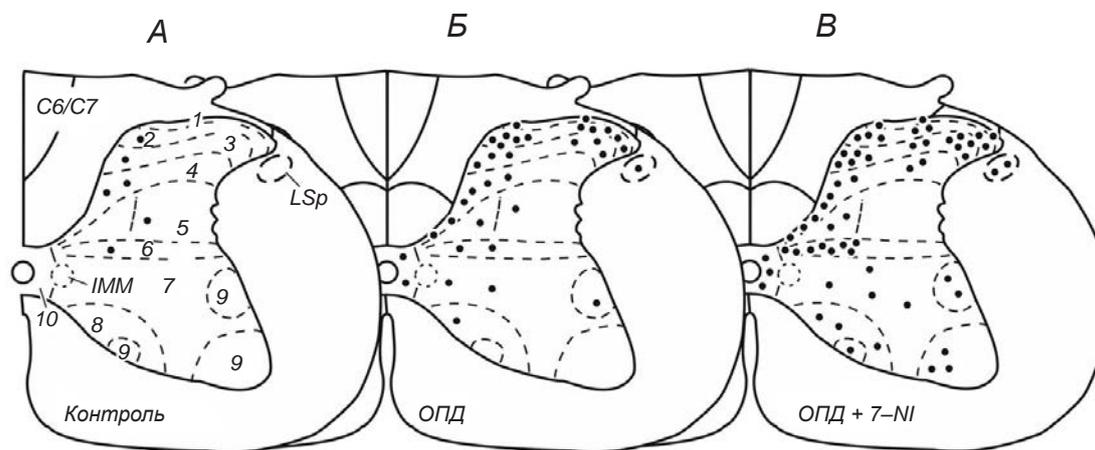
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У контрольных животных (интактных и тех, которым системно вводили ДМСО и/или 7-NI) в сегментах *C6* и *C7* спинного мозга было выявлено небольшое количество Fos-ир-нейронов (пять–10 единиц на срез). Меченые нейроны обнаруживались в различных слоях серого вещества. Однако в моторных ядрах (слой 9) и в латеральном спинальном ядре

(*LSp*) у животных данных групп Fos-ир-нейроны не наблюдались (рис. 1, *A*; 2). Необходимо отметить, что достоверных различий общих количеств меченых нейронов и их количеств в отдельных срезах левой и правой половин серого вещества у животных групп 1–3 не выявлялось.

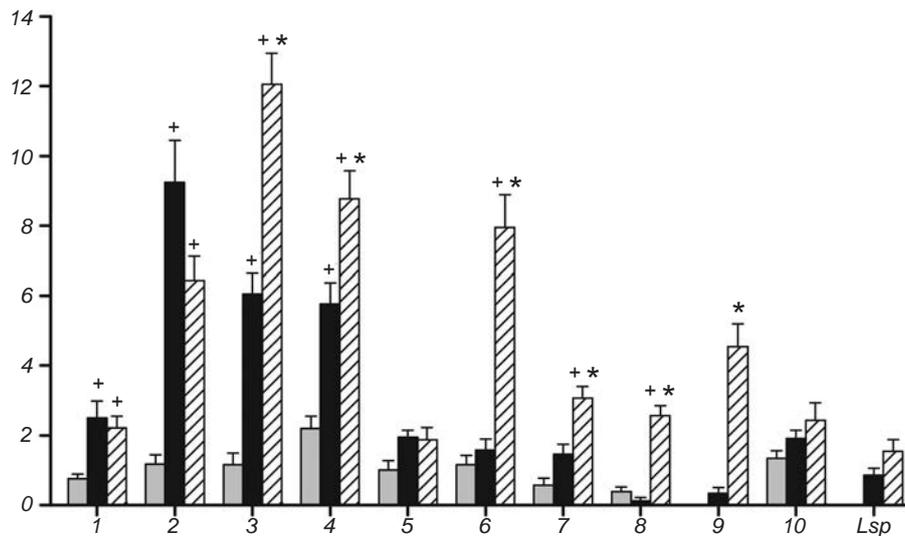
В сегментах *C6* и *C7* спинного мозга крыс, производивших оперантные пищедобывательные движения (группа 4), после реализации моторной программы (оперантных рефлексов) в слоях 1–4 серого вещества отмечалось достоверно большее среднее количество Fos-ир-нейронов ( $P < 0.05$ ) по сравнению с таковым у контрольных животных. Наибольшее количество меченых нейронов было выявлено в слоях 2i, 3 и 4 на ипсилатеральной (по отношению к рабочей конечности) стороне мозга ( $9.2 \pm 1.2$ ;  $6.1 \pm 0.5$  и  $5.8 \pm 0.6$  единицы в срезе мозга соответственно). Небольшое количество меченых клеток наблюдались также в слоях 5–10 как на ипси-, так и на контралатеральной стороне спинного мозга. В моторных ядрах в пределах среза обнаруживались единичные Fos-ир-мотонейроны (в основном ипси-, но также и контралатерально; рис. 4). Отдельные меченые клетки выявлялись также в латеральном спинальном ядре (*LSp*) (рис. 1, *B*; 2).

Общая интенсивность экспрессии *c-fos* в исследуемых сегментах спинного мозга крыс, реализовавших стереотипные пищедобывательные движе-



**Р и с. 1.** Пространственное распределение Fos-иммунореактивных нейронов в срезах спинного мозга крыс группы контроля (*A*), крыс, реализовавших оперантные пищедобывательные движения (ОПД, группа 4 – *B*), и крыс, выполнявших такие движения в условиях блокирования нейронной NO-синтазы 7-нитроиндазолом –NI (ОПД + NI, группа 5 – *B*). 1–10 – слои серого вещества; IMM – интермедиомедиальное ядро; LSp – латеральное спинальное ядро. На *B* и *B* показаны половины срезов, ипсилатеральные рабочей конечности.

**Р и с. 1.** Просторовий розподіл Fos-імунореактивних нейронів у зрізах спинного мозку щурів групи контролю (*A*), щурів, які реалізували оперантні їждобувні рухи (ОІР, група 4 – *B*), та щурів, які виконували такі рухи в умовах блокування нейронної NO-синтази 7-нітроіндазолом –NI (ОІР + NI, група 5 – *B*).



**Р и с. 2.** Количество Fos-иммунореактивных (Fos-ир-) нейронов в различных слоях (1–10) и латеральном спинальном ядре (*Lsp*) серого вещества сегментов *C6* и *C7* спинного мозга крыс контрольной группы, крыс, реализовавших оперантные пищедобывательные движения в условиях блокирования нейронной NO-синтазы 7-нитроиндазолом (группы 1, 4 и 5; серые, черные и заштрихованные столбики соответственно).

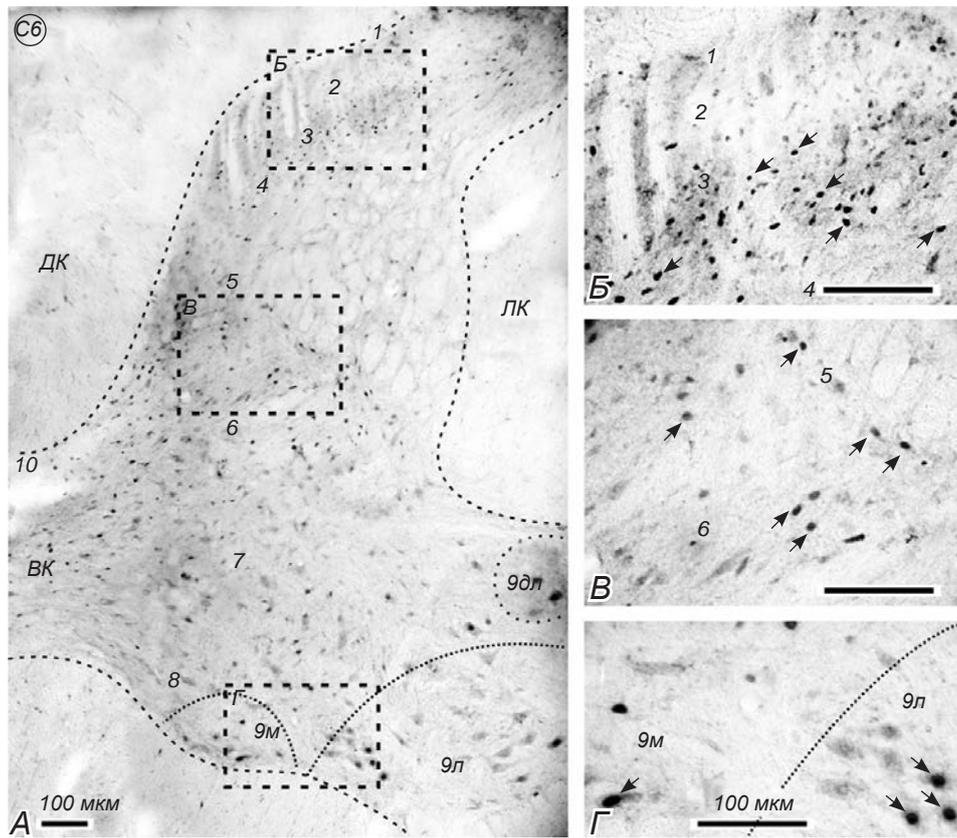
Приведены значения средних количеств Fos-ир-единиц на половине среза спинного мозга контрольных крыс группы 1 (толщина среза 40 мкм) и на ипсилатеральных по отношению к рабочей конечности половинах срезов мозга у крыс групп 4 и 5. Крестиками отмечены случаи достоверных межгрупповых различий при сравнении групп 4 и 5 с контрольной группой 1, звездочками – при сравнении группы 5 с группой 4 ( $P < 0.05$ ).

**Р и с. 2.** Кількість Fos-імунореактивних нейронів у різних шарах (1–10) сірої речовини сегментів *C6* і *C7* спинного мозку щурів контрольної групи, щурів, які реалізовували оперантні їждобувні рухи, та щурів, які виконували такі рухи в умовах блокування нейронної NO-синтази 7-нітроіндазолом (групи 1, 4 та 5; сірі, чорні та заштриховані стовпчики відповідно).

ния после предварительных инъекций 7-NI (группа 5), была значительно выше таковой в спинном мозгу животных группы 4 ( $54.4 \pm 0.7$  по сравнению с  $31.7 \pm 1.1$  единицы,  $P < 0.05$ ). Основные фокусы Fos-иммунореактивности в спинном мозгу у крыс группы 5 располагались ипсилатерально в слоях 3, 4 и 6, а также в моторных ядрах (слой 9) (рис. 1, B; 2, 3, 4). Средние количества меченых нейронов в данных слоях составляли  $12.1 \pm 0.9$ ,  $8.8 \pm 0.8$  и  $7.9 \pm 0.9$  единицы соответственно в слоях 3, 4 и 6, а также  $4.7 \pm 0.7$  единицы в слое 9 (рис. 1, B; 2). Следует отметить, что средние количества активированных (Fos-ир-) мотонейронов в медиальной, латеральной и дорсолатеральной группах моторных клеток были близки. Паттерны ламинарного распределения Fos-ир-нейронов в сегментах *C6* и *C7* спинного мозга крыс в указанной группе 5 не демонстрировали существенных отличий от типа пространственного распределения меченых нейронов в этих сегментах у животных группы 4; распределения Fos-ир-нейронов различались только количественно ( $P < 0.05$ ) (рис 1, B, B; 2).

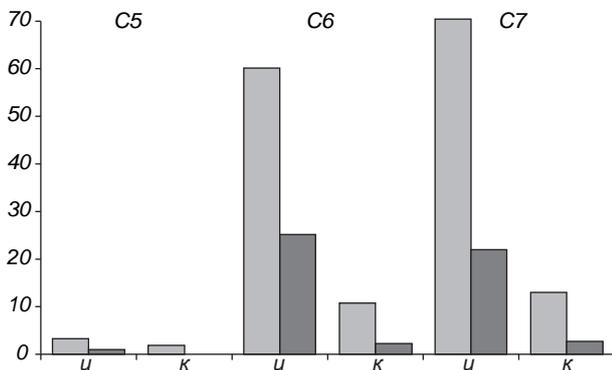
Известно, что активация ранних генов играет су-

щественную роль в развитии пластических процессов как в моторной коре, так и в спинном мозгу [15]. Экспрессия генов, подобных *c-fos*, является важным пусковым фактором для развития краткосрочной активации нейронных популяций; она сопровождается изменениями уровня транскрипции поздних генов, формированием пластических изменений в мозгу и стабилизацией двигательных навыков [16]. Ранее было показано, что двигательное обучение приводит к пластическим изменениям в группах ГАМК-эргических нейронов и изменению плотности тормозных терминалей, локализованных на телах и дендритах спинальных мотонейронов экспериментальных животных [8, 17]. Данные настоящего исследования свидетельствуют о том, что предварительное введение 7-NI и длительные (в течение 12 дней) тренировки с повторной реализацией пищедобывательных оперантных движений передней конечностью вызывают у таких животных существенные изменения уровня экспрессии *c-fos* в дорсальных и вентральных рогах шейного утолщения спинного мозга. Значительная плотность Fos-ир-нейронов обнаруживалась в же-



**Р и с. 3.** Микрофотографии Fos-иммунореактивных (Fos-ир-) нейронов в срезе сегмента С6 спинного мозга крысы после реализации оперантных пищевых движений в условиях блокирования NO-синтазы 7-нитроиндазолом. Участки локализации меченых нейронов, ограниченные пунктирными линиями на А, представлены при большем увеличении на Б–Г. Черными стрелками обозначены Fos-ир-нейроны на Б и В, а также Fos-ир-мотонейроны на Г. 1–10 – слои серого вещества; 9 л, 9 м, 9 д л – латеральная, медиальная и дорсолатеральная части слоя 9; ДК, ВК, ЛК – дорсальный, вентральный и латеральный канатики. Масштаб 100 мкм для всех фрагментов.

**Р и с. 3.** Микрофотографії Fos-імунореактивних нейронів у зрізі сегмента С6 спинного мозку щура після реалізації оперантних їждобувних рухів в умовах блокування NO-синтази 7-нітроіндазолом.



**Р и с. 4.** Влияние блокирования NO-синтазы на количество Fos-иммунореактивных нейронов в моторных ядрах (слой 9) шейных спинальных сегментов (указаны над диаграммами). Темные и серые столбики – количества меченых нейронов у крыс, выполнявших оперантные движения (группа 4), и таких же крыс после введения 7-нитроиндазола (группа 5) на половинах срезов, ипси- и контралатеральных рабочей конечности (u и k) соответственно.

**Р и с. 4.** Вплив блокування NO-синтази на кількість Fos-імунореактивних нейронів у моторних ядрах (шар 9) шийних спінальних сегментів (вказані над діаграмами).

латинозной субстанции (слой 2i) и *nucl. proprius* (слои 3 и 4), а также в слоях 6 и (что особо следует отметить) 9 (Рис. 4). Такой тип ламинарного распределения Fos-ир-нейронов существенно

отличается от паттернов, наблюдаемых при болевой или мышечной утомляющей стимуляции, когда максимумы Fos-иммунореактивности локализируются в поверхностных слоях серого вещества

(1 и 2o) и в пределах латеральных участков шейки дорсального рога (слой 5). В условиях ноцицептивной стимуляции мышц Fos-иммунореактивность в мотонейронах, однако, не регистрировалась [7, 18, 19]. Ранее было показано, что длительная ходьба крыс по тредбану (без развития мышечной усталости) приводит к активации нейронов в слоях 2i, 3–5 (медиальная часть), а также в слоях 7 и 9 серого вещества [2]. Нейроны этих слоев играют важнейшую роль в управлении локомоцией и реализации ряда иных моторных программ [4, 5, 20].

В нашей работе Fos-иммунореактивность была зарегистрирована также в границах латерального спинального ядра *LSp* (Рис. 1, Б, В). Как известно, это ядро у грызунов расположено вблизи дорсальной части латерального рога. Оно вовлечено в основном в передачу ноцицептивной информации в таламус; нейроны данного ядра также являются источниками прямых проекций в гипоталамус. Таким образом, *LSp* и зона вокруг центрального канала (слой 10), очевидно, функционируют как интегративные центры автономной регуляции, обеспечивающей гомеостатические эффекты. Нейроны этих областей влияют на развитие мотивационно-аффективных феноменов, которые напрямую связаны с автономными реакциями [4, 15, 21, 22]. Недавно мы установили, что выполнение крысами оперантных пищедобывательных движений сопровождается выраженными фазными и тоническими кардиоваскулярными реакциями с наличием устойчивого парасимпатического компонента в конечной фазе таких движений (в ходе захвата животными пищевого шарика) [21].

Таким образом, мы выявили значительное увеличение уровня Fos-иммунореактивности в шейных сегментах спинного мозга крыс, реализовавших пищедобывательные движения, после предварительного системного введения 7-NI. Можно предположить, что такое усиление экспрессии раннего гена *c-fos* в спинном мозгу крыс связано с растормаживанием сегментарных интернейронов, активируемых во время реализации животными оперантных движений, и повышением реактивности интернейронов по отношению к мышечной проприоцептивной и нисходящей супраспинальной импульсации. Необходимо отметить, что NO продуцируется, в частности, нейронами ствола мозга, расположенными по соседству с клеточными источниками серотонин-, норадреналин- и ГАМК-эргических проекций в спинной мозг [23]. Таким образом, некоторые эффекты усиления *c-fos*-экспрессии в спинном моз-

гу в условиях блокирования nNOS, возможно, обусловлены метамодуляторными влияниями на нисходящие амин- и ГАМК-эргические системы ствола мозга [24].

Все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с Европейской директивой Совета сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС) и положениями Комитетов по биоэтике Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Винницкого национального медицинского университета им. Н. И. Пирогова МЗ Украины, а также Одесского национального университета им. И. И. Мечникова.

Авторы данной работы – А. В. Мазниченко, О. В. Власенко, Е. П. Маньковская, Т. В. Бузыка и В. А. Майский – подтверждают, что у них отсутствует конфликт интересов.

*А. В. Мазниченко<sup>1</sup>, О. В. Власенко<sup>2</sup>, О. П. Маньківська<sup>1</sup>, Т. В. Бузыка<sup>3</sup>, В. О. Майський<sup>1</sup>*

#### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *c-fos* У СПИНАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ ЩУРІВ, ЯКІ РЕАЛІЗУЮТЬ СТЕРЕОТИПНІ РУХИ В УМОВАХ ПРИГНІЧЕННЯ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗИ

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

<sup>2</sup> Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України (Україна).

<sup>3</sup> Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова (Україна).

#### Резюме

У шийному відділі спинного мозку щурів, які виконували стереотипні оперантні їждобувні рухи передньою кінцівкою, за допомогою імуногістохімічної методики виявляли нейрони з наявністю в їх ядрах білка *c-Fos* – продукту експресії «раннього» гена *c-fos*, маркера активованого стану таких нейронів. У вказаних умовах досліджували ефекти пригнічення активності нейронної синтази оксиду азоту (nNOS) внаслідок системного введення селективного блокатора даного ензиму 7-нітроіндазолу (7-NI). Основні фокуси Fos-імунореактивності в сегментах *C6* і *C7* спинного мозку досліджуваних тварин за відсутності дії 7-NI були виявлені іпсилатерально в шарах сірої речовини 2i, 3 і 4, а після введення даного блокатора – окрім того, в шарі 6 і в моторних ядрах (шар 9). Після здійснення щурами їждобувних рухів у тварин із попередніми ін'єкціями 7-NI в сегментах *C6* і *C7* спостерігали вірогідно більшу загальну кількість Fos-імунореактивних нейронів, ніж у сірій речовині мозку щурів без пригнічення активності nNOS (іпсилатерально щодо робочої кінцівки – в середньому  $54.4 \pm 0.7$  клітини у зрізі 40 мкм завтовшки порівняно з  $31.7 \pm 1.1$ ;  $P < 0.05$ ). Таким

чином, експресія гена *c-fos* у шийному потовщенні спинного мозку шурів, які тривало реалізують повторні оперантні рухи, істотно посилюється в умовах пригнічення вивільнення оксиду азоту після системного введення 7-NI.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. G. J. M. Kuypers, "A new look at the organization of the motor system," *Prog. Brain Res.*, **57**, 381-403 (1982).
2. L. Jasmin, K. R. Gogas, S. C. Ahlgren, et al., "Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat," *Neuroscience*, **58**, 275-286 (1994).
3. 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).
4. O. V. Vlasenko, O. V. Dovgan', V. A. Maisky, et al., "Laminar distribution of the active spinal neurons during the feeding-related stereotyped movements in rat," *Int. J. Physiol. Pathophysiol.*, **2**, 121-131 (2011).
5. S. N. Ahn, J. J. Guu, A. J. Tobin, et al., "Use of *c-fos* to identify activity-dependent spinal neurons after stepping in intact adult rats," *Spinal Cord*, **44**, 547-559 (2006).
6. S. Saito, G. J. Kidd, B. D. Trapp, et al., "Rat spinal cord neurons contain nitric oxide synthase," *Neuroscience*, **59**, 447-456 (1994).
7. A. I. Pilyavskii, V. A. Maisky, I. Kalezic, et al., "*c-fos* expression and NADPH-d reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat," *Brain Res.*, **923**, 91-102 (2001).
8. R. C. Spike, A. J. Todd, and H. M. Johnston, "Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord," *J. Comp. Neurol.*, **335**, 320-323 (1993).
9. T. C. Sardella, E. Polgár, M. Watanabe, and A. J. Todd, "A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn," *Neuroscience*, **192**, 708-720 (2011).
10. S. T. Meller and G. F. Gebhart, "Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord," *Pain*, **52**, 127-136 (1993).
11. A. I. Pilyavskii, V. A. Maisky, A. V. Maznychenko, and A. I. Kostyukov, "7-nitroindazole potentiates *c-fos* expression induced by muscle tendon vibration in the spinal cord," *Muscle Nerve*, **45**, 597-602 (2012).
12. P. K. Moore, P. Wallace, Z. Gaffen, et al., "Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects," *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 219-224 (1993).
13. G. M. MacKenzie, S. Rose, P. A. Bland-Ward, et al., "Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro indazole," *NeuroReport*, **5**, 1993-1996 (1994).
14. 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).
15. D. L. Adkins, J. Boychuk, M. S. Remple, and J. A. Kleim, "Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord," *J. Appl. Physiol.*, **101**, 1776-1782 (2006).
16. 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).
17. Y. Wang, S. Pillai, J. R. Wolpaw, and X. Y. Chen, "Motor learning changes GABAergic terminals in spinal motoneurons in normal rats," *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 141-150 (2006).
18. J. Buritova and J. M. Besson, "Effect of nefopam on the spinal nociceptive processes: a c-Fos protein study in the rat," *Eur. J. Pharmacol.*, **441**, 67-74 (2002).
19. I. Kalezic, A. I. Pilyavskii, V. A. Maisky, et al., "Distinctive pattern of *c-fos* expression in the feline cervico-lumbar spinal cord after stimulation of vanilloid receptors in dorsal neck muscles," *Neurosci. Lett.*, **364**, 94-97 (2004).
20. T. Omori, H. Kawashima, T. Kizuka, et al., "Increased *c-fos* gene expression in alpha motoneurons in rat loaded hindlimb muscles with inclined locomotion," *Neurosci. Lett.*, **389**, 25-29 (2005).
21. O. V. Dovgan', O. V. Vlasenko, I. L. Rokunets, et al., "Food-procuring stereotype movements is accompanied by changes of *c-fos* gene expression in the amygdala and modulation of heart rate in rats," *Int. J. Physiol. Pathophysiol.*, **4**, 157-170 (2013).
22. F. O. Gamboa-Esteves, I. Tavares, A. Almeida, et al., "Projection sites of superficial and deep spinal dorsal horn cells in the nucleus tractus solitarii of the rat," *Brain Res.*, **921**, 195-205 (2001).
23. V. A. Maisky and N. Z. Doroshenko, "Catecholamine projections to the spinal cord in the rat and their relationship to central cardiovascular neurons," *J. Auton. Nerv. Syst.*, **34**, 119-128 (1991).
24. D. L. McLean and K. T. Sillar, "Metamodulation of a spinal locomotor network by nitric oxide," *J. Neurosci.*, **24**, 9561-9571 (2004).
25. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press, San Diego (1997).