

ТЕОРЕТИЧНА І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 612.825/.76+575.113

*О.В. Власенко**Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова***ПРОСТОРОВІ ТА КІЛЬКІСНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОЗПОДІЛУ FOS-ІМУНОПОЗИТИВНИХ НЕЙРОНІВ МОТОРНОЇ КОРИ ЩУРІВ У ПРОЦЕСІ ФОРМУВАННЯ РУХОВОЇ НАВИЧКИ**

Імуногістохімічно виявлено експресію білка раннього відповіді c-Fos, пов'язану з активацією нейронів моторної кори щурів під час формування нової рухової навички. Кількісний аналіз експресії Fos-імунопозитивних нейронів свідчить про інтенсивну активацію кортикальних нейронів на початковій стадії навчання та зменшення активності впродовж наступних стадій. Максимальна активація в моторній корі нейронів шарів 5 та 6 відбувалась у 1-шу добу тренування, а нейронів 2/3 шарів – на 3-тю. Отже, формування і закріплення рухової навички супроводжується складним патерном активації в нейронах виходу з кори та в нейронах, які забезпечують внутрішньокіркові зв'язки.

Ключові слова: шари моторної кори, навчання, ген c-fos, щур.

Процес формування нових рухових навичок супроводжується активацією великої кількості мозкових структур, які взаємодіють між собою, утворюючи системи для досягнення корисного пристосувального результату. Описано ряд залучених структур [1] і можливі схеми зв'язків нервових центрів у тварин і людей [2]. Проте невивченим залишається питання взаємодії нейронних систем всередині мозкових центрів, серед яких особливий інтерес викликає кора великих півкуль завдяки своїй ламінарній будові.

Метою дослідження було встановлення закономірностей часово-просторової активації нейронів різних шарів моторної кори щура під час вироблення нової рухової навички. Нами вибрані методика визначення активації нервового центру за кількістю Fos-імунопозитивних ядер нейронів після експресії гена c-fos і експериментальна модель вироблення у щурів оперантного їжодобувного рефлексу, яка широко використовується в сучасних дослідженнях [3, 4].

Матеріал і методи. У досліджах були використані шість груп (по чотири тварини в кожній) щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г. Інтактна група отримувала достат-

не стандартне харчування й служила контролем. У решти тварин створювали харчову мотивацію при вільному доступі до води (голодуванням протягом 3 діб для вироблення оперантного їжодобувного рефлексу) [3]. Тренувальні сеанси тривалістю 30 хв проводилися щоденно протягом 14 днів. Щури навчалися реалізувати стереотипні рухи захоплення однією з передніх кінцівок харчових кульок з годівниці (4–12 захватів їжі за хвилину, близько 50–200 штук за один сеанс). Усі експериментальні процедури були виконані відповідно до Директиви Ради Європейських Співтовариств від 24.11.1986 р. (86/609/ЄЕС).

Щурів контрольної та експериментальних груп (останніх – через 2 год після закінчення тренувального сеансу) під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, внутрішньочеревинно; Sigma, США) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ, 0,1 М, 250 мл), що містив 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 фіксу-

© О.В. Власенко, 2015

вали в цьому розчині протягом 12 год. Потім блоки тканини мозку з метою кріопротекції витримували 48 год при 4 °С у 30%-вому розчині сахарози, приготованому на СФБ. На заморожуючому мікротомі виготовляли фронтальні зрізи товщиною 40 мкм, котрі збирали в лунки із СФБ для подальшого імуногістохімічного забарвлення. Fos-імунопозитивні ядра (Fos-іп-ядра, ядра мічених нейронів) виявляли 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) [5]. Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер при збільшенні 250 або 400. Підрахунок Fos-іп-ядер нейронів у моторній корі проводили контрлатерально до робочої кінцівки по 10 зрізів у щура за допомогою оптичного мікроскопа; локалізацію структур визначали за атласом [6], щільність Fos-іп-нейронів підраховували, беручи середню кількість мічених клітин на площі зрізів мозку 200 x 200 мкм². Значення щільності мічених клітин у різних структурах мозку різних груп щурів порівнювали за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу варіацій (ANOVA), міжгрупові різниці вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Вплив процесу формування оперантного рефлексу на кількісні показники щільності Fos-іп-нейронів досліджували шляхом порівняння даних, отриманих від щурів у різні дні вироблення оперантного їждобувного рефлексу. Згідно з нашими даними, процес формування моторного компонента рефлексу відбувається у три стадії – початкову, перехідну і стадію досконалої навички [7]. Критерієм ефективності навчання було взято індекс успішного захоплення харчової кульки (по-

казник, обернений до кількості спроб для захоплення однієї кульки). При цьому «взломними» днями у формуванні нової моторної навички були визнані 1, 3, 5, 8 і 14-й. Саме у ці дні тренувань було оцінено розподіл мічених нейронів Fos-імунопозитивних ядер нейронів у шарах 2/3, 4, 5, 6 моторної кори в групі нетренованих тварин і після відповідного дня вироблення моторного навика, а їх результати наведені в таблиці.

Аналіз результатів досліджень свідчить, що процес напрацювання нової рухової навички супроводжується активацією експресії гена c-fos у нейронах моторної кори. Нами розраховано величину середньої кількості мічених нейронів у всіх шарах моторної кори мозку. За цим показником найбільша кількість мічених нейронів виявлена у моторній корі на 3-тю добу тренувань, а після 8-ї доби рівень активності зменшувався до фонового рівня контрольних тварин. Вірогідні відмінності ($p < 0,05$) середніх щільностей Fos-іп-нейронів моторної кори встановлені при порівнянні показників контрольної групи з отриманими від груп після 1-го, 3-го та 5-го днів тренування. При цьому кожен шар кори, на який припадає пік нейронної активації, має свої особливості реакції (рис. 1). Так, максимум нейронної активності у 2/3 шарах кори припадає на 3-тю добу тренування (в цей час кількість мічених нейронів збільшилась у 4 рази порівняно із фоновим рівнем контрольних тварин, $p < 0,05$), тоді як нейрони 4-го шару моторної кори проявляли найвищу активність на 3-тю і 5-ту добу тренувань (при цьому рівень активності збільшився в 1,27 раза, $p < 0,05$), а для шарів 5 і 6 пік активності нейронів припав на 1-шу добу тренувань (кількість мічених нейронів вірогідно збільшилась у 2,8 та 2,2 раза відповідно, $p < 0,05$).

Для порівняння показників, що вивчались на одній експериментальній моделі, спів-

Середні величини кількості Fos-імунопозитивних нейронів ($M \pm s$) у зрізах на площі 200x200 мкм² у межах шарів моторної кори щурів контрольної групи і в різні дні тренування

Група тварин різної тренованості	Шари моторної кори				середня кількість мічених клітин усіх шарів
	2/3	4	5	6	
Контроль	34,06±6,75	31,54±7,59	11,85±3,77	16,11±6,02	23,39±6,03
1-ша доба	66,93±11,14	37,3±6,24	32,95±8,03	35,86±9,45	43,22±8,71
3-тя доба	138,92±19,37	40,17±9,56	23,06±5,21	22,80±4,79	56,24±9,72
5-та доба	113,58±14,08	40,23±7,31	21,22±4,18	20,43±4,68	48,86±7,56
8-ма доба	50,12±8,33	38,44±7,72	15,62±5,22	16,60±4,73	30,19±6,50
14-та доба	24,41±10,24	16,38±8,01	15,22±4,43	13,81±5,24	17,46±6,89

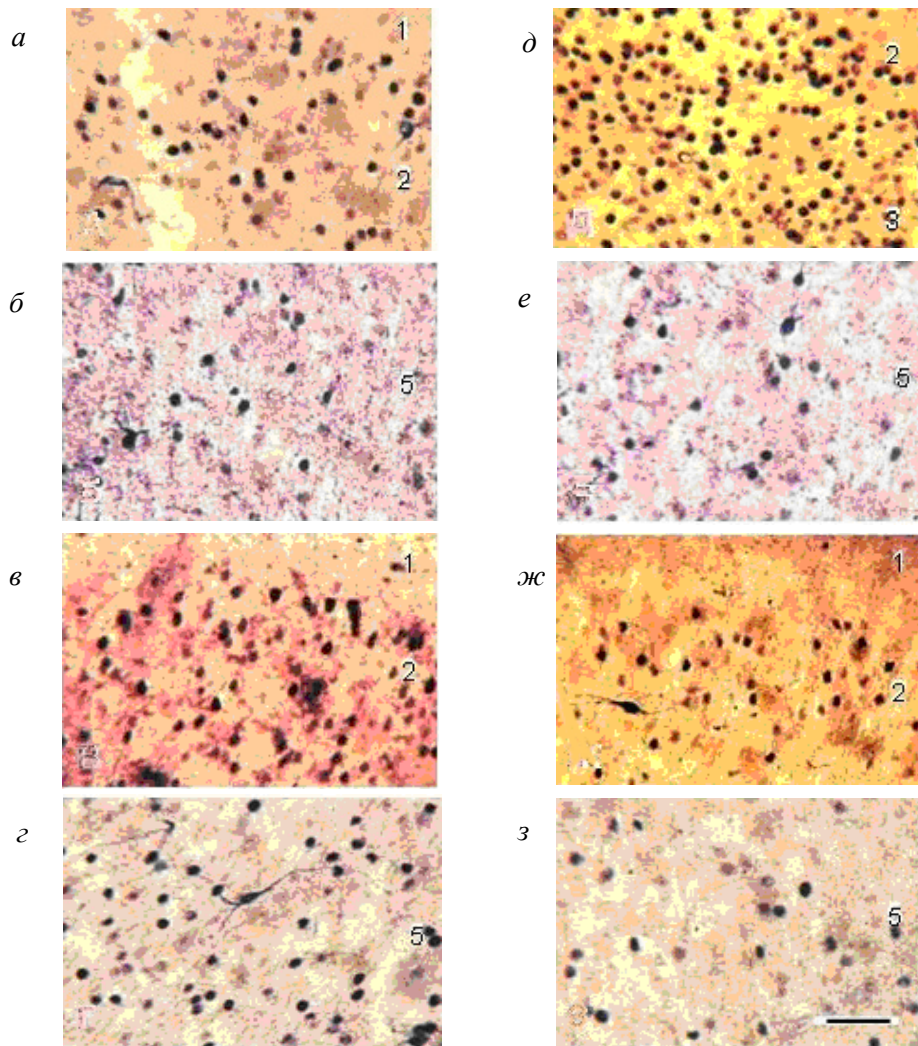


Рис. 1. Мікрофотографії Fos-імунопозитивних нейронів (їх ядра округлої форми, інтенсивно забарвлені) моторної кори щурів різної тренуваності: *а, б* – у тварин контрольної групи; *в, г* – після 1-ї доби формування рухової навички; *д, е* – після 5-ї доби; *ж, з* – після 14-ї доби. Цифрами позначено шари кори на рівні $+2,2 \pm 1,4$ мм від брегми [6]. Масштабна лінія 50 мкм відповідає усім фрагментам

ставлено нормалізований індекс успішності нейронів у всіх шарах (2–6) моторної кори в реалізації навички в процесі напрацювання із зрізах мозку на рівні від $+2,2$ до $+1,4$ мм від нормалізованою сумарною кількістю Fos-іп- брегми у щурів різної тренуваності (рис. 2).

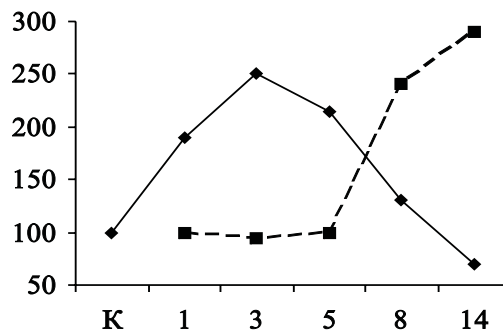


Рис. 2. Порівняння змін нормалізованих показників успішності реалізації навички (пунктирна лінія) із щільністю Fos-імунопозитивних нейронів (суцільна лінія) в усіх шарах моторної кори. За 100 % для графіка успішності взято індекс успішного захоплення харчової кульки в 1-шу добу тренування, а для графіка кількості – кількість Fos-імунопозитивних нейронів у контрольній групі (К) нетренованих щурів

Звертає на себе увагу зворотна залежність у часі між цими показниками: на початку тренування встановлено високий рівень експресії гена *c-fos* при низькій ефективності їжодобувних рухів. Після 5-го дня тренувань точність рухів зростає, а рівень експресії гена *c-fos* стає меншим. Отже, активація нейронів моторної кори зі збільшенням кількості Fos-іп-нейронів є передумовою функціональних змін діяльності моторної системи у цілому.

Висновки

1. Процес вироблення нового моторного навичку оперантного їжодобувного рефлексу у щурів супроводжується посиленою експресією білка ранньої відповіді *c-Fos* у нейронах моторної кори на початковій стадії навчання – з 1-ї по 5-ту добу.

2. Максимум кількості Fos-імунопозитивних нейронів 5 і 6 шарів моторної кори

припадає на 1-й день тренувань, а серед нейронів 2/3 шарів – на 3-й – 5-й дні тренувань, що створює складний і неодночасний патерн активації нейронних груп, одні з яких забезпечують функцію виходу з кори, а інші забезпечують внутрішньокіркові зв'язки.

3. Існує обернена залежність у часі між інтенсивністю експресії білка *c-fos* у нейронах моторної кори та ефективністю нового їжодобувного руху, що може свідчити про причинно-наслідкові зв'язки між цими процесами.

Перспективи подальших досліджень.

Передбачається використання цієї методики для моделювання патологічних процесів у ЦНС, встановлення участі мозкових структур у формуванні різноманітних симптомкомплексів, вивченні дії нових лікарських засобів.

Література

1. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord / D.L. Adkins, J. Boychuk, M.S. Remple, J. A. Kleim // *J. Applied Physiology*. – 2006. – № 6. – P. 1776–1782.

2. Tzvi E. Delineating the cortico-striatal-cerebellar network in implicit motor sequence learning / E. Tzvi, T.F. Munte, U.M. Kramer // *Neuroimage*. – 2014. – Vol. 94. – P. 222–230.

3. Особливості формування параметрів їжодобувних рухів щурів в умовах вільної поведінки / В.М. Мороз, М.В. Йолтухівський, О.В. Власенко та ін. // *Вісник Вінницького національного медичного університету*. – 2010. – Т. 4, № 1, С. 1–14.

4. Motor learning dependent synaptogenesis is localized to functionally reorganized motor cortex / J.A. Kleim, S. Barbay, N.R. Cooper, et al. // *Neurobiol. Learn. Memory*. – 2002. – Vol. 77. – P. 63–77.

5. Fos-иммунореактивность и НАДФН-д-реактивность 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.

6. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – San Diego: Acad. Press, 1997. – 197 p.

7. Власенко О.В. Стадії формування оперантного рефлексу у щурів / О.В. Власенко // *Буковинський медичний вісник*. – 2015. – Т. 19, № 1. – С. 54–58.

О.В. Власенко

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ FOS-ИМУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ МОТОРНОЙ КОРЫ КРЫС В ПРОЦЕССЕ ФОРМИРОВАНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОГО НАВЫКА

Иммуногистохимически обнаружено экспрессию белка раннего ответа *c-Fos*, связанную с активацией нейронов моторной коры крыс во время формирования нового двигательного навыка. Количественный анализ экспрессии Fos-иммунопозитивных нейронов свидетельствует об интенсивной активации кортикальных нейронов на начальной стадии обучения и уменьшении активности в последующие стадии. Максимальная активация в моторной коре нейронов слоев 5 и 6 происходила в 1-й день тренировки, а нейронов 2/3 слоев – на 3-й. Таким образом, формирование и фиксация нового двигательного навыка сопровождается сложным паттерном активации в нейронах выхода из коры и в нейронах, которые обеспечивают внутрикоровые связи.

Ключевые слова: слои моторной коры, обучение, ген *c-fos*, крыса.

O.V. Vlasenko

SPATIAL AND QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF DISTRIBUTION OF FOS-IMMUNOPOSITIVE NEURONS OF RATS MOTOR CORTEX IN THE PROCESS OF MOTOR SKILL FORMATION

Expression of early response protein c-Fos-associated with activation of rats motor cortex neurons during new motor skill formation was revealed immunohistochemically. Quantitative analysis of Fos-immunopositive neurons expression indicates intense activation of cortical neurons in the initial stage of training and activity reduction in the subsequent stages. In motor cortex maximum activation of layers 5 – 6 neurons had occurred on the first day of training, and layers 2/3 neurons – on the third day of training. Thus, the formation and fixing of a new motor skill had accompanied with complex patterns of activation in output cortex neurons and neurons which provide intracortical connections.

Key words: *layers of motor cortex, skill, c-fos gene, rat.*

Поступила 20.04.15