

Міністерство охорони здоров'я України  
Вінницький національний медичний  
університет імені М. І. Пирогова

ДОВГАНЬ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ

УДК 612.76:599.323.4:611.814.1: 611.813

ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ ГІПОТАЛАМУСА ТА  
МИГДАЛЕПОДІБНОГО КОМПЛЕКСУ ПІД ЧАС РЕАЛІЗАЦІЇ  
ЇЖОДОБУВНИХ РУХІВ У ЩУРІВ

14.03.03 – нормальна фізіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Вінниця – 2014

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова МОЗ України

**Науковий керівник:**

доктор медичних наук **Власенко Олег Володимирович**,  
Вінницький національний медичний університет  
імені М.І. Пирогова, декан медичного факультету №2,  
доцент кафедри нормальної фізіології

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор **Василенко Дмитро Артурович**,  
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця,  
провідний науковий співробітник відділу фізіології рухів

доктор медичних наук, професор **Булик Роман Євгенович**,  
Буковинський державний медичний університет,  
професор кафедри медичної біології, генетики та фармацевтичної  
ботаніки.

Захист відбудеться „28” травня 2014 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.02 при Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

Автореферат розісланий „25” квітня 2014 року

**В. о. ученого секретаря  
спеціалізованої вченої ради**

**Л. В. Фоміна**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** У комплексі функцій нервової системи важливе місце посідає контроль рухової функції, що забезпечує активну взаємодію організму з навколишнім середовищем. Порушення ж складних координованих рухів у людини призводить до важких органічних (інвалідації або навіть смерті), психологічних та психічних розладів (Волошин П. В., 2006, Шамаєв М. І., 2012). Це завдає значних збитків суспільству через втрату працездатних його членів, а державі через необхідність значних соціальних виплат (Яковлева Л. В., 2012).

В цьому контексті виключно актуальним є дослідження закономірностей формування та виконання моторних програм, до реалізації яких залучено цілу низку кортикальних та субкортикальних структур. Така реалізація базується на складних інтегративних процесах у ЦНС (Takakusaki K., 2013, Власенко О. В., 2013). В цій системі як ініціатор задуму руху, важливе місце посідають підкіркові лімбічні центри переднього мозку, що забезпечують створення мотиваційного фону моторних навичок (Казаков В. Н., 2002). До таких утворень можна віднести гіпоталамус та мигдалеподібний комплекс (Мороз В. М., 1998, Rolls E. T., 2013). Їх об'єднують в функціональну систему, що формує спонукання до дії і власне задум дії (Йоффе М. Е., 2003).

Моторна кора великих півкуль та лімбічні структури базальної частини переднього мозку у людини і тварин пов'язані з когнітивними функціями і залучаються до формування мотивованих рухових програм і реалізації оперантних (інструментальних) рефлексів (Буреш Я., 1991). У гіпоталамусі вирізняють функціональну локомоторну ділянку (Sinnamon H. M., 1990, Кебкало Т. Г., 1991, Jackson A. W., 2011). Деякі ядра переднього гіпоталамуса причетні до організації циркадіанних ритмів локомоторної активності (Замощина Т. А., 2011, Булик Р. Є., 2014). У гіпоталамуса існують складні еферентні та аферентні зв'язки з моторною корою, структурами стовбуру мозку, спинним мозком (Майський В. А., 1983). Латеральний гіпоталамус бере участь у формуванні задуму та програми швидких їжодобувних рухів у щурів (Йолтухівський М. В., 1999). Все це дозволяє висловити припущення про активне залучення низки центрів гіпоталамуса до регуляції оперантних рефлексів.

Відомо, що після тривалої харчової депривації відбувається помітне збільшення електричної активності у латеральних та паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса (de Araujo I. E., 2006, Johnstone L. E., 2006, Marchant N. J., 2009). Білатеральне руйнування цих ядер, проте, не призводило до повного зникнення їжодобувної поведінки (McMinn J. E., 2000). Припускають, що в регуляції такої поведінки можуть брати участь й інші ядра гіпоталамуса (Poulin M., 2008), зокрема субпопуляції нейронів, які генерують оксид азоту (NO). У гіпоталамусі відмічена велика концентрація нейронної синтази оксиду азоту (NOS) (Engelmann M., 2004, Orlando G. F., 2008). Застосування блокаторів даного

ензиму супроводжувалось пригніченням їжозалежної поведінки у щурів (Vettor R., 2002).

На керування руховим процесом істотно впливають стани, котрі пов'язані з мотивацією, емоціями, інстинктами та ін. На даний час опублікована значна кількість експериментальних робіт, в яких досліджувалися патерни нейронної активації в ядрах мигдалеподібного комплексу при реалізації тваринами мотивованих поведінкових рефлексів (Park T. H., 1998, Омельченко О. Д., 2003, Barot S. K., 2005). Вплив NO-системи на виділення глутамату та ГАМК у цих центрах є важливим фактором, який сприяє залученню мигдалеподібного комплексу до формування та реалізації їжодобувних оперантних рефлексів (Okere C. O., 2000, Saha S., 2005). Слід, проте, визнати, що результати цих досліджень щодо оцінок нейронної активації в окремих ядрах та під'ядрах мигдалеподібного тіла дуже суперечливі (Knapska E., 2007).

Залишається маловивченим ступінь причетності лімбічних структур до формування та реалізації автоматизованих рухів, їх функціональна взаємодія зі структурами, які відповідають за виконання внутрішньо мотивованого рухового акту. Це об'єктивно пов'язано зі значною динамічністю нервових процесів та методологічними складнощами (Костюков А. И., 2007, Franz E. A., 2011).

Отже, враховуючи вище сказане, встановлення закономірностей функціонування нейронних систем в структурах мигдалеподібного тіла та гіпоталамуса в умовах реалізації оперантної їжодобувної поведінкової активності є високо актуальною задачею.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в межах міжкафедральної планової наукової роботи Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова "Встановлення закономірностей взаємодії структур головного мозку при керуванні рухами", № держреєстрації: 0108U008672; а також є фрагментом планової наукової роботи кафедри нормальної фізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова «Просторово-часова організація рухів у людини і тварин» № держреєстрації: 0112U001065. В цьому комплексі досліджень автору належать результати вивчення функціональної активності нейронних популяцій в структурах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу, залучених до реалізації їжодобувної поведінкової активності у щурів.

Тема дисертаційного дослідження затверджена вченою радою медичних факультетів Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України (протокол № 4 від 12 березня 2009 року) та проблемною комісією МОЗ та НАМН України «Нормальна і патологічна фізіологія» (протокол № 5 від 24 жовтня 2013 року).

**Мета дослідження:** встановити характер функціональної активації нейронних систем в ядрах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу щурів, пов'язаної з реалізацією оперантної їжодобувної поведінкової активності та можливу причетність NO-продукуючих нейронів до контролю такої поведінки.

Для виконання мети дослідження було поставлено такі основні **завдання**:

1. Встановити особливості просторового розподілу c-Fos-імунопозитивних нейронів та їх кількісні характеристики в ядрах гіпоталамуса в інтактних щурів в умовах харчової депривації та після реалізації оперантних їжодобувних рухів.
2. Визначити особливості розподілу c-Fos-імунопозитивних нейронів та їх кількісні характеристики в ядрах мигдалеподібного комплексу у щурів вказаних вище експериментальних груп.
3. Охарактеризувати просторовий розподіл NO-продукуючих нейронів в ядрах гіпоталамуса в інтактних щурів в умовах харчової депривації та після реалізації оперантних їжодобувних рухів.
4. Встановити особливості розподілу NO-продукуючих нейронів в ядрах мигдалеподібного комплексу у щурів вказаних вище експериментальних груп.
5. На основі отриманих даних сформулювати уявлення про можливості залучення структур гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу у різні аспекти контролю їжодобувної оперантної поведінки.

*Об'єкт дослідження:* рівень активності нейронів в ядрах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу у щурів в умовах харчової депривації та після реалізації стереотипних їжодобувних рухів у порівнянні з відповідною активністю в інтактних тварин.

*Предмет дослідження:* c-Fos-імунореактивні і NO-продукуючі нейрони в ядрах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу в інтактних щурів в умовах харчової депривації та після реалізації оперантних їжодобувних рухів.

*Методи дослідження:* використовували гістологічну (мікроскопічне вивчення досліджуваних структур на світлооптичному рівні), імуногістохімічну (виявлення білка «швидкого реагування» c-Fos, за допомогою поліклональних антитіл щодо даного ядерного протеїну у зрізах головного мозку) та гістохімічну (забарвлення НАДФ-Н-діафоразореактивних нейронів, що містять NO-синтазу) методики. Використовувалися загальноприйняті методи математичної статистики для обробки числових даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше детально описано просторовий розподіл нейронів з експресією c-Fos-протеїну (маркера нейронної активації) в ядрах і під'ядрах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу інтактних щурів, а також у щурів з високою харчовою мотивацією та після реалізації харчової поведінкової активності. Встановлено, що у різних гіпоталамічних ядрах інтактної групи тварин середня щільність активованих нейронів у фронтальних зрізах зростає у ростро-каудальному напрямку з найвищою активацією на рівнях -2,3 / -2,8 мм від брегми.

Вперше описані структури гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу, які інтенсивно активуються під час реалізації оперантної харчової поведінкової активності. Показано, що значне підвищення експресії c-Fos під час харчової депривації відбувається в нейронах переднього та медіальної частини паравентрикулярних ядер гіпоталамуса, а також в медіальних та передній частині кортикальних ядер мигдалеподібного комплексу. Вперше показана роль субкортикальних вегетативних центрів гіпоталамуса, а саме супраоптичних та

передньої частини паравентрикулярних ядер, у контролі моторного компонента поведінки під час реалізації стереотипних їжодобувних рухів.

Докладно описано патерни нейронної активації в лімбічних ядрах мигдалеподібного комплексу щурів під час виконання стереотипних оперантних їжодобувних рухів. Встановлено, що в таких умовах в задніх кортикальних ядрах мигдалеподібного комплексу нейрони активуються іпсілатерально відносно робочої кінцівки, а в базолатеральних і центральних ядрах мигдалеподібного комплексу – білатерально, з максимальним фокусом активації в латеральній частині центральних ядер.

Вперше у структурах переднього мозку описано просторовий розподіл та проведено кількісний порівняльний аналіз НАДФ·Н-др (NOS-вмісних) нейронів у інтактних щурів, тварин підданих харчової депривації, та щурів після реалізації стереотипних їжодобувних рухів. Вперше встановлено морфологічні ознаки нейро-судинного зчеплення між такими нейронами та мозковими мікросудинами в паравентрикулярних та латеральних ядрах гіпоталамуса, а також описано активацію цієї популяції нейронів під час виконання оперантних рухів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані дані можуть сприяти детальнішому розумінню механізмів закріплення та реалізації стереотипних інструментальних рухових рефлексів і слугувати підґрунтям для подальшого дослідження організації рухових програм, які ініційовані сигналами скерованими на досягнення цілі. Встановлені у перебігу дослідження факти та їх інтерпретація можуть бути використані фахівцями у сфері практичної медицини для поглиблення уявлення про патогенез порушень мотивованих поведінкових реакцій, а також у сфері фармакології та фізіології праці. Результати дослідження можуть слугувати також для подальшого розширення експериментальних можливостей щодо аналізу організації рухових програм, дослідження станів голоду та насичення, а також фармакологічної корекції таких станів.

Отримані у дослідженні нові дані щодо наявності механізмів регуляції місцевого кровообігу в паравентрикулярних та латеральних ядрах гіпоталамуса на основі нейросудинного зчеплення за участю NO-продукуючих нейронів та теоретична інтерпретація щодо функціонування нейросудинних одиниць у головному мозку при оперантній моторній активності впроваджені в навчальний процес на кафедрі фізіології Одеського національного медичного університету і на кафедрі гістології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Отримані результати щодо механізмів активації нейронів у супраоптичних, паравентрикулярних та дорзомедіальних ядрах гіпоталамуса в щурів, що реалізують їжодобувну поведінкову активність, впроваджені в навчальний процес на кафедрі нормальної фізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова, а дані щодо механізму активації нейронів в центральних та базолатеральних ядрах мигдалеподібного комплексу під час реалізації оперантних їжодобувних рухів у щурів впроваджені в

навчальний процес на кафедрі нормальної фізіології ДВНЗ „Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом разом з науковим керівником було здійснено розробку основних теоретичних положень роботи. Автор особисто провів аналіз наукової літератури й реферування вітчизняних та зарубіжних літературних джерел, оволодів методиками фізіологічних досліджень, провів у повному обсязі всі експериментальні дослідження на тваринах, здійснив обробку та аналіз отриманих результатів, їх викладення та зіставлення з літературними даними. Дисертантом написані всі розділи дисертації та підготовлено результати власних досліджень до друку. Разом з науковим керівником було сформульовано тему, мету, задачі дослідження. Автор брав активну участь у розробці концепції частин робіт, інтерпретації результатів, обговоренні та формулюванні висновків; це було проведено за участю наукового керівника дисертації д. мед. н. О. В. Власенка і співавторів публікацій д. б. н. В. О. Майського, к. б. н. О. І. Пілявського та к. б. н. А. В. Мазниченка. Запозичень ідей та розробок у співавторів публікацій не було. Робота виконана на базі лабораторії експериментальної нейрофізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертації були представлені на Європейському з'їзді фізіологічних товариств (Мюнхен, 2006), на XVII з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Чернівці, 2006), на Міжнародному симпозіумі пам'яті професора В. І. Скока „Молекулярні механізми регуляції синаптичної передачі” (Київ, 2007), II з'їзді фізіологів СНД (Кишинів, 2008), VI міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Сьогодення та майбутнє медицини» (Вінниця, 2009), на XVIII з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Одеса, 2010), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологія нейроендокринної системи», присвяченій 100-річчю від дня народження професора Я. Д. Кіршенבלата (Чернівці, 2012).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 13 робіт, з яких – 8 статей у фахових виданнях (у тому числі одна - у США та сім - у виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз), решта 5 робіт – у збірниках наукових праць та матеріалах і тезах конференцій і з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 163 сторінках друкованого комп'ютерного тексту. Останній складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, опису методики дослідження, чотирьох розділів, у яких описано результати власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел. Робота проілюстрована 20 рисунками та 4 таблицями. Список використаних джерел містить 279 джерел (в тому числі 208 викладені латиницею, 71 – кирилицею). Рисунки, таблиці та список використаних джерел займають 46 сторінок рукопису.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проведено на базі акредитованої науково-дослідної лабораторії експериментальної нейрофізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (свідоцтво про атестацію № 015/12 від 01.03.2012 р.) та, частково, у Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. В дослідженні використали статевозрілих щурів-самців лінії Вістар ( $n = 31$ ) масою 250-310 г, віком 3-3,5 місяці, яких отримували з експериментально-біологічної клініки Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова встановлено, що методи дослідження знаходяться у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації та Конвенції Ради Європи щодо прав людини та біомедицини (1977 р.), відповідним положенням ВООЗ, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.), Конвенції Ради Європи щодо охорони хребетних тварин, котрих використовують в наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиві ЄЕС №609 від 24 листопада 1986 р. та наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р.; результати роботи можуть бути використані для відкритого захисту.

*Склад експериментальних груп.* Щурі були поділені на три групи. Групу 1 (контрольну або інтактну  $n = 8$ ), складала тварини, що перебували на стандартному режимі віварію, при вільному доступі до води й до їжі. В групу 2 (порівняння) ввійшли 8 щурів, які протягом трьох діб знаходились в умовах харчової депривації при вільному доступі до води. Групу 3 склали 15 експериментальних тварин, які протягом трьох діб також знаходились в умовах харчової депривації, при вільному доступі до води. Після чого в них починали виробляти оперантний їждобувний рух передньою кінцівкою і пальцями для захоплення харчових кульок з годівниці. Тренування тривало 12 діб (одна тренувальна сесія на добу), до вироблення стійкої рухової навички. За одну тренувальну сесію (20-25 хвилин) тварина здобувала та з'їдала 100-150 харчових кульок з годівниці. Виконання оперантних їждобувних рухів було для тварин групи 3 єдиним шляхом здобування харчу; це забезпечувало високу мотивацію до виконання вказаних рухів протягом усього періоду тренувань. Втрата маси тіла складала не більше 20% від вихідної. У частини щурів групи 3 (7 тварин), протягом 12 діб так і не вдалося виробити чітких латералізованих рухових навичок; тому всі наведені нижче результати були отримані на решті щурів групи 3 ( $n = 8$ ), у яких оперантні їждобувні рухи були стійко вироблені.

Експеримент розпочинали з хендлінгу тварин всіх трьох груп по 5 хв протягом трьох діб для перших двох груп і 12 діб для тварин групи 3. Щурів розміщували в експериментальній плексигласовій камері Меджиряна (Megirian D. et al., 1974) у власній модифікації. Щоденно, перед проведенням хендлінгу та після цього тварин груп 1 та 2, а також перед хендлінгом та після тренування щурів групи 3, зважували для контролю динаміки маси тіла.



*Перфузія та фіксація матеріалу.* Не пізніше, ніж через 90 хв після останнього сеансу тренування та зважування тварин, під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 75 мг/кг, Sigma, США, внутрішньоочеревинно) протягом 5-7 хвилин інтракардіально через висхідну аорту перфузували сольовим фосфатним буфером (СФБ, 250 мл), що містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Перфузію продовжували протягом 20 – 30 хв 4 %-м параформальдегідом, розчиненим у фосфатному буфері (ФБ 0,1 М, 500 мл), охолодженим до +4°C (рН 7,4). Головний мозок кожної тварини виділяли з черепної коробки, звільняли від оболонок і різали на сегменти 7-12 мм завтовшки. З метою кріопротекції матеріал витримували 48 год при +4°C у 15 %-му та 30 %-му розчинах сахарози.

На заморожуючому мікротомі виготовляли фронтальні зрізи мозку товщиною 40 мкм. Послідовні зрізи вміщували перетини структур, що вивчалися; рівні перерізів складали -1,3 / -1,8 мм, -2,12 мм, та -2,3 / -2,8 мм від брегми, що відповідає ростральному, середньому та каудальному відділам гіпоталамуса; а також представництву мигдалеподібного комплексу (від -2,12 мм до -3,14 мм від брегми); розподіл нейронів у даній структурі реєстрували на трьох ключових рівнях (-2,12, -2,56 та -3,14 мм від брегми), що відповідає ростральному, середньому та каудальному відділу мигдалеподібного комплексу, згідно з атласом мозку щура (Paxinos a. Watson, 1997).

Зрізи збирали в лунки із холодним СФБ; половину зрізів використовували для імуногістохімічного, а іншу – для гістохімічного забарвлення. З кожного мозку було отримано по 40-45 кріостатних зрізів, зібраних з кроком 200 мкм.

*Імуногістохімія.* Мічені нейрони з c-Fos-іп ядрами виявляли за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики (Hsu S., 1981) з використанням поліклональних кролячих антитіл щодо білка c-Fos (“Calbiochem”, США) та комерційного набору ABC Kit (“Vector Laboratories”, США).

*Гістохімія.* Для виявлення НАДФ·Н-др нейронів зрізи витримували 3 год в термостаті при 37 °С у 0,1 М ФБ (рН 7.4), який містив 0,3 % детергенту, Triton X-100, нітроблакитний тетразолій (0,2 мг/мл), яблучну кислоту (1,2 мг/мл, „Sigma”, США) та редукований β-НАДФН (0,5 мг/мл, „Sigma”, США) (Vincent S., Kimura H., 1992). Для подвійного забарвлення мікропрепаратів спочатку проводили забарвлення зрізів на c-Fos, а потім для виявлення НАДФ·Н-др нейронів їх додатково витримували 1 год при 37 °С у даному розчині.

Для визначення середньої кількості (щільності) c-Fos-іп одиниць, NO-продукуючих, а також подвійно забарвлених нейронів підраховували кількість мічених клітин на ділянках зрізу 200×200 мкм<sup>2</sup> (тест-ділянках) у відповідній структурі згідно з атласом мозку щура. Значення середньої щільності мічених нейронів ± похибка середнього в зрізі мозку завтовшки 40 мкм, розраховували у 10–12 зрізах на досліджуваних рівнях головного мозку кожної тварини.

*Для статистичної обробки* отриманих параметричних даних використовували стандартний пакет „STATISTICA 5.5” (належить ЦНІТ ВНМУ імені М. І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Оцінювали вид

розподілу для кожного з отриманих варіаційних рядів, визначали середні значення, стандартні відхилення та похибки середнього. Достовірність різниць значень між незалежними числовими величинами в разі відповідності розподілів нормальному закону визначали за критерієм Стюдента та з використанням дисперсійного аналізу (ANOVA), а в разі відхилення від нормальності розподілу – за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Відмінності між показниками груп вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх аналіз.** *c-Fos* імунопозитивність нейронів у ядрах гіпоталамуса. Істотну *c-Fos* імунопозитивність у інтактних тварин було зареєстровано в ядрах переднього, латерального, дорсомедіального і вентромедіального відділів гіпоталамуса, а також у паравентрикулярному та супраоптичному ядрі, медіальному преоптичному ядрі і сірому горбику на його ростральному (-1,3 / -1,8 мм), середньому (-2,12 мм) та каудальному (-2,3 / -2,8 мм) рівнях від брегми.

У щурів контрольної групи щільність *c-Fos*-іп клітин на ростральних рівнях у PaAP, LHD, LHV, SO та MPO була незначною. У PaAP в середньому вона складала  $3,9 \pm 0,4$  мічених клітин у зрізі. У LHD та SO кількість активованих нейронів також була відносно невисокою ( $3,3 \pm 0,3$  та  $4,1 \pm 0,4$  клітин відповідно). Дещо вищу кількість *c-Fos*-іп одиниць спостерігали у LHV  $4,4 \pm 1,1$  та MPO  $4,8 \pm 0,4$ . Найвищу ж активність *c-Fos*-іп (активованих) нейронів на цих рівнях відмічали у передній гіпоталамічній ділянці ( $8,1 \pm 0,7$  клітин на тест-зону зріза).

На рівні -2,12 мм щільність таких клітин була дещо вищою і складала у LHD і LHV в середньому  $5,3 \pm 0,4$  та  $7,2 \pm 0,6$  *c-Fos*-іп клітин відповідно. У медіальній частині паравентрикулярного ядра кількість даних нейронів була найвищою і становила  $12,1 \pm 1,2$  клітин на тест-зону. На каудальних рівнях (-2,3 / -2,8 мм) у VMHD, VMHV, DMD та TC щільність *c-Fos*-іп нейронів виявилася значно вищою. Так, у VMHD та VMHV реєстрували по  $15,6 \pm 0,8$  і  $17,1 \pm 1,8$  мічених клітин відповідно, у DMD щільність досягала  $13,9 \pm 0,8$  мічених клітин. У TC середня щільність *c-Fos*-іп нейронів у щурів контрольної групи була найвищою серед усіх гіпоталамічних структур ( $17,8 \pm 1,3$  одиниць). Таким чином, у контрольної групи тварин кількість активних нейронів у різних гіпоталамічних ядрах зростала в напрямку від ростральних рівнів до каудальних.

Порівнюючи з тим, що спостерігалось у контрольній групі щурів, у тварин після харчової депривації рівень *c-Fos* експресії у багатьох гіпоталамічних структурах та на різних досліджуваних рівнях достовірно ( $p < 0,05$ ) відрізнявся. В під'ядрах латерального гіпоталамуса (центру голоду) реєстрували високу щільність *c-Fos*-іп нейронів: на рівні -1,3 / -1,8 мм від брегми ( $11,2 \pm 0,6$  та  $10,5 \pm 0,7$  одиниць в LHD і LHV відповідно). На середніх рівнях кількість активованих нейронів становила  $15,5 \pm 0,9$  в LHD та  $13,2 \pm 1,8$  одиниць в LHV. Окрім цього в передньому гіпоталамусі кількість мічених нейронів була ще вищою і становила від  $21,2 \pm 1,9$  до  $26,9 \pm 2,1$  одиниць на всіх рівнях. У медіальній (мілкоклітинній) частині паравентрикулярного ядра

середня кількість мічених нейронів досягала  $30,1 \pm 1,9$ , що в порівнянні з контролем було у 3-5 разів вищим ( $p < 0,05$ ). Таке підвищення кількості активованих нейронів у Ра співставно зі змінами у латеральному гіпоталамусі при очікуванні їжі на проміжній стадії насичення (Roulin A. M., 2008). Звертало на себе увагу те, що в під'ядрах вентромедіального гіпоталамуса, які відносять до центру насичення, щільність мічених нейронів становила у VMHV  $3,3 \pm 0,8$ , а у VMHD  $4,6 \pm 0,9$  одиниць на зріз – ці значення були значно нижчими ( $p < 0,05$ ) порівняно з відповідними величинами у контрольних щурів.

У щурів, які реалізували оперантні рухи (група 3), спостерігалися досить значні відмінності рівнів середньої щільності c-Fos-іп нейронів у ядрах та суб'ядрах гіпоталамуса. Необхідно відмітити, що розподіли c-Fos-іп нейронів у різних структурах переднього і середнього гіпоталамуса не демонстрували вірогідної латералізації ( $p < 0,05$ ), тобто не було виявлено іпсилатерального або контралатерального домінування рівнів нейронної активації. Тому надалі ми порівнювали значення середніх щільностей мічених нейронів в різних ядрах, не враховуючи бік підрахунку. Найбільше ці зміни були виявлені у Ра, МРО, DMD і SO. Якщо в паравентрикулярному ядрі в цілому кількість активованих нейронів складала в середньому  $18,4 \pm 2,7$  одиниць (що достовірно відрізнялося лише від значень в контрольній групі тварин), то в окремо взятому суб'ядрі РаАР на рівнях  $-1,3/-1,8$  мм від брегми відповідне значення досягало  $45,4 \pm 2,3$  мічених клітин. Зазначимо, що у РаАР, яке є одним із основних нейросекреторних ядер гіпоталамуса і джерелом проєкцій в задню долю гіпофіза, середня щільність мічених клітин після харчової депривації зростала у два рази, тоді як у тварин, які реалізовували оперантні їждобувні рухи цей показник був у 17,5 разів вищим, ніж у контролі. Окрім того, висока щільність c-Fos-іп нейронів на рівнях  $-1,3 / -1,8$  мм від брегми, була зареєстрована у експериментальних щурів в МРО і SO ( $35,9 \pm 2,5$ , та  $16,6 \pm 1,1$  c-Fos-іп нейронів, відповідно). Так, в МРО, де фоновий рівень нервової активації становив  $4,8 \pm 0,4$  одиниць, а в умовах харчової депривації –  $24,5 \pm 2,4$ , під час реалізації їждобувних рухів кількість функціонально активних нейронів перевищувала ці значення в 7,5 та 1,5 рази відповідно. В супраоптичному ж ядрі, де у контрольних і голодуючих тварин рівень середньої щільності активованих одиниць достовірно не відрізнявся ( $4,1 \pm 0,4$  та  $3,9 \pm 0,6$  нейронів відповідно), під час виконання їждобувного оперантного рефлексу він складав  $22,4 \pm 1,6$  мічених нейронів і, отже, був вищим більш ніж у 6,5 разів. Певною мірою подібний розподіл c-Fos-іп нейронів у цих структурах гіпоталамуса було продемонстровано після інтенсивної локомоції тварин на тредбані, тобто в умовах нехарчової моторної активності (Soya H., 2007).

*НАДФ·Н-діафозна активність в ядрах гіпоталамуса.* НАДФ·Н-др нейрони, тобто клітини, котрі вміщували NO-синтазу, були присутні в переважній більшості ядер та суб'ядер гіпоталамуса контрольної групи тварин. При цьому кількість нейронів в яких спостерігалася продукція NO, варіювала в широких межах, від 1-2 до 50-60 % серед всіх нейронів в досліджуваному ядрі. У найбільшій кількості подібні нейрони реєструвалися у нейросекреторних

ядрах гіпоталамуса (Pa та SO) на рівнях від -1,3 мм до -2,12 мм від брегми. Середня щільність їх становила  $434,6 \pm 28,8$  у передній (крупноклітинній) частині паравентрикулярного гіпоталамічного ядра,  $129,2 \pm 16,7$  у його медіальній (мілкоклітинній) частині та  $294,3 \pm 38,3$  мічених клітин у супраоптичному ядрі гіпоталамуса.

Супраоптичні ядра гіпоталамуса легко ідентифікували у зрізах поблизу вентральної поверхні мозку, вище оптичних трактів, завдяки щільним скупченням інтенсивно забарвлених у блакитний колір великих у діаметрі (близько 25 мкм) гранулярних нейронів. В переважній більшості нейрони мали веретеноподібну та полігональну форму із щільним НАДФ·Н-д забарвленням соми і з менш інтенсивним забарвленням розгалужених відростків. На тлі цитоплазми часто зустрічалися не забарвлені (світлі) ядра. Такі клітини зазвичай зустрічалися на рівнях -1,3 мм / -1,4 мм від брегми. Слід зазначити, що частина цих нейронів розташовувалися дуже близько до вентральної поверхні мозку або контактували з його м'якою оболонкою. Поблизу порожнини третього шлуночка легко ідентифікувалися також і паравентрикулярні ядра гіпоталамуса, в яких були присутні значні скупчення НАДФ·Н-др нейронів. На відміну від супраоптичних ядер в Pa більшість складала малі (5-10 мкм) та середні (15-20 мкм) нейрони з менш інтенсивним забарвленням цитоплазми і з обмеженим забарвленням коротких дендритів, але іноді зустрічалися і великі інтенсивно забарвлені мультиполярні нейрони (діаметром 20-25 мкм).

Велика кількість таких NO-продукуючих нейронів спостерігалася і в латеральному гіпоталамусі. Характерною ознакою їх було дуже інтенсивне забарвлення дистальних відділів дендритів в вигляді густої сітки з синаптичними бляшками. Слід зазначити, що в латеральному та в паравентрикулярному ядрах на рівнях від -1,3 мм до -2,12 мм від брегми спостерігали ознаки зчеплення сом NO-продукуючих нейронів, що відносилися до вказаних типів, їх дендритів і аксоноподібних дуже тонких відростків та синаптичних бляшок з мікросудинами 25-70 мкм в діаметрі. Подібні нейро-судинні асоціації були раніше зареєстровані в моторній, сенсорній та лімбічній корі великих півкуль (Vlasenko O. V., 2008), а також в острівцях Калеха поблизу вентральної поверхні мозку (Пилявский А. И., 2007). Стінки мікросудин виявляли незначну та нерівномірну НАДФ·Н-др активність, очевидно за рахунок нерівномірного розташування ендотеліальної ізоформи NOS. Інтенсивність забарвлення судин в деякій мірі корелювала з їх діаметром; чим менший діаметр судин – тим меншою була інтенсивність забарвлення їх стінок.

На каудальних зрізах вентромедіального та дорзомедіального гіпоталамуса реєстрували велику кількість NO-продукуючих нейронів. Наприклад, у VMHD середня щільність таких клітин становила 765-830 одиниць, а в VMHV була ще більшою – 860-915 нейронів на тест-ділянку.

Середня щільність НАДФ·Н-др нейронів в ядрах гіпоталамуса на симетричних половинах мозку достовірно не розрізнялась. Необхідно зазначити, що незважаючи на значну топографічну гетерогенність локалізації NO-синтезуючих нейронів та високі значення їх середньої кількості в деяких

ядрах гіпоталамуса, статистично вірогідних відмінностей ( $p < 0,05$ ) щільностей в тих самих ядрах між групами інтактних тварин, щурів з високою харчовою мотивацією та щурів, які реалізовували оперантні їждобувні рухи, не спостерігалось.

Частина NO-синтезуючих нейронів демонстрували також і c-Fos-імунопозитивність. У контрольних тварин в ядрах гіпоталамуса на ростральних рівнях -1,3 / -1,8 мм від брегми кількість подвійно забарвлених нейронів була дуже низькою. У РаАР, LHD та SO спостерігали  $1,3 \pm 0,3$ ,  $0,6 \pm 0,2$  та  $1,9 \pm 0,4$  подвійно мічених клітин відповідно, а у LHV, АН та МРО таких одиниць не було взагалі. Найвищу середню кількість нейронів з подвійним забарвленням реєстрували на каудальних рівнях, причому тільки в VMHD і VMHV (середня щільність у цих ядрах дорівнювала  $8,5 \pm 1,1$  і  $5,5 \pm 1,2$  одиниць на тест-ділянку відповідно). У DMD та ТС подвійно забарвлених нейронів не реєстрували взагалі.

В групі тварин, що знаходилися в умовах відсторонення від їжі, основні фокуси активності спостерігалися в паравентрикулярному ядрі, де мічених НАДФ-Н-др клітин було більш ніж в три рази, більше ніж в контролі. В РаАР на рівні -2,12 мм від брегми середня щільність таких клітин складала  $12,9 \pm 1,1$  одиниць проти  $3,8 \pm 0,4$  у контрольній групі щурів. В латеральному гіпоталамусі також відмічали білатеральне зростання кількості активованих NO-синтезуючих нейронів.

Після здійснення щурами оперантних рухів для досягнення та захоплення їжі (група 3) середня щільність нейронів з подвійним забарвленням в РаАР та SO була значно більшою. В РаАР на рівнях -1,3 / -1,8 мм від брегми вона складала  $30,1 \pm 1,8$ , що майже на порядок перевищувало відповідні значення і в групі інтактних щурів ( $1,3 \pm 0,3$ ), і після відсторонення від їжі ( $4,7 \pm 0,6$ ). В SO після виконання щурами оперантних рухів спостерігали достовірне білатеральне збільшення кількості активованих NO-продукуючих нейронів, середня щільність яких становила  $6,8 \pm 0,7$ . Кількість подвійно забарвлених нейронів становила 68,7 % всіх c-Fos-іп нейронів. Специфікою каудальних рівнів було те, що після виконання рухів в DMD та ТС реєстрували подвійно забарвлені нейрони на відміну від груп 1 та 2, де такі одиниці у вказаних ядрах були відсутні. Середня щільність їх, проте, була невисокою, складаючи  $1,5 \pm 0,3$  одиниць в DMD та  $2,8 \pm 0,5$  в ТС.

Отже, виявлені ознаки активацій NO-синтезуючих нейронів в ядрах гіпоталамуса свідчить про активне залучення нейронів цього фенотипу до регуляції їждобувної поведінкової активності в зазначених фізіологічних станах.

*Експресія c-Fos у мигдалеподібному комплексі.* За сучасними уявленнями, які базуються на даних цитоархітекtonіки, хемоархітекtonіки і волоконних зв'язків, мигдалеподібний комплекс розділяють на три частини, або групи: (1) базолатеральну групу ядер, яка утворює вентромедіальне подовження найбільш глибокого шару кори і представлена латеральним, базальним та базомедіальним ядрами, (2) центромедіальну групу (центральне та медіальне ядра), яка являє

собою вентромедіальне подовження смугастого тіла, а також (3) поверхневу, або коркоподібну групу ядер, яка фактично є каудальною частиною нюхової кори (переднє та заднє кортикальні ядра) (Knapska E., 2007).

В інтактних тварин (група 1) в ядрах мигдалеподібного комплексу c-Fos-іп нейрони були локалізовані рівномірно по обидва боки від середньої лінії; середні їх щільності достовірно не розрізнялись. Експресія c-Fos в окремих частинах мигдалеподібного комплексу і на різних рівнях мозку (від -2,12 мм до -3,14 мм від брегми), була дуже різною. Так, в центромедіальній групі ядер середня кількість активованих нейронів знаходилася в межах від  $1,4 \pm 0,3$  до  $39,1 \pm 4,3$  одиниць, у базолатеральній групі – від  $5,1 \pm 0,5$  до  $21,6 \pm 1,8$ , а в коркоподібній групі – від  $17,5 \pm 1,3$  до  $54,8 \pm 3,4$  одиниць.

Після триденного голодування у щурів групи 2 щільність c-Fos-іп нейронів в окремих структурах мигдалеподібного комплексу була достовірно вищою ніж у контролі. Таке збільшення c-Fos-імунореактивності відмічалось у MeAD (на всіх рівнях) та ACo (на ростральному і середньому рівнях від брегми). Відмітимо, що на рівні -2,12 мм в передньому кортикальному ядрі була зареєстрована дуже велика кількість активованих нейронів ( $83,7 \pm 5,1$  одиниць), а в MeAD на цьому рівні реєстрували в середньому  $39,5 \pm 5,3$  мічених нейронів, що достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищувало і контрольні значення, і такі після реалізації їждобувних рухів. Достовірно більша кількість мічених нейронів була виявлена також у прилеглих до мигдалеподібного комплексу структурах (AStr, B, SI та BSTIA) та інсулярній корі. Натомість, у під'ядрах центрального ядра (CeC, CeL та CeM) спостерігалася достовірно менша ( $p < 0,05$ ) кількість активованих нейронів, ніж у контролі. В Ce реєстрували дуже незначну щільність ( $1,2 \pm 0,3$  мічених нейронів на зріз).

У щурів групи 3 (після реалізації їждобувних рухів) більш інтенсивна c-Fos-імунореактивність спостерігалася білатерально у центральному (на всіх рівнях) і базолатеральному (на ростральному і середньому рівнях) ядрах мигдалеподібного комплексу. При цьому, основні фокуси локалізації активованих нейронів у центральному ядрі мигдалеподібного тіла були зареєстровані в його латеральній частині (CeL) на рівнях -2,12 мм і -2,56 мм від брегми ( $42,3 \pm 2,5$  та  $58,5 \pm 1,9$  c-Fos-іп нейронів, відповідно), що майже на порядок більше ніж у контролі. Відомо, що центральне ядро має тісні двобічні зв'язки з автономними центрами довгастого мозку (Saha S., 2005) та нейросекреторними ядрами гіпоталамуса (Swanson L. W., 1998) і є важливою лімбічною структурою переднього мозку, яка причетна до генерації кардіоваскулярних, респіраторних і вісцеральних реакцій, під час формування та реалізації цілеспрямованих рухів у тварин (що підтверджують і наші результати). Додатково відмітимо, що у задніх суб'ядрах кортикальної групи ядер мигдалеподібного комплексу виявлялося достовірно іпсилатеральне (відносно робочої передньої кінцівки) домінування мічених клітин на середньому та каудальному рівнях, а максимальна кількість c-Fos-іп нейронів була зареєстрована в PLCo на рівні -2,56 мм ( $49,1 \pm 5,9$  одиниць).

*НАДФ·Н-діафоразна активність у структурах мигдалеподібного комплексу.* Позитивні NO-продукуючі нейрони спостерігалися у всіх трьох частинах мигдалеподібного комплексу, а їх середня кількість у даних структурах у тварин усіх досліджуваних груп достовірно не розрізнялася. У MePV і CeM спостерігалися тільки слабо забарвлені реактивні клітини малого розміру (близько 10–15 мкм у діаметрі). В MeAD, ACo та BMA серед дрібних клітин реєстрували також поодинокі інтенсивно забарвлені NO-продукуючі нейрони досить великих розмірів (близько 20–25 мкм у діаметрі). Звертало на себе увагу те, що у латеральній і капсулярній частинах центрального ядра мигдалеподібного комплексу NO-продукуючі нейрони були майже відсутні.

В даному дослідженні були також зареєстровані нейрони з подвійним забарвленням (c-Fos-іп + НАДФ·Н-др). Такі нейрони виявлялися в MePV/BAOT (< 5 одиниць на зріз), VL (< 3 клітин), ACo (< 3 одиниць). Середні кількості NO-продукуючих нейронів та подвійно забарвлених нейронів у всіх трьох досліджуваних групах достовірно не розрізнялись, що вказує на приблизно однаковий рівень активності у відповідних нейронних мережах не залежно від тестованих функціональних станів.

Узагальнюючи результати дисертаційної роботи, можна стверджувати, що в умовах харчової депривації відбувається білатеральна активація нейронних систем не лише в ядрах латерального гіпоталамуса (так званих класичних центрах голоду), а також в ділянках переднього гіпоталамуса і медіальній (міллоклітинній) частині паравентрикулярних ядер. Поряд з цим існують достовірні ознаки пригнічення активності нейронів у вентромедіальних ядрах гіпоталамуса, так званому центрі насичення.

Під час реалізації шурами їждобувної поведінкової діяльності відбувається значна зміна функціонального стану вегетативних та лімбічних центрів переднього мозку щурів. Спостерігається активація нейронних систем не тільки в нейросекреторних центрах (супраоптичних та паравентрикулярних ядрах), а й у дорсомедіальному та медіальному преоптичному ядрах гіпоталамуса. Особливістю функціонування нейронних систем мигдалеподібного комплексу виявилось те, що частина ядер активувалась двобічно (наприклад, латеральні частини центрального ядра). У той же час нейрони задньої частини кортикальних ядер мигдалеподібного комплексу активувались лише іпсилатерально (відносно робочої кінцівки). Це розглядається як доказ причетності структури до контролю моторного компоненту їждобувної поведінки.

Виявилися також залученими до згаданого контролю і мережі NO-продукуючих нейронів гіпоталамуса. Встановлено наявність численних нейросудинних асоціацій нейронів цього фенотипу, що свідчить про причетність таких клітин до регуляції місцевого кровотоку. Значна ж активація NO-продукуючих нейронів у супраоптичних та паравентрикулярних ядрах гіпоталамуса вказує на їх активну участь у реалізації їждобувної діяльності.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено вирішення наукового завдання, яке полягало у виявленні патернів функціональної активації нейронних систем в ядрах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу, що пов'язані з реалізацією оперантної їждобувної поведінки; встановлено також причетність NO-продукуючих нейронів до контролю такої поведінки.

1. Виміри інтенсивності експресії білка c-Fos в згаданих структурах мозку щурів свідчать, що в умовах харчової депривації достовірно найвищий ( $p < 0,05$ ) рівень активації нейронів спостерігається в під'ядрах латерального гіпоталамуса ( $15,5 \pm 0,9$  мічених нейронів на тест-зону у дорзальній та  $13,2 \pm 1,8$  у вентральній частині ядра), що майже втричі та 1,8 рази більше у порівнянні з інтактними тваринами та на 32 і 45 % більше ніж рівні експресії у щурів, які реалізовували оперантні рефлексивні поведінки, відповідно. Достовірно вища ( $p < 0,05$ ) інтенсивність експресії білка c-Fos у щурів з високою харчовою мотивацією спостерігалася також у передньому гіпоталамусі та в медіальній частині паравентрикулярного ядра (у порівнянні як з контролем, так і з патерном після реалізації оперантних рухів). У вентромедіальних же гіпоталамічних ядрах, і після голодування, і після тренування щурів кількість c-Fos-імунопозитивних нейронів була достовірно нижчою ( $p < 0,05$ ) порівняно з фоновими значеннями. Нейронні мережі латерального, переднього гіпоталамуса та медіальної частини паравентрикулярного ядра мають особливе відношення до формування стану харчової мотивації.

2. Виконання оперантних їждобувних рухів асоціювалося з найвищим ступенем активації нейронів в супраоптичному ядрі, передній частині паравентрикулярного ядра, медіальному преоптичному ядрі, а також у дорзомедіальному гіпоталамусі. В цих структурах реєстрували достовірно вищі ( $p < 0,05$ ) рівні експресії білка c-Fos у нейронах, ніж у контролі та в умовах харчової депривації. В передній частині паравентрикулярного ядра і супраоптичному ядрі гіпоталамуса кількість активованих нейронів під час реалізації оперантного рефлексивного поведінки перевищувала значення, що відмічалися в контролі та в стані високої харчової мотивації, у 5-10 разів ( $p < 0,05$ ). Це вказує на безпосередню причетність нейронних систем вказаних структур гіпоталамусу саме до забезпечення моторного компонента програми оперантного їждобувного рефлексивного поведінки.

3. Серед NO-продукуючих нейронів гіпоталамуса у паравентрикулярному та латеральному ядрах виявлені нейрони, які мають прямі контакти з мікросудинами, що свідчить про залучення їх у регуляцію місцевого кровотоку. Істотна кількість подвійно забарвлених (c-Fos-іп та НАДФ·Н-др) нейронів у гіпоталамусі щурів, які реалізують їждобувну активність, спостерігалася в супраоптичному та паравентрикулярному ядрах. Це свідчить про активне залучення NO-синтезуючих нейронів до участі у їждобувній руховій поведінці.

4. Виконання оперантних їждобувних рухів було пов'язане з достовірним зростанням кількості активованих нейронів в ядрах



мигдалеподібного комплексу. Найбільшу білатеральну інтенсивність експресії білка c-Fos реєстрували в суб'ядрах центральних ядер та в базолатеральних ядрах. Основний фокус локалізації c-Fos-імунопозитивності знаходився в латеральній частині центрального ядра ( $58,5 \pm 1,9$  мічених нейронів на рівні  $-2,56$  мм від брегми;  $p < 0,05$ ). Встановлено переважну іпсилатеральність активації в задній частині кортикальних ядер ( $49,1 \pm 5,9$  проти  $22,1 \pm 1,4$  одиниць в контролі;  $p < 0,05$ ).

5. Специфіка розподілу та активації NO-продукуючих нейронів у структурах мигдалеподібного комплексу у щурів трьох експериментальних груп (інтактних, у стані високої харчової депривації та тих, що реалізовували оперантні їжодобувні рухи) була досить помірною (різниці не досягали рівня вірогідності). Отже, залучення NO-продукуючої нейронної мережі мигдалеподібного комплексу у автономний контроль суттєво не залежить від функціонального стану тварини в рамках використаної експериментальної моделі.

6. Результати аналізу розподілу активованих нейронів у щурів трьох експериментальних груп дають підстави вважати, що нейронні мережі медіальної частини паравентрикулярного ядра, переднього та латерального гіпоталамуса, а також центральні та базолатеральні ядра мигдалеподібного комплексу мають відношення до формування стану харчової мотивації і є компонентами мотиваційно-афективного центру їжодобувної поведінки. Передня ж частина паравентрикулярного ядра, супраоптичне, медіальне преоптичне і дорзомедіальне ядра гіпоталамуса, а також задня частина кортикальних ядер мигдалеподібного комплексу залучені до моторного компоненту програми оперантного їжодобувного рефлексу.

### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. NADPH-diaphorase reactivity and neurovascular coupling in the basal forebrain and motor cortex / O. V. Vlasenko, O. V. Dovgan', V. A. Maisky, V. A. Maznychenko, A. I. Pilyavskii // *Нейрофізіологія / Neurophysiology*. – 2007. – Т. 39, № 4/5. – С. 405-407. *(Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувач провів експериментальні дослідження, статистичну обробку результатів, приймав участь у написанні статті, належать результати стосовно базальних структур переднього мозку)*

2. Дослідження НАДФ·Н-діафоразної активності та нейросудинного зчеплення в лімбічних структурах базального переднього мозку і гіпоталамусі / О. В. Довгань, В.О. Майський, О.І. Пилявський, А.В. Мазниченко // *Фізіологічний журнал*. – 2007. – Т. 53, №5. – С. 35-46. *(Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувачу належить ідея роботи, пошук і аналіз літературних джерел, статистична обробка результатів, провів написання статті, формулювання висновків, приймав участь у проведенні експерименту)*

3. Власенко О. В. Експресія c-fos як показник функціональної взаємодії фронтальної кори і лімбічних структур головного мозку під час їжодобувних

стереотипних рухів у щурів / О. В. Власенко, О. В. Довгань // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2008. – Т. 40, № 3. – С. 256-259. (Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувач провів аналіз літератури та написання тексту статті, технічне оформлення роботи, приймав участь в проведенні експериментальних досліджень, обробці результатів дослідження, належать результати стосовно лімбічних структур переднього мозку).

4. Топографія Fos-імунореактивних та НАДФ·Н-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. (Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувачу належать результати стосовно гіпоталамуса, приймав участь в експериментальних дослідженнях та обробці отриманих результатів).

5. Зміни експресії *c-fos* та НАДФ·Н-діафоразної активності в структурах гіпоталамуса щурів, пов'язані з харчовою деривацією та реалізацією оперантних їжодобувних рухів / О. В. Власенко, О. В. Довгань, О. І. Пілявський, В. О. Майський, А. В. Мазниченко // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2009. – Т. 41, № 2. – С. 173-182. (Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувач провів експериментальні дослідження, статистичну обробку результатів, належить технічне оформлення роботи).

6. Оперантні рефлекси и експрессия гена *c-fos* в ядрах миндалины и инсулярной коре крыс / А. В. Довгань, О. В. Власенко, А. В. Мазниченко, А. И. Пилявский, В. А. Майский // *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2011. – Т. 41, № 3. – С. 277-280. (Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувач виконував експериментальну частину дослідження та редакційне оформлення роботи, належать результати стосовно мигдалеподібного комплексу).

7. Зміни експресії гена *c-fos* в ядрах мигдалеподібного тіла та частоти серцевих скорочень при реалізації їжодобувних стереотипних рухів у щурів О. В. Довгань, О. В. Власенко, Т. В. Бузика, В. О. Майський, О. І. Пілявський, А. В. Мазниченко // *Фізіологічний журнал*. – 2012. – Т. 58, № 5. – С. 46-57. (Видання включено до міжнародних наукометричних баз; здобувач виконував експериментальну частину роботи, провів аналіз і узагальнення результатів досліджень, належить результати стосовно мигдалеподібного комплексу).

8. Food-Procuring Stereotype Movements is Accompanied by Changes of *c-fos* Gene Expression in the Amygdala and Modulation of Heart Rate in Rats / О. В. Довгань, О. В. Власенко, І. Л. Рокунетс // *International Journal of Physiology and Pathophysiology*. – 2013. – V. 4, N 2. – P. 157-170. (Здобувач виконував експериментальну частину роботи, провів аналіз і узагальнення результатів досліджень, приймав участь у технічному оформленні роботи, належить результати стосовно мигдалеподібного комплексу).

9. Activity of cerebrum structures neurons during organization and realization of stereotypic movements / V. M. Moroz, M. V. Yoltukhivskyy, O. V. Vlasenko, I. L. Rokunets, V. V. Chechel, O. D. Omelchenko, O. V. Dovgan // *Acta Physiologica. – Abstr. of Joint Meeting of the Federat. Europ. Physiolog. Societies. – 2006. – V. 186, Suppl. 1. – P. 246. (Здобувач приймав участь в експериментальній частині роботи, провів аналіз результатів дослідження).*

10. Активність нейронів кори та підкіркових структур мозку при підготовці та виконанні рухів / О. В. Власенко, В. М. Мороз, М. В. Йолтухівський, І. Л. Рокунець, В. В. Чечель, О. Д. Омельченко, О. В. Довгань // *Фізіологічний журнал: Матер. XVII з'їзду Українськ. фізіол. товариства. – 2006. – Т. 52, № 2, – С. 27. (Здобувач виконував експериментальну частину та статистичну обробку результатів, провів аналіз результатів дослідження).*

11. Закономерности взаимодействия структур головного мозга при управлении произвольными движениями / В. М. Мороз, М. В. Йолтухівський, О. В. Власенко, О. В. Довгань, Я. В. Кузьминский, І. Л. Рокунець, В. В. Чечель // *Науч. труды II съезда физиологов СНГ. – Москва : Медицина-Здоровье, 2008.- С. 175. (Здобувач приймав участь в експериментальній частині та провів аналіз результатів дослідження).*

12. Експресія *c-fos* та НАДФ-Н-діафоразна реактивність, як показники функціональної причетності ядер мигдалеподібного тіла під час реалізації їждобувних рухів у щурів / О. В. Довгань, Д. П. Слободянюк, Ю. Ю. Шушковська, Д. О. Цирульник // *Матеріали VI Міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених “Сьогодні та майбутнє медицини». — Вінниця, 2009. — С. 47. (Здобувачу належить ідея роботи, приймав участь в експериментальній частині, надавав консультативну допомогу в узагальненні результатів досліджень, написав текст).*

13. Довгань О. В. Експресія *c-fos* та НАДФ-Н-діафоразна реактивність в ядрах гіпоталамуса під час виконання оперантних їждобувних рухів у щурів / О. В. Довгань // *Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. XI, №3 (41), Ч.1. – С. 208;*

### АНОТАЦІЯ

Довгань О.В. Функціональна активність нейронів гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу під час реалізації їждобувних рухів у щурів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.03 – нормальна фізіологія. – Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України. – Вінниця, 2014.

Дисертація присвячена дослідженню активності нейронних систем за допомогою експресії ядерного білка *c-Fos* у різних структурах гіпоталамуса та мигдалеподібного комплексу в нормі, за умов харчової депривації та після реалізації мотивованих оперантних їждобувних рухів.

Встановлено, що під час реалізації щурами їждобувної поведінкової активності відбувається достовірне білатеральне підвищення *c-Fos* експресії в нейросекреторних ядрах гіпоталамуса та в центральних і базолатеральних

ядрах мигдалеподібного комплексу. Проведений детальний топографічний аналіз NO-синтазної нейронної мережі у досліджених лімбічних структурах переднього мозку щурів. Показана значна активація NO-продукуючих нейронів в структурах гіпоталамуса щурів під час виконання цілеспрямованих рухів, що свідчить про залучення цього фенотипу нейронів до контролю їждобувної рухової поведінкової активності.

Ключові слова: оперантний рефлекс, гіпоталамус, мигдалеподібний комплекс, c-Fos експресія, оксид азоту, щури.

### АННОТАЦІЯ

Довгань А. В. Функциональная активность нейронов гипоталамуса и миндалевидного комплекса при реализации пищедобывательных движений у крыс. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – нормальная физиология. – Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова МЗ Украины. – Винница, 2014.

Диссертация посвящена исследованию активности нейронных систем с помощью экспрессии ядерного белка c-Fos в различных структурах гипоталамуса и миндалевидного комплекса в норме, в условиях пищевой депривации и после реализации мотивированных голодом оперантных пищедобывательных движений, а также причастности NO-продуцирующих нейронов к контролю оперантной пищедобывательной поведенческой активности крыс.

С помощью иммуногистохимической визуализации экспрессии ядерного белка c-Fos (продукта *c-fos* гена, как маркера нейронной активации) установлено, что в различных гипоталамических ядрах контрольной группы животных уровень средней плотности активных нейронов был относительно невысоким. В условиях пищевой депривации наблюдали значительный статистически достоверный ( $p < 0,05$ ) более высокий уровень плотности экспрессии белка c-Fos в подядрах латерального гипоталамуса  $15,5 \pm 0,9$  меченых нейронов в дорзальной части и  $13,2 \pm 1,8$  – в вентральной части ядра, по сравнению, как с контрольными значениями ( $5,3 \pm 0,4$  и  $7,2 \pm 0,6$  меченых нейронов соответственно), так и с уровнем экспрессии у крыс, реализующих оперантные рефлекс (  $11,7 \pm 0,8$  и  $9,1 \pm 1,1$  меченых нейронов соответственно). Достоверно ( $p < 0,05$  ) более высокую активность экспрессии белка c-Fos у крыс с высокой пищевой мотивацией отмечали также в переднем гипоталамусе и в медиальной части паравентрикулярного ядра на уровне -2,12 мм от брегмы по сравнению и с контрольными крысами, и после реализации оперантных рефлексов. Напротив в вентромедиальных гипоталамических ядрах, и во время голодания, и во время тренировки крыс регистрировали более низкий статистически достоверный уровень активности c-Fos-иммуноположительных нейронов ( $p < 0,05$ ) по сравнению с фоновыми значениями. При выполнении оперантных пищедобывательных движений высокие значения активности

нейронов регистрировали в супраоптических ядрах, в передней части паравентрикулярного ядра и медиальном преоптической ядре на уровнях -1,3 / -1,8 мм, а также в дорзомедиальном гипоталамусе на уровнях -2,3 / -2,8 мм от брегмы. В этих структурах регистрировали статистически достоверные ( $p < 0,05$ ) различия экспрессии белка c-Fos и от контрольных значений, и от показателей у крыс которые находились в условиях пищевой депривации. Причем, и в передней части паравентрикулярного ядра, и в супраоптическом ядре гипоталамуса (которые относят к нейросекреторным ядрам) количество активированных нейронов во время реализации оперантного пищедобывательного рефлекса превышали более чем в 5-10 раз контрольные значения у крыс с высокой пищевой мотивацией ( $p < 0,05$ ), что указывает на непосредственное участие этих нейронных систем именно к моторному компоненту программы оперантных пищедобывательных рефлексов. Среди нейронов гипоталамуса были обнаружены нейроны, которые синтезируют оксид азота: в паравентрикулярном и латеральном гипоталамических ядрах на уровнях от -1,3 мм до -2,12 мм от брегмы часть этих нейронов имеет прямые контакты тел, их дендритов и аксоно-подобных варикозных отростков с синаптическими бляшками на терминалях с микрососудами 25-70 мкм в диаметре. Наличие в этих нейронах экспрессии белка c-Fos во время реализации оперантных рефлексов свидетельствует о активном вовлечении их в регуляцию местного кровотока. Большое количество нейронов с двойным окрашиванием в гипоталамусе крыс, которые реализуют пищедобывательную активность, обнаружены в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса, 68,7 % этой популяции среди общего количества c-Fos-имунноположительных нейронов, свидетельствует о вовлечении сети NO-продуцирующих нейронов к контролю пищедобывательной двигательной поведенческой активности.

Установлено, что во время выполнения оперантных пищедобывательных движений происходило достоверное увеличение активности нейронов и в ядрах миндалевидного комплекса. Наибольшее количество экспрессии белка c-Fos регистрировали билатерально в субъядрах центрального ядра на всех уровнях и в базолатеральном ядре миндалевидного комплекса на ростральном и каудальном уровнях от брегмы. Основной фокус локализации находился в латеральной части центрального ядра (CeL) миндалевидного комплекса ( $58,5 \pm 1,9$  меченых нейронов на уровне -2,56 мм ( $p < 0,05$ )). Это позволяет рассматривать центральные и базолатеральные ядра миндалевидного комплекса, как мотивационно-аффективный центр, при реализации крысами пищедобывательных движений. Количественный и топографический анализ распределения NO-продуцирующих нейронов в структурах миндалевидного комплекса не выявил достоверных различий между тремя группами крыс: интактных, таких, которые находились в состоянии высокой пищевой мотивации и тех, которые реализовывали оперантные пищедобывательные движения. Также не выявлено четких вероятных ( $p > 0,05$ ) признаков различия активации NO-продуцирующей нейронной сети миндалевидного комплекса

различных экспериментальных групп, что указывает на приблизительно одинаковый уровень ее активности в условиях исследованных функциональных состояний.

Ключевые слова: оперантный рефлекс, гипоталамус, миндалевидный комплекс, c-Fos экспрессия, оксид азота, крысы.

### SUMMARY

Dovgan O.V. Functional Activity of Neurons of the Hypothalamus and Amygdala during Realization of Food-Getting Movements in Rats. - The manuscript.

Dissertation to obtain a scientific degree of the Candidate of Medical Sciences in specialty 14.03.03 – Normal Physiology. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya of Ministry of Health of Ukraine. Vinnytsya, 2014.

The dissertation covers the investigation of the neuron systems activity by expression of c-Fos nuclear protein in different structures of the hypothalamus and amygdala in norm, under food deprivation and after realization of the motivated operant food-getting movements.

It was revealed a reliable bilateral increase of c-Fos expression in the hypothalamic neurosecretory nuclei as well as in the central and basolateral nuclei of the amygdala during the food-getting behavioral activity realization by rats. The detailed topographical analysis of NO-synthase neural network in the examined limbic structures of the rats' neocortex was performed. It was shown the considerable activation of NO-synthase neurons in the hypothalamic structures of rats during the goal-directed movements realization that indicates the involvement of these neurons into the control of the food-getting motor behavioral activity.

Key words: operant reflex, hypothalamus, amygdala, c-Fos expression, nitric oxide, rats.

### СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АСо – переднє кортикальне ядро мигдалеподібного комплексу

BL – базолатеральне ядро мигдалеподібного комплексу;

ВМА – базомедіальне ядро мигдалеподібного комплексу, передня частина;

СеС – центральне ядро мигдалеподібного комплексу, капсулярна частина;

СеL – центральне ядро мигдалеподібного тіла комплексу, латеральна ділянка;

СеМ – центральне ядро мигдалеподібного комплексу, медіальна ділянка;

c-Fos-іп нейрон – нейрон, імунопозитивний на наявність білка c-Fos

DMD – дорзомедіальне ядро гіпоталамуса

LHD – латеральний гіпоталамус, дорзальна частина

LHV – латеральний гіпоталамус, вентральна частина

MeAD – медіальне ядро мигдалеподібного комплексу, антеріодорсальна частина;

MePV – медіальне ядро мигдалеподібного комплексу, постеріовентральна частина;

NO – оксид азоту;

PaAP – паравентрикулярне ядро гіпоталамуса, передня частина;

SO – супраоптичне ядро гіпоталамуса;

VMHD – ветромедіальне ядро гіпоталамуса, дорзальна частина

VMHV – ветромедіальне ядро гіпоталамуса, вентральна частина

НАДФ·Н – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат·Н

---

Підписано до друку 18.04.2014 р. Замовл. № 117.  
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,9. Друк офсетний.  
Тираж 100 примірників.

---

Вінниця. Друкарня ВНМУ ім. М.І.Пирогова, Пирогова, 56.