

РОЛЬ АЦЕТИЛХОЛИНА В МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ НЕОКОРТЕКСА БОДРСТВУЮЩЕГО ЖИВОТНОГО ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА

Поступила 10.03.09

Исследованы модулирующие влияния холинергической системы на активность нейронов сенсомоторной коры, связанную с осуществлением инструментального условного рефлекса постановки лапы на опору. Опыты были выполнены на бодрствующих кошках; для внеклеточного отведения импульсной активности нейронов сенсомоторной коры и ионофоретической аппликации синаптически активных веществ в область отведения использовали многоканальный стеклянный микроэлектрод. Регистрировали фоновую и вызванную активность нейрона в ходе выполнения условнорефлекторного движения, а затем ее изменения при аппликации синаптически активных веществ. Аппликации ацетилхолина и карбахола вызвали повышение интенсивности импульсных реакций нейронов неокортекса, вызванных предъявлением звукового сигнала, с одновременным сокращением латентного периода (ЛП) ответа. Сходное влияние на вызванную активность нейронов сенсомоторной коры оказывал и агонист мускариновых рецепторов пилокарпин. Блокаторы мускариновых рецепторов атропин и скополамин, наоборот, резко угнетали интенсивность импульсных реакций нейронов коры на афферентную стимуляцию и одновременно достоверно увеличивали их ЛП. Аппликация агониста никотиновых рецепторов никотина сопровождалась угнетением импульсных ответов нейронов, увеличением ЛП нейронных реакций на предъявление звукового сигнала и соответствующим увеличением ЛП условнорефлекторной двигательной реакции. Аппликация антагониста никотиновых рецепторов тубокурарина, наоборот, способствовала значительному усилению импульсных реакций нейронов и укорочению их ЛП. Обсуждаются механизмы влияния агонистов и антагонистов мембранных мускариновых и никотиновых холинорецепторов и роль активации этих рецепторов в модуляции активности пирамидных и непиримидных нейронов неокортекса, связанной с реализацией инструментального двигательного рефлекса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бодрствующие животные, инструментальный условный рефлекс, нейронная импульсная активность, сенсомоторная кора, ацетилхолин, агонисты, антагонисты, холинорецепторы.

ВВЕДЕНИЕ

Роль ацетилхолина (АХ) в работе ЦНС привлекает внимание многочисленных исследователей, поскольку активность холинергических нейронных систем тесно связана с реализацией различных ментальных функций. Именно эти функции с возрастом, а также при некоторых нейродегенеративных заболеваниях (как, например, болезнь Альц-

геймера) значительно нарушаются. Результаты физиологических и фармакологических исследований показывают, что наиболее общим эффектом влияния АХ является облегчение активности пирамидных нейронов неокортекса. Возбуждающее действие АХ, как считают, опосредуется связыванием его с мускариновыми и никотиновыми рецепторами на мембранах пирамидных и, главным образом, непиримидных нейронов коры.

АХ представляет собой необходимый и критически важный для нормального протекания процессов обучения и памяти медиатор. Развитие дефицита памяти и ухудшение способности к обучению,

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: torvik@biph.kiev.ua (В. М. Сторожук).

как правило, происходят на фоне снижения интенсивности холинергических влияний в коре головного мозга. Доказательством роли АХ в обеспечении когнитивных процессов, в частности, служат следующие факты. Введение антагонистов мускариновых холинорецепторов ухудшает память у животных и человека, а активация этих рецепторов, наоборот, облегчает процессы индукции продолжительной синаптической пластичности, служащие физиологическим субстратом обучения и памяти. В обеспечении сенсорно-когнитивной функции активное участие принимают и никотиновые холинорецепторы. Именно эти рецепторы опосредуют эффекты холинергических влияний в отношении процессов внимания и реализации когнитивных функций и обеспечивают последовательную активацию элементов нейронных цепей во время прохождения по ним сенсорной информации. Так, например, известно, что у пациентов, страдающих шизофренией, наблюдается ненормальное распределение никотиновых рецепторов, особенно включающих в себя $\alpha 7$ - и $\alpha 4\beta 2$ -субъединицы. Полагают, что именно дефицит $\alpha 7$ -рецепторов в коре является важным фактором, причастным к развитию шизофрении.

Как свидетельствуют многочисленные литературные источники, механизмы влияния АХ на холиноцептивные нейроны коры весьма сложны. В частности, АХ вызывает относительно продолжительное подавление калиевой проводимости, что делает корковые холиноцептивные нейроны более чувствительными к действию других возбуждающих входов. Необходимо отметить, что влияние АХ на нейроны коры может быть и тормозным, реализуясь или непосредственно, или через ГАМК-эргические интернейроны. Так, еще в работе Раевского и соавт. [1] было показано, что холинергическая система переднего мозга активирует ГАМК-эргические нейроны неокортекса. Это приводит к селективному торможению нейронных реакций коры, вызванных сенсорной стимуляцией, причем без влияния на фоновую активность кортикальных клеток. Активация мускариновых М1-, М3- и М5-рецепторов интенсифицирует активность фосфолипазы С и протеинкиназы, что обуславливает увеличение внутриклеточных концентраций инозитолтрифосфата и Ca^{2+} . Активация мускариновых М2- и М4-рецепторов негативно коррелирует с активностью аденилатциклазы.

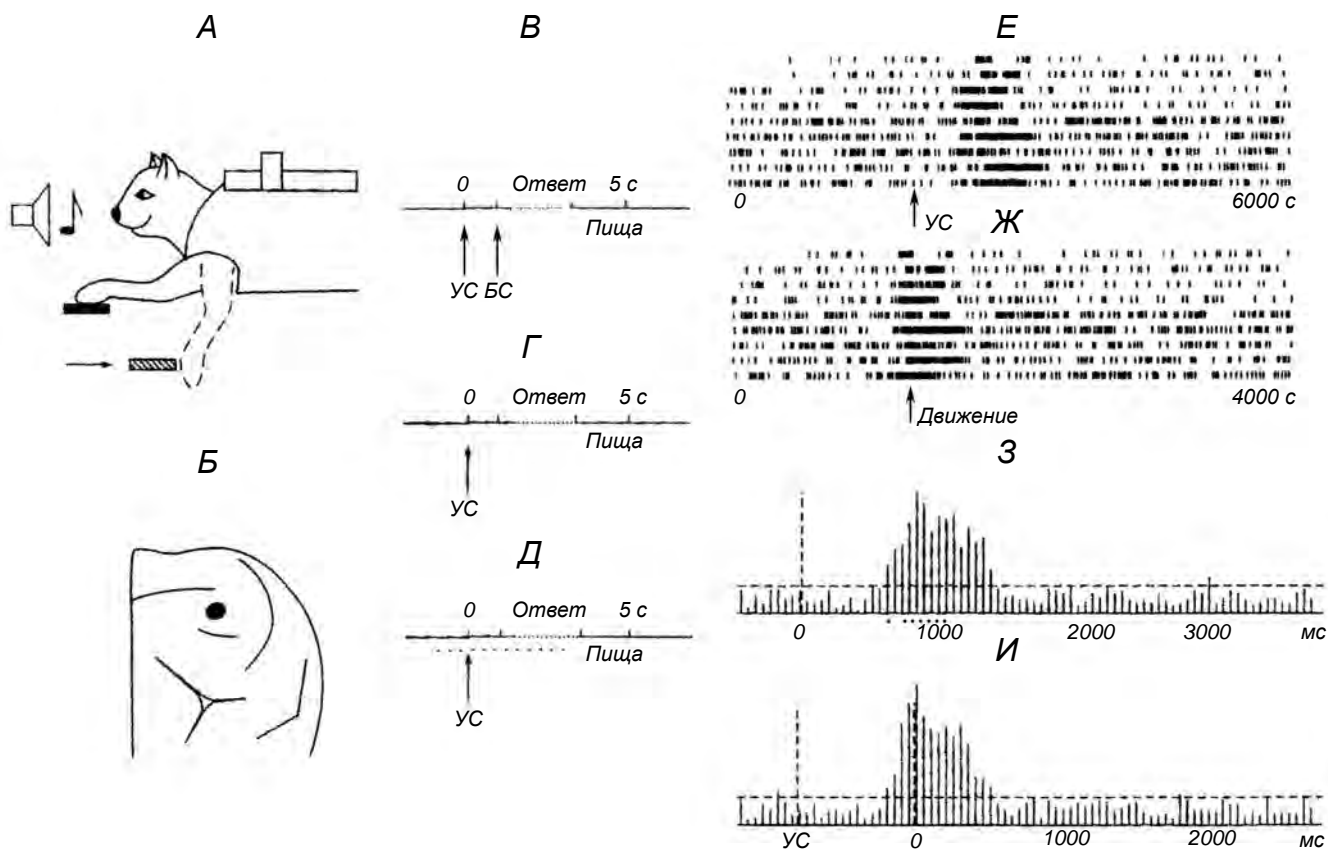
В целом можно резюмировать, что ввиду достаточно высокой плотности холинергических синап-

сов в ряде структур мозга холинергическая передача имеет решающее значение для реализации многих функций ЦНС. Ее участие существенно для реализации сенсорной перцепции, моторной функции, когнитивных процессов, памяти, внимания, обучения, процессов, связанных со сном, формирования мотиваций. Как уже указывалось, нарушения холинергической передачи наблюдаются при развитии ряда психических заболеваний. Попытки детально оценить роль нейромодуляторов, в том числе АХ, в работе неокортекса были в свое время предприняты Гю [2] и рядом других исследователей.

Мы полагаем, что адекватное описание влияния тех или иных фармакологических веществ на активность нейронов коры головного мозга невозможно без проведения опытов в условиях, максимально приближенных к нормальному функциональному состоянию, во время выполнения подопытным животным определенной реальной физиологической функции. Соответствующие экспериментальные подходы не следует ограничивать опытами на наркотизированных животных или переживающих срезах мозга, как это делается во многих случаях. Цель наших исследований состояла в том, чтобы оценить роль воздействия АХ, агонистов и антагонистов мускариновых и никотиновых рецепторов нейронов сенсомоторной коры в реальных физиологических условиях – на животных во время выполнения ими инструментального (оперантного) условного рефлекса.

МЕТОДИКА

Наши эксперименты были проведены на 11 бодрствующих кошках с предварительно выработанным у них условным инструментальным рефлексом постановки лапы на опору. Методика подобных исследований была детально описана нами ранее [3] (рис. 1). Животные обучались в ответ на предъявление акустического сигнала (звуковой щелчок интенсивностью порядка 50 дБ над порогом слышимости у человека) осуществлять правой передней конечностью постановочное движение с последующим пищевым подкреплением. У обученных животных под нембуталовым наркозом над зоной будущего отведения импульсной активности нейронов сенсомоторной коры производили трепанацию черепа и фиксировали в трепанационном отверстии металлическую втулку, к которой во время



Р и с. 1. Схема выработки инструментального условного рефлекса, регистрации импульсной активности кортикальных нейронов и начального анализа экспериментального материала.

А – положение животного в гамаке при выработке условного рефлекса и во время проведения эксперимента. *Б* – локализация области отведения импульсной активности нейронов в сенсомоторной коре. *В* – очередность подачи условного (*УС*) и безусловного (*БС*) стимулов и пищевого подкрепления во время обучения. *Г* – соотношение времени реализации условнорефлекторного инструментального движения и подачи подкрепления. *Д* – соотношение времени микроионофоретической аппликации тест-веществ (обозначено пунктирной линией) и инструментального движения. *Е* – растровые диаграммы реализаций, построенные относительно момента начала движения (обозначено стрелкой) и дающие возможность определить временные соотношения импульсной реакции конкретного нейрона и начала условнорефлекторного инструментального движения. *Ж* – растровые диаграммы реализаций, построенные относительно момента начала движения (обозначено стрелкой) и дающие возможность определить временные соотношения импульсной реакции конкретного нейрона и начала условнорефлекторного инструментального движения. *З* – пример перистимульной гистограммы (ПСГ), построенной относительно момента предъявления звукового стимула. Ширина бина 50 мс. Пунктиром отмечено время аппликации вещества-анализатора. *И* – аналог ПСГ, построенный относительно момента начала движения.

Р и с. 1. Схема вироблення інструментального умовного рефлексу, реєстрації імпульсної активності кортикальних нейронів і початкового аналізу експериментального матеріалу.

эксперимента можно было крепить миниатюрный микроманипулятор с микроэлектродом. В опытах использовали трехканальные стеклянные микроэлектроды. Один из каналов микроэлектрода заполнялся раствором NaCl (3.0 М); он имел сопротивление 5–7 МОм и служил для внеклеточного отведения импульсной активности отдельных корковых нейронов. Два другие канала микроэлектрода заполняли растворами синаптически активных веществ и использовали для ионофоретической аппликации, обеспечивающей специфическое вли-

яние на нейрон, активность которого отводили. В экспериментах для ионофореза применяли растворы АХ, карбахолина (КХ), атропина, скополамина, пилокарпина, никотина, гексаметония, тубокурарина, ГАМК, бичукуллина и ряда других веществ. Для предотвращения утечки веществ через каналы для фореза пропускался постоянный запирающий ток 5–10 нА необходимого направления. Для ионофореза применяли токи порядка 10–20 нА относительно нулевого уровня. Анализировали особенности импульсной активности исследуемого

нейрона, генерируемой в ответ на предъявление условного стимула при реализации условного рефлекса. Импульсную активность нейрона отводили в контроле, а затем ее изменения регистрировали в условиях ионофоретической аппликации синаптически активных веществ. Для анализа строили гистограммы двух типов – перистимульные гистограммы (ПСГ) импульсной активности нейрона с накоплением потенциалов действия (ПД) относительно момента предъявления звукового сигнала, обеспечивающего инициацию инструментального движения, и гистограммы тех же записей, но построенные относительно момента начала условно-рефлекторного движения (регистрируемого согласно сигналу от механодатчика, фиксированного над *m. biceps brachii*). Это позволяло оценить, насколько импульсная реакция нейрона опережает начало движения, и ответить с достаточной степенью уверенности на вопрос о том, принадлежит ли исследуемый нейрон к нейронам пирамидного тракта или нет. Как правило, для построения гистограмм накапливали по 10 реализаций активности нейрона в тех или иных условиях с интервалами между реализациями 50–60 с и интервалами между сериями реализаций не менее 5–10 мин. Всего в опытах было исследовано 68 нейронов.

Поскольку оценить латентный период (ЛП) импульсной реакции нейрона по ее ПСГ можно лишь приблизительно (прежде всего, из-за естественных флуктуаций положения импульсов в накапливаемых ответах), ниже приведены именно оценки данного параметра с точностью порядка 50 мс, а не его точные расчетные значения. Такая точность вполне достаточна для выявления выраженных (достоверных) изменений ЛП реакций.

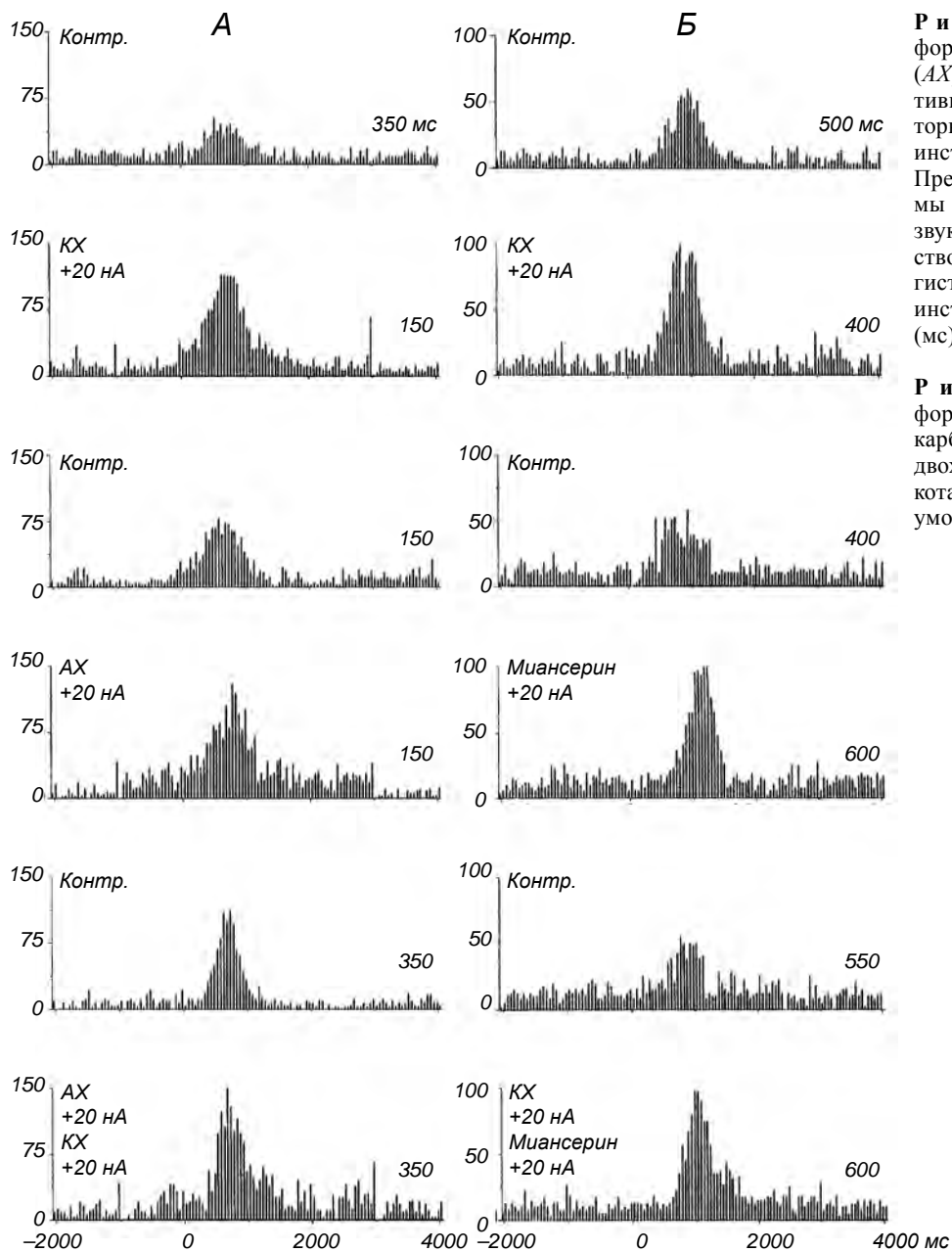
РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы начинали исследования модуляции импульсных реакций кортикальных нейронов со сравнения эффектов аппликаций АХ хлорида как эндогенного нейротрансмиттера и аппликаций КХ – вещества, имеющего те же основные фармакологические свойства, что и АХ, но, в отличие от него, резистентного к действию холинэстеразы. Как показано на рис. 2, А, аппликации и АХ, и КХ вызвали почти одинаковые изменения реакции нейрона на предъявление афферентного стимула. Интенсивность импульсной реакции нейрона значительно повышалась параллельно с уменьшением ЛП от 350 мс в контроле до

150 мс. Следует обратить внимание на тот факт, что с самого начала аппликации АХ или совместной аппликации АХ и КХ наблюдалось повышение уровня фоновой активности (ФА) нейрона (4, 6). Эти сдвиги отмечались еще до возникновения импульсного ответа нейрона на звуковую стимуляцию и поддерживались после завершения такой реакции, но в условиях продолжения аппликации. Интересно, что в иллюстрируемом случае интенсивность самой реакции при совместной аппликации АХ и КХ была даже несколько меньшей по сравнению с величинами реакций при изолированных аппликациях только одного АХ или одного КХ. Необходимо отметить еще одну особенность действия исследованных веществ: в случае аппликации АХ ФА нейрона во всех случаях усиливалась, тогда как во время ионофореза КХ она существенно не изменялась. Эти особенности эффектов, возникавших при аппликации АХ и КХ, склонили нас к мысли о том, что в дальнейшем предпочтительнее было бы использовать для ионофореза именно КХ, вызывавший такие же эффекты в отношении импульсной реакции на звуковую стимуляцию, как и АХ, но без попутного влияния на ФА нейрона.

Мы сопоставляли также эффекты аппликации КХ и миансерина, который оказывает угнетающее действие на систему серотониновых рецепторов в коре. На рис. 2, Б представлены импульсные реакции нейрона на условную стимуляцию в контроле и во время аппликации названных агентов. Как уже указывалось, и АХ, и КХ, действуя на холинорецепторы, вызывают значительное усиление импульсных реакций. Следует отметить, что при этом ЛП таких ответов обычно уменьшаются всего примерно на 100 мс. Аппликация же миансерина – антагониста серотониновых рецепторов 5-HT₂ – вопреки ожиданиям не вызывала угнетения вызванной активности кортикальных нейронов, а, наоборот, сопровождалась повышением ее интенсивности по сравнению с интенсивностью в предыдущих контрольных реализациях. Однако одновременно аппликация миансерина увеличивала ЛП реакции нейрона на звуковое раздражение примерно на 50 % (в иллюстрируемом случае с 400 до 600 мс), и этот эффект сохранялся при совместной аппликации КХ и миансерина.

Принимая во внимание тот факт, что нейроны неокортекса имеют холинорецепторы двух типов – мускариновые и никотиновые – и на них можно воздействовать достаточно селективно, мы тестировали эффекты подобных влияний в процессе



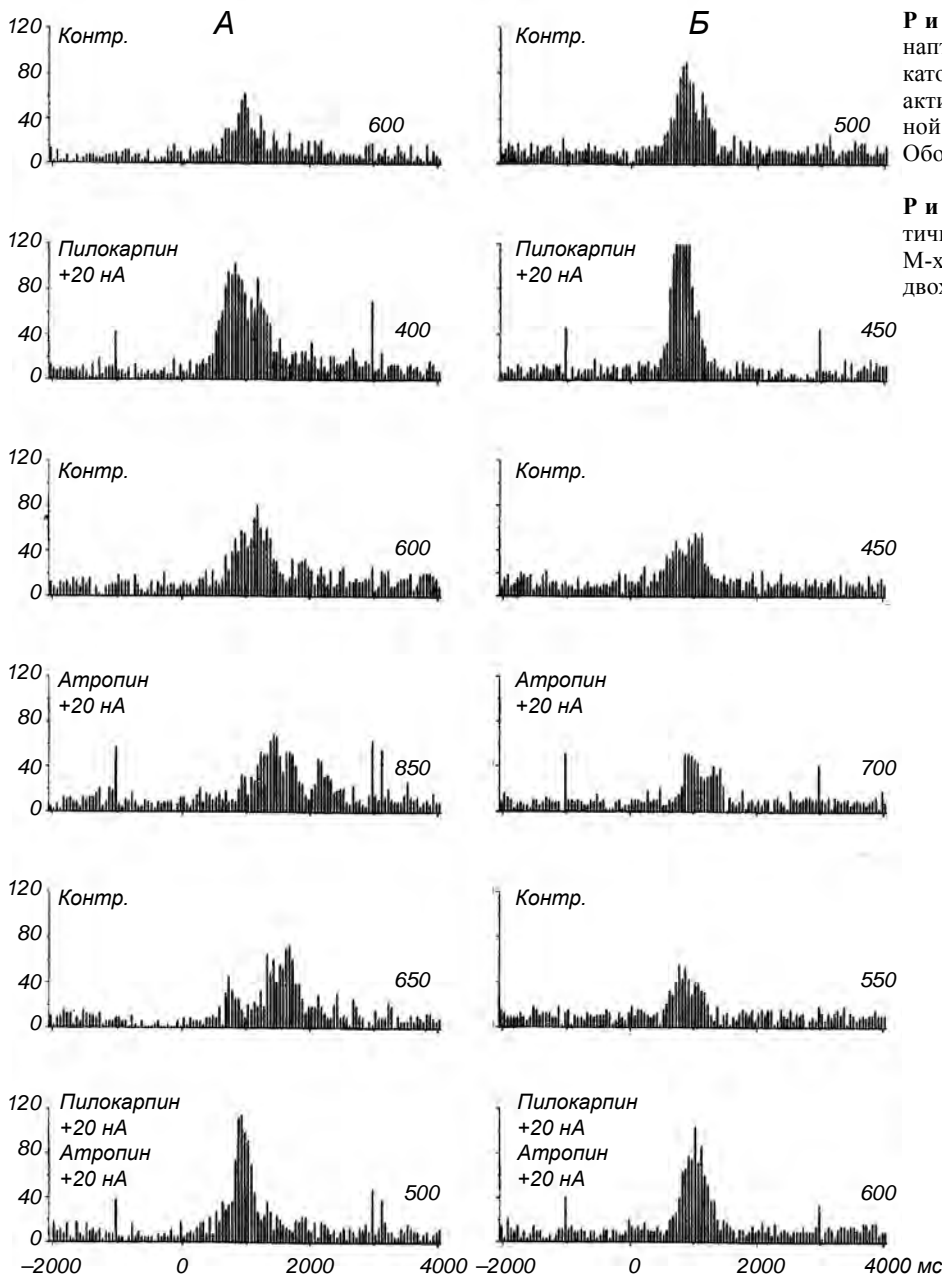
Р и с. 2. Сравнение эффектов микроионофоретических аппликаций ацетилхолина (АХ), карбахола (КХ) и миансерина на активность двух нейронов (А, Б) сенсомоторной коры кошки во время выполнения инструментального условного рефлекса. Представлены перистимульные гистограммы (ноль соответствует моменту подачи звукового сигнала). Аплицируемое вещество-анализатор и ток фореза указаны над гистограммами слева, латентный период инструментальной двигательной реакции (мс) – справа. *Контр.* – контроль.

Р и с. 2. Порівняння ефектів мікроіонофоретичних аплікацій ацетилхоліну (АХ), карбахолу (КХ) і міансерину на активність двох нейронів (А, Б) сенсомоторної кори кота під час виконання інструментального умовного рефлексу.

выполнения подопытным животным условнорефлекторных движений. Сначала были исследованы особенности модуляции импульсной активности нейронов сенсомоторной коры при изменении состояния мускариновых рецепторов. С этой целью были проведены эксперименты с микроаппликациями агониста мускариновых рецепторов пилокарпина и антагониста данных рецепторов атропина. На примерах импульсации двух нейронов (рис. 3) четко видно, что под воздействием пилокарпина интенсивность импульсного ответа нейрона на предъявление условного звукового сигнала значи-

тельно повышалась, а ЛП такой реакции сокращался (у первого нейрона – на 200, а у второго – всего примерно на 50 мс). В последующем контроле (после прекращения аппликаций) ЛП ответов первого нейрона возвращался к значению, которое было в начале эксперимента, – около 600 мс. В последующей аналогичной тест-серии интенсивность реакции на предъявление звукового сигнала по сравнению с таковой в условиях первой аппликации пилокарпина значительно уменьшалась.

Аппликация атропина (блокатора мускариновых рецепторов) приводила у первого нейрона к



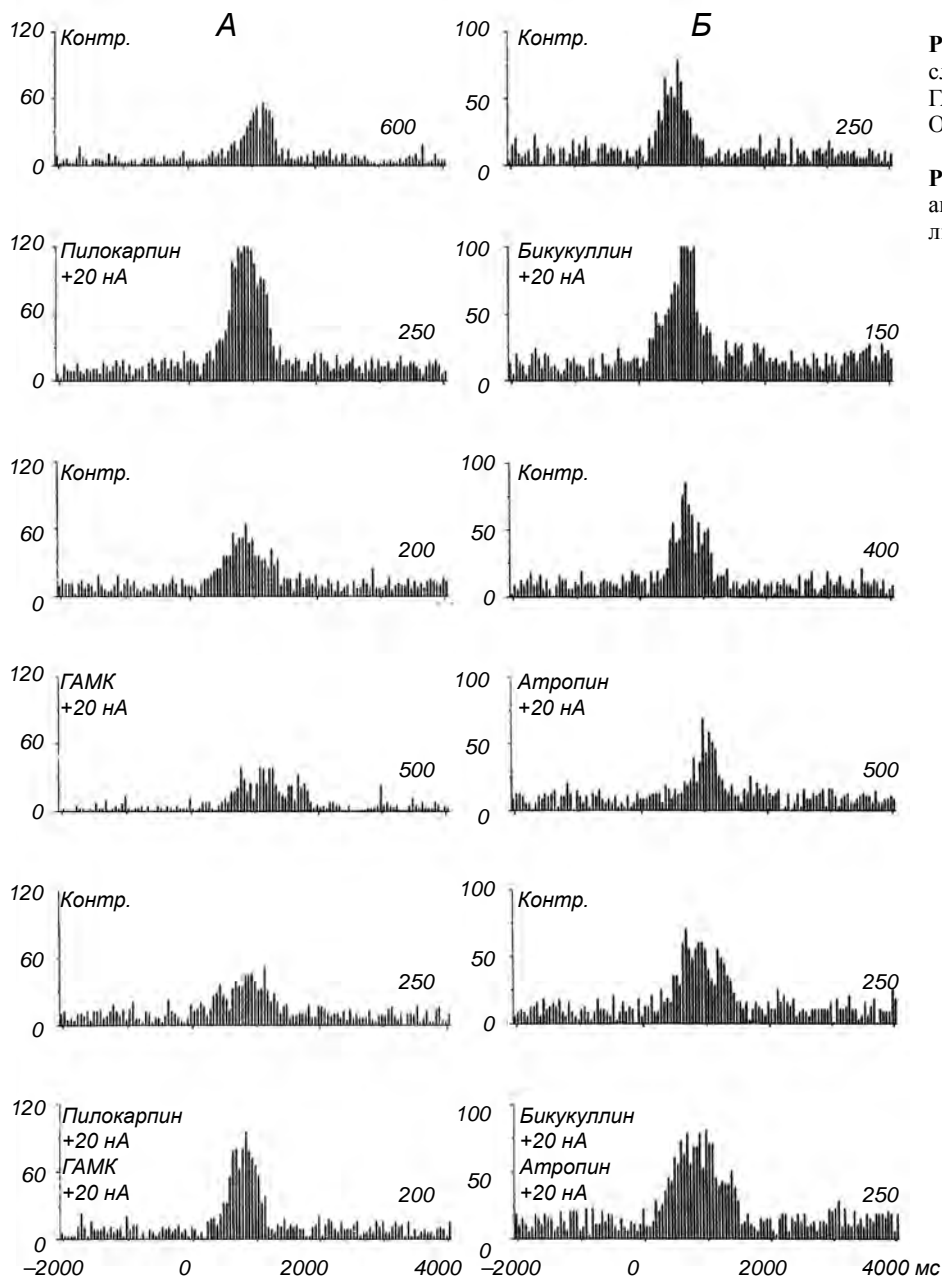
Р и с 3. Влияние агониста мускариновой синаптической передачи пилокарпина и блокатора М-холинорецепторов атропина на активность двух нейронов (А, Б) сенсомоторной коры. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с 3. Вплив агоніста мускаринової синаптичної передачі пілокарпіну та блокатора М-холінорецепторів атропіну на активність двох нейронів (А, Б) сенсомоторної кори.

незначительному уменьшению интенсивности импульсной реакции относительно наблюдаемой в предыдущем контроле. Одновременно значительно увеличивался ЛП: до 850 мс по сравнению с 600 мс в предыдущем контроле и 400 мс во время предыдущей аппликации пилокарпина. У второго нейрона во время аппликации атропина интенсивность реакции становилась значительно меньшей, чем в предыдущем контроле, а ЛП также возрастал с 450 до 700 мс. Совместная аппликация пилокарпина и атропина приводила к уменьшению ЛП реакции у первого нейрона до 500 мс, но интенсивность ре-

акции оставалась невысокой даже по сравнению с интенсивностью реакции в предыдущем контроле. У второго нейрона агонист мускариновых рецепторов пилокарпин также способствовал значительному усилению реакции нейрона и некоторому уменьшению ее ЛП. Совместная аппликация пилокарпина и атропина вызвала еще более заметное увеличение интенсивности реакции нейрона по сравнению с интенсивностью в предыдущем контроле, но ЛП таких ответов возрастал до 600 мс.

Мы сравнивали также эффекты блокирования мускариновых рецепторов под влиянием атропина

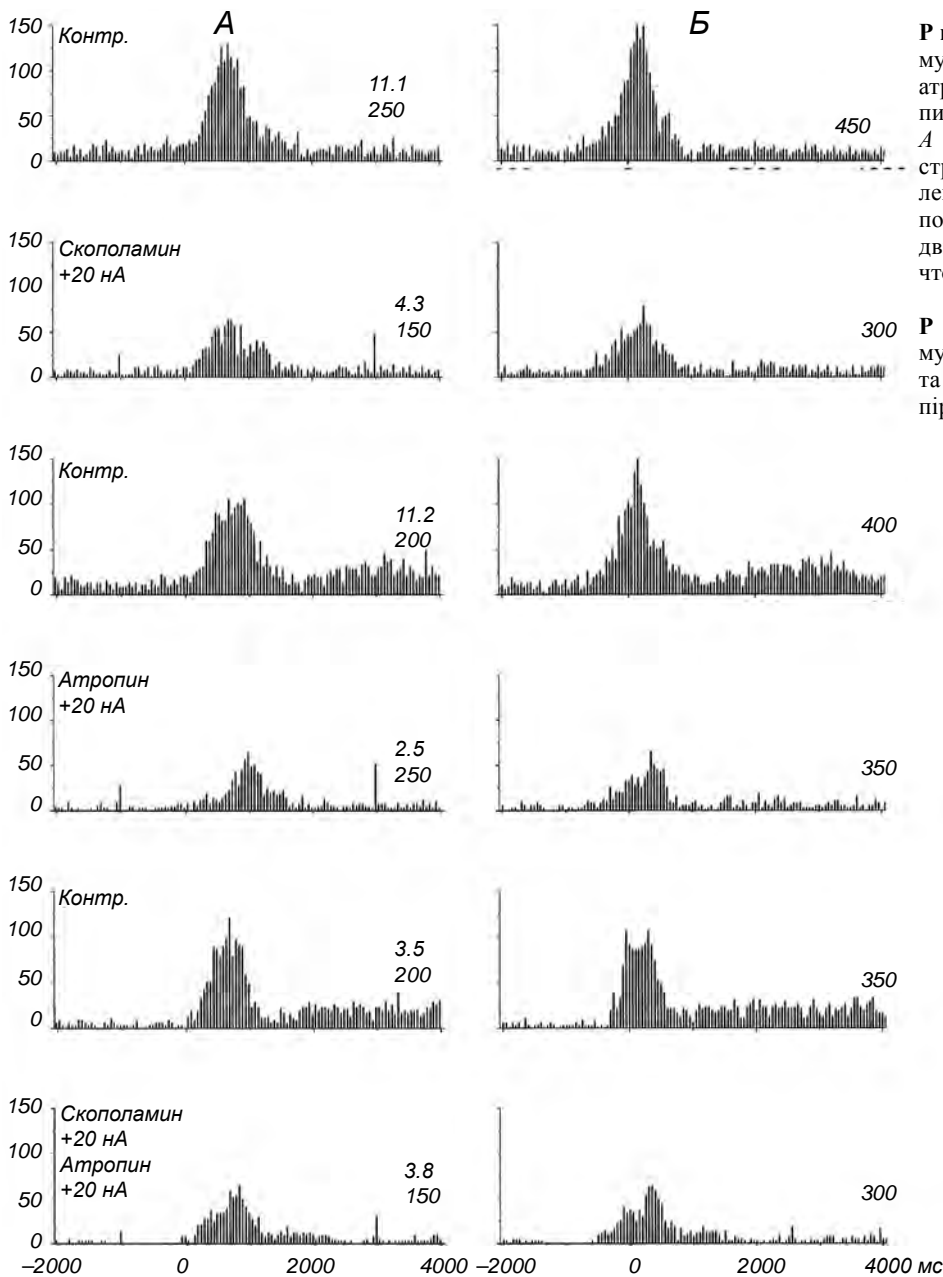


Р и с 4. Взаимодействие эффектов, обусловленных аппликациями пилокарпина, ГАМК, бикукуллина и атропина. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с 4. Взаємодія ефектів, зумовлених аплікаціями пілокарпіну, ГАМК, бікукулліну та атропіну.

с эффектом аппликации другого блокатора мускариновой холинэргической передачи – скополамина. На примере реакций нейрона пирамидного тракта (см. ниже) на предъявление звукового сигнала видно, что и скополамин, и (несколько интенсивнее) атропин угнетали и ФА, и, особенно, вызванную активность нейрона (рис. 5). Совместная аппликация атропина и скополамина приводила к угнетению реакций нейрона в такой же степени, как и аппликация одного атропина, т. е. суммации эффектов атропина и скополамина не происходило. Интерес-

но, что ЛП реакции при аппликации одного скополамина или совместной аппликации скополамина с атропином уменьшались до 150 мс по сравнению с 250–200 мс в контроле. В контроле импульсные реакции данного нейрона заметно опережали начало условнорефлекторного движения; такое опережение варьировало в пределах 350–450 мс. Это свидетельствует о принадлежности исследуемого нейрона к нейронам пирамидного тракта. При аппликации скополамина и атропина величина опережения уменьшалась до 300 мс.



Р и с. 5. Влияния аппликаций антагонистов мускариновых рецепторов скополамина и атропина на вызванные реакции нейрона пирамидного тракта.

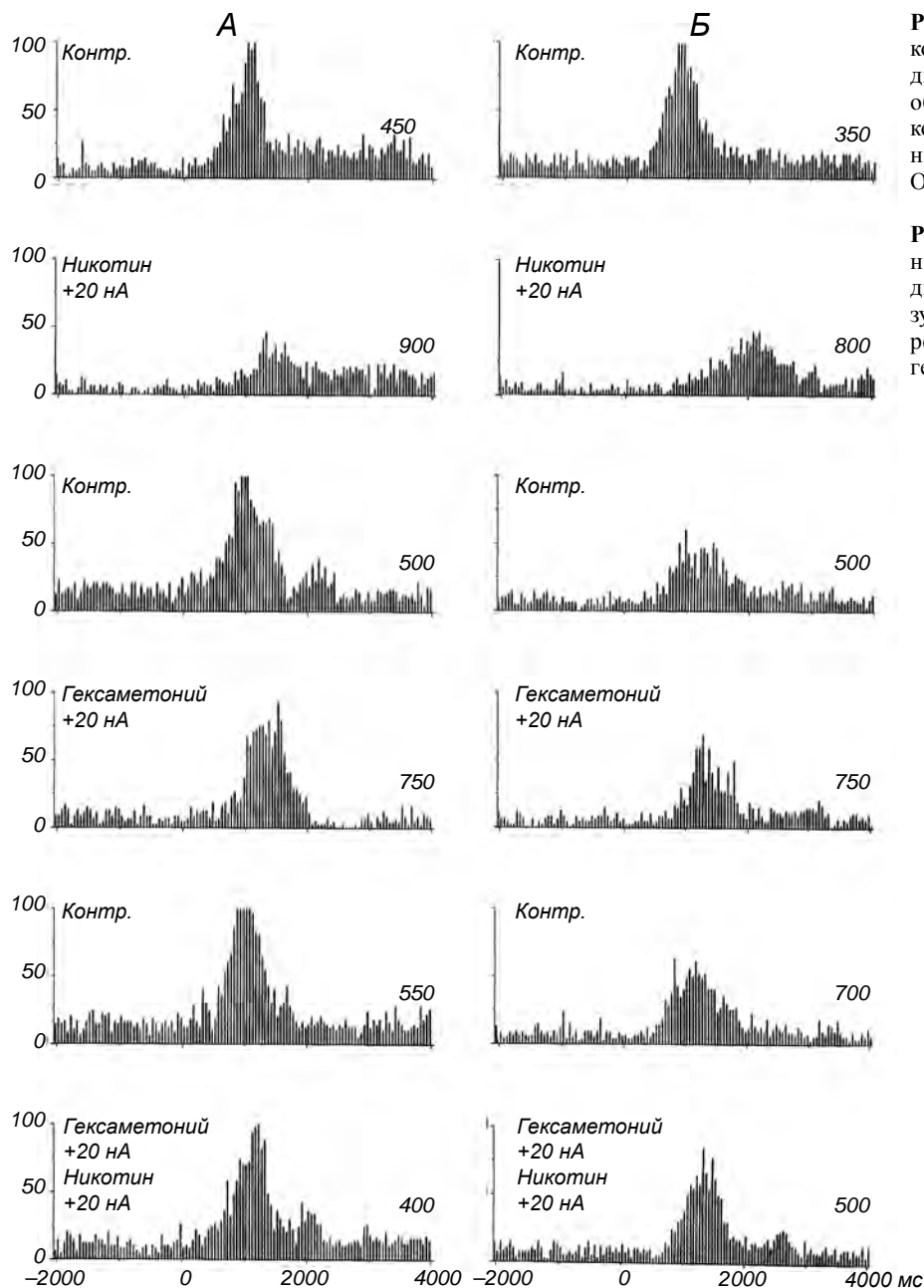
А – перистимульные гистограммы, построенные относительно момента предъявления условного стимула. *Б* – гистограммы, построенные относительно момента начала движения. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 5. Вплив аплікацій антагоністів мускаринових рецепторів скополаміну та атропіну на викликані реакції нейрона пірамідного тракту.

Поскольку угнетение импульсных реакций, вызванное блокированием холинергической системы связей в неокортексе с помощью атропина или скополамина, может быть несколько ослаблено под действием пилокарпина (рис. 3, *А, Б*), представляло интерес сравнить влияние пилокарпина на изменения импульсной активности исследуемых нейронов, обусловленные аппликацией ГАМК (рис. 4, *А*). Оказалось, что при совместной аппликации пилокарпина и ГАМК интенсивность реакции нейронов на звуковую стимуляцию значительно превышала

интенсивность реакции в начальном контроле и во всех последующих контрольных ответах, но была меньшей, чем при изолированной аппликации пилокарпина. ЛП такой реакции в условиях совместной аппликации уменьшался до 200 мс, в то время как в случаях раздельной аппликации пилокарпина и ГАМК он составлял соответственно 250 и 500 мс.

С другой стороны, сопоставление эффектов, обусловленных аппликациями таких блокаторов холинергической и ГАМК-эргической передачи, как



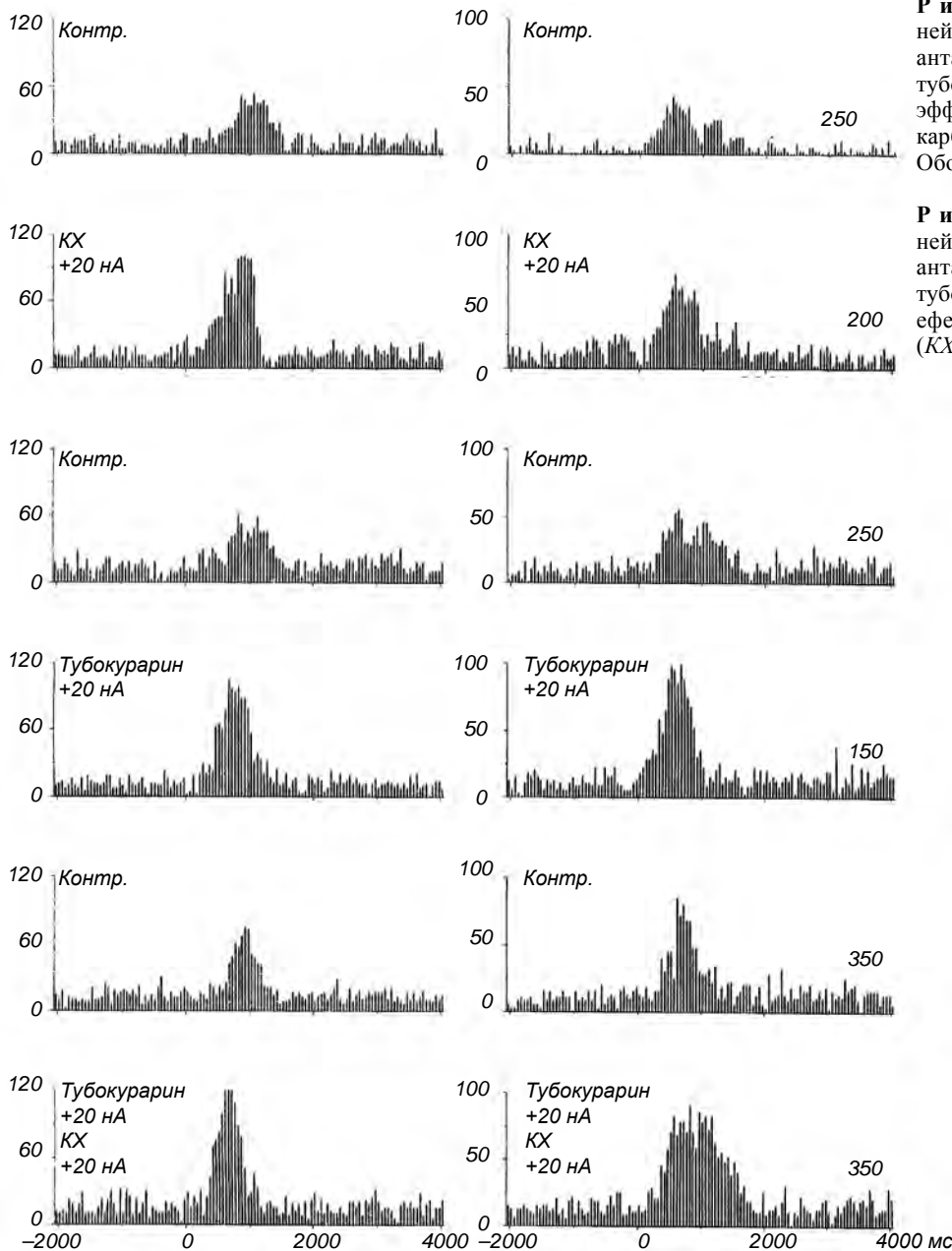
Р и с. 6. Угнетающее влияние активации никотиновых холинорецепторов на активность двух нейронов (А, Б) сенсомоторной коры, обусловленное аппликациями агониста никотиновых рецепторов никотина и антагониста – гексаметония. Обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 6. Пригнічуючий вплив активації нікотинних холінерецепторів на активність двох нейронів (А, Б) сенсомоторної кори, зумовлений аплікаціями агоніста нікотинних рецепторів нікотину та антагоніста – гексаметонію.

атропин и бикикуллин соответственно, показало следующее (рис. 8, А, Б). Бикукуллин, как и ожидалось, ограничивая или исключая влияния активности тормозных нейронов, значительно повышал интенсивность реакций корковых нейронов на условную звуковую стимуляцию и способствовал сокращению их ЛП (в иллюстрируемом случае – от 250 до 150 мс). Атропин, наоборот, резко ослаблял реакцию нейрона и увеличивал ее ЛП примерно до 500 мс. Совместная аппликация этих блокаторов, влияющих на разные по характеру синаптические

связи, приводила к неожиданному эффекту. В данных условиях развивались достаточно интенсивные импульсные реакции с ЛП, которые совпадали со значениями, наблюдаемыми в контроле в начале эксперимента (250 мс).

Анализ влияния аппликации АХ на активность нейронов неокортекса был бы неполным, если бы мы ограничились только анализом эффектов, реализуемых через систему мускариновых рецепторов, не ознакомившись с некоторыми особенностями влияния АХ на никотиновые рецепторы



Р и с. 7. Усиление импульсных реакций нейронов, обусловленное аппликациями антагониста никотиновых рецепторов тубокурарина и сопоставление этих эффектов с эффектами аппликаций карбахола (КХ). Обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 7. Посилення імпульсних реакцій нейронів, зумовлене аплікаціями антагоніста нікотинних рецепторів тубокурарину, та співставлення цих ефектів з ефектами аплікацій карбахола (КХ).

нейронов коры. Одна из особенностей эффектов, которые возникают при активации никотиновых рецепторов, проиллюстрирована на рис. 6. Аппликация никотина тартрата, т. е. агониста никотиновых рецепторов, привела к несколько неожиданному результату. Она сопровождалась существенным ростом ЛП импульсных реакций нейронов на звуковую стимуляцию (с 450 до 900 и с 350 до 800 мс), а также значительным уменьшением интенсивности ответов по сравнению с наблюдаемой в контроле (у реакций, которые развивались до и после

аппликации никотина). Что же касается реакций, генерируемых во время аппликации такого антагониста никотиновых рецепторов, как гексаметоний, то они имели большие ЛП по сравнению с задержками контрольных ответов, но по интенсивности примерно соответствовали последним. Совместная аппликация гексаметония и никотина также обуславливала некоторое подавление импульсных реакций по сравнению с контрольными. Правда, ЛП таких ответов оказались меньшими, чем в контроле в начале эксперимента.

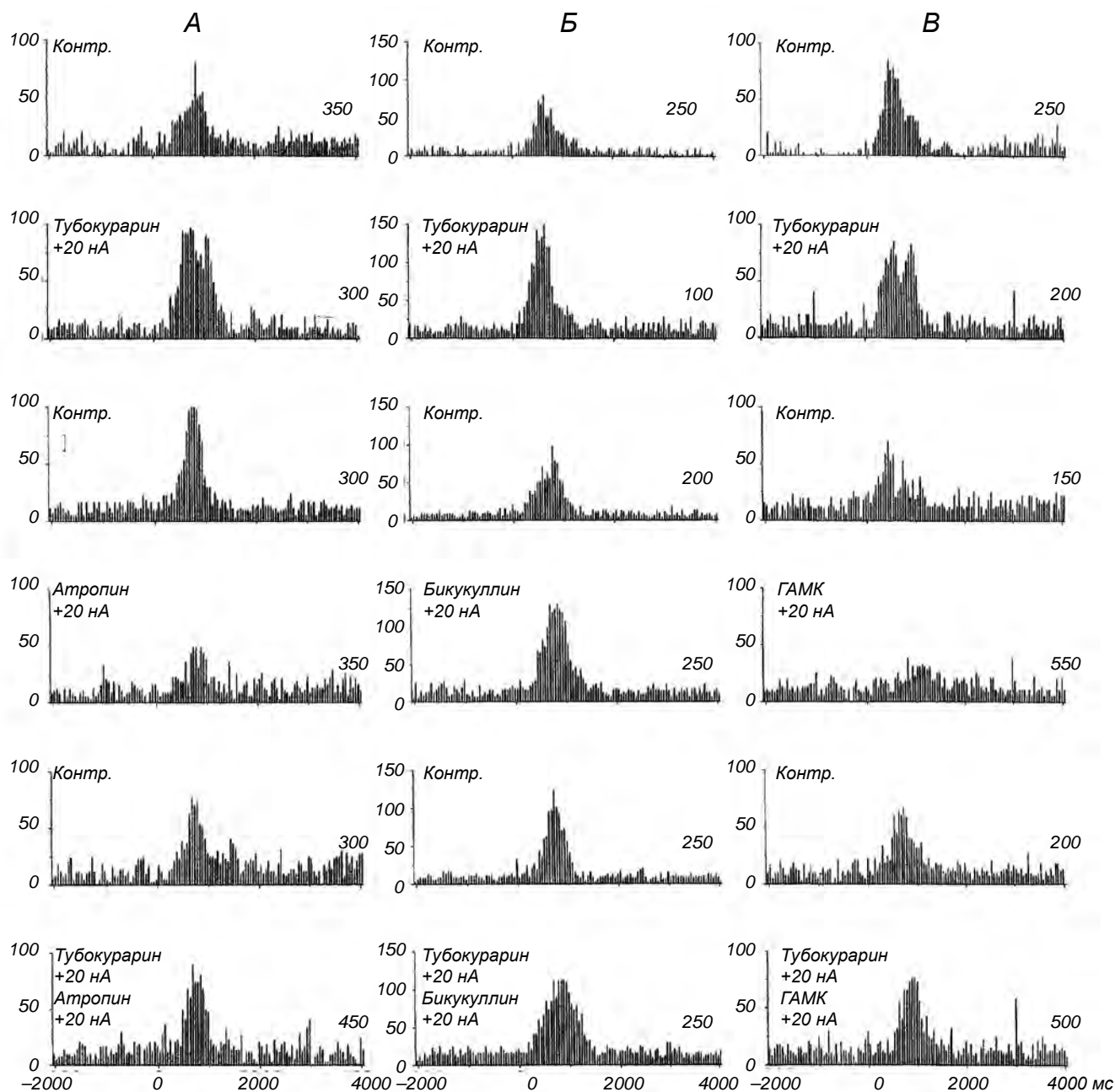


Рис. 8. Сравнение особенностей эффектов, обусловленных аппликациями тубокурарина, и эффектов, обусловленных аппликациями атропина, бикикуллина и ГАМК, в трех нейронах (А–В). Обозначения те же, что и на рис. 2.

Рис. 8. Порівняння особливостей ефектів, зумовлених аплікаціями тубокурарину, та ефектів, зумовлених аплікаціями атропіну, бікукуліну та ГАМК, у трьох нейронах (А–В).

Особенности модуляции реакций нейронов сенсомоторной коры, связанной с экспериментальными влияниями на никотиновые рецепторы, более четко проявлялись при сравнении эффектов аппли-

кации КХ и антагониста указанных рецепторов тубокурарина (рис. 7; 8). Аппликация КХ, как уже упоминалось, обуславливала заметное сокращение ЛП реакции на звуковое раздражение и повышение ее

интенсивности. Блокирование никотиновых рецепторов в результате аппликации тубокурарина также приводило к уменьшению ЛП таких ответов и способствовало генерации вызванных разрядов, не менее интенсивных, чем в случае аппликации КХ. При совместной же аппликации тубокурарина и КХ возникала реакция на условную стимуляцию, которая примерно соответствовала ответу в условиях аппликации одного КХ или даже превосходила такую реакцию по интенсивности. Подобную ситуацию можно понять, если принять во внимание, что блокирование в этих условиях никотиновых рецепторов в исследуемом участке коры сопровождается ослаблением активации тормозных интернейронов в верхних слоях неокортекса.

Поскольку тубокурарин блокирует никотиновый компонент АХ-эргической передачи, т. е. его действие сопровождается интенсивным подавлением активации никотиновых рецепторов, интересно было бы сопоставить характер взаимодействия эффектов аппликации тубокурарина с эффектом действия атропина, который блокирует мускариновый компонент упомянутой передачи. Из рис. 8, А видно, что совместная аппликация атропина и тубокурарина обуславливала резкое угнетение вызванной импульсной активности нейрона сенсомоторной коры по сравнению с той, которая наблюдалась при аппликации тубокурарина, т. е. угнетающее действие атропина на импульсные реакции нейрона под влиянием одновременного действия тубокурарина ослаблялось. Таким образом, следует полагать, что решающее влияние на активность нейрона связано не с угнетением активации никотиновых рецепторов под действием тубокурарина, а именно с блокированием мускариновых рецепторов атропином. Поэтому понятно, почему ЛП реакции нейрона в условиях совместной аппликации тубокурарина и атропина возрастал (до 450 мс). В иллюстрируемом случае исследовалась клетка, предположительно являющаяся нейроном пирамидного тракта. У нее импульсные реакции опережали начало условнорефлекторного движения на 150–250 мс. Необходимо подчеркнуть, что тубокурарин, т. е. антагонист никотиновых рецепторов, фактически устраняет эффекты, вызванные аппликацией атропина, ГАМК и бикукуллина. Очевидно, что эти факты также свидетельствуют о важности влияния состояния никотиновых рецепторов на функции нейронов неокортекса. Как показывает сопоставление эффектов аппликаций двух различных блокаторов холинорецепторов – тубокурарина

и атропина (А), атропин вызывает резкое угнетение импульсных ответов нейронов коры, тогда как тубокурарин, наоборот, значительно облегчает такие реакции. Суммарное воздействие этих блокаторов фактически приводит к тому, что наблюдаемые реакции по интенсивности мало отличаются от реакций в контроле; правда, их ЛП остаются увеличенными. Интересно, что тубокурарин вызывает изменения реакций нейрона, сходные с изменениями реакций при действии бикукуллина. Однако в условиях совместной аппликации этих веществ ответы по интенсивности мало отличались от реакций, вызванных изолированной аппликацией указанных антагонистов. В то же время совместные аппликации тубокурарина и ГАМК обуславливали развитие реакций, которые по интенсивности были равны реакциям в условиях контроля. Иными словами, тубокурарин, казалось бы, полностью нивелирует влияние ГАМК. Однако при этом значительно, в два-три раза, возрастает ЛП реакции (до порядка 500 мс по сравнению с 200 мс во время изолированной аппликации тубокурарина и 200 мс в предшествующем контроле). Иначе говоря, ЛП в данных случаях почти не отличаются от наблюдаемых в условиях аппликации ГАМК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нейронные никотиновые рецепторы (Н-холинорецепторы, nAChR) – это пентамеры, которые представляют собой комбинации различных или одинаковых субъединиц и могут быть, соответственно, гетеромерами или гомомерами. Субъединичная композиция рецептора является важнейшим фактором, поскольку наличие разных субъединиц определяет различные функциональные характеристики данных рецепторных структур. Так, известно, что для рецепторов, содержащих в себе $\alpha 7$ -субъединицы, характерна быстрая десенситизация в присутствии агониста и они обладают высокой проницаемостью для Ca^{2+} [4]. В то же время рецепторы, содержащие в себе $\alpha 4\beta 2$ -субъединицы, имеют более высокое сродство к никотину и характеризуются более медленной десенситизацией. Матерате [5] обратил внимание на то, что выяснение вопроса о роли активации никотиновых холинорецепторов в деятельности корковых нейронных сетей в значительной мере осложняется трудностью исследования и демонстрации синаптического действия АХ на данные объекты. Эти трудности обу-

словлены природой холинергической иннервации неокортекса. Например, холинергические нейроны базального ядра, которые посылают свои аксоны в неокортекс, «перемешаны» в указанной структуре с холинергическими единицами, которые также проецируются в сенсомоторную кору [6]. Это обстоятельство, естественно, усложняет селективную стимуляцию подобных популяций. К тому же, АХ может высвобождаться достаточно далеко от постсинаптических целей [7]. Значительная часть холинергической иннервации коры головного мозга млекопитающих поступает от группы клеток *nucl. basalis* – безымянной субстанции, классифицируемой как группа холинергических нейронов Ch4. У человека этот комплекс в каждом полушарии включает в себя до 200000 нейронов. Все нейроны данной группы содержат в себе АХ-эстеразу и АХ-трансферазу. Плотность терминалей холинергических аксонов, которые поступают в неокортекс, наиболее высока в поверхностных слоях коры. Существуют значительные различия в плотности и распределении холинергических волокон по слоям неокортекса и между различными цитоархитектоническими зонами коры млекопитающих (в частности, это показано и у обезьян, и у человека). Известно, что холинергические аксоны образуют синапсы во всех слоях коры и данные синапсы, как правило, симметричны.

Как показано в одном из исследований [8], холинергические аксоны образуют синапсы главным образом на стволах дендритов (70.5 %), дендритных шипиках (25 %) и совсем редко – на телах клеток-мишеней (4.5 %). Холинергическую иннервацию получают и пирамидные нейроны, и интернейроны с морфологическими признаками ГАМК-эргических клеток. Анализ природы синаптических влияний в супрагранулярных слоях префронтальной коры показал, что в этих участках около 44 % синаптических связей сформированы холинергическими терминалями. Такие синаптические контакты нередко располагаются на шипиках и мелких дендритах кортикальных нейронов. Ультраструктурные характеристики АХ-эргических проекций позволили авторам предположить, что модулирующий эффект АХ в неокортексе может быть двойственным. С одной стороны, соответствующие влияния могут реализовываться через классические синаптические связи на дендритных стволах и шипиках, а с другой – через несинаптические окончания холинергических волокон вблизи асимметричных интракортикальных синапсов.

Сначала считалось, что АХ, высвобожденный в коре головного мозга, взаимодействует только с мускариновыми рецепторами. Наверное, Алькондон и соавт. [9] были первыми, кто обратил внимание на роль активации никотиновых рецепторов на мембранах интернейронов церебральной коры и возможное значение подобных влияний для клиники. С помощью техники «patch-clamp», реализуемой под контролем инфракрасного видеомикроскопа, цитируемые авторы регистрировали в переживающих срезах ткани коры головного мозга человека (полученных во время нейрохирургических операций) ответы интернейронов на аппликацию неселективного агониста никотиновых холинорецепторов АХ и их селективного агониста холина. Открывание каналов этих холинорецепторов контролируется эндогенным трансмисмиттером (АХ) или экзогенными лигандами (такими, как никотин). Таким образом, было показано, что в холинергическую передачу в коре головного мозга вовлечены холинергические рецепторы обоих классов. С одной стороны, это возбуждающие никотиновые рецепторы $\alpha 7$ -nAChR, чувствительные к их селективному агонисту холину, и тормозные рецепторы, которые под влиянием АХ вызывают медленное снижение мембранных токов клетки. Рецепторы последнего вида чувствительны к блокирующему действию дигидро- β -эритроидина и, по-видимому, относятся к группе $\alpha 4\beta 2$ -никотиновых рецепторов, которые опосредуют быструю постсинаптическую передачу. С другой стороны, это мускариновые рецепторы с каналами, связанными с G-белками. Воздействие на данные рецепторы играет модулирующую роль.

Результаты иммуногистохимических исследований мозга человека показали, что до 30 % нейронов коры имеют и никотиновые, и мускариновые АХ-рецепторы. Рецепторы этих двух типов различаются не только по структуре, но и по функции. Никотиновые рецепторы при их активации уже через несколько миллисекунд всегда вызывают возбуждение исследуемых нейронов, которое блокируется тубокурарином. Активация же мускариновых рецепторов может вызывать со значительно большей задержкой или возбуждение, или торможение; эти эффекты можно заблокировать атропином или скополамином. Важно подчеркнуть, что никотиновые рецепторы локализованы главным образом пресинаптически – на таламо-кортикальных терминалях, в то время как мускариновые рецепторы локализируются постсинаптически – непосредственно на мембранах нейронов коры.

Как уже упоминалось, никотиновые рецепторы неокортекса представляют собой пентамеры. Они построены из пяти субъединиц (из 17 возможных) и могут формироваться или из пяти $\alpha 7$ -субъединиц (как гомомерные) или из их комбинаций с $\beta 2$ - $\beta 4$, $\alpha 2$ - $\alpha 10$ -, а также γ - и δ -субъединицами (как гетеромерные с разной субъединичной последовательностью). Они обладают лигандуправляемыми ионными каналами [5]. Связывание АХ с никотиновыми рецепторами приводит к активации ионных каналов, входу через них ионов натрия и развитию быстрого натриевого ответа. Наличие в составе таких рецепторов разных субъединиц обуславливает определенные особенности функциональных характеристик нейронных реакций. Указывалось, например, что рецепторы с $\alpha 7$ -единицей быстро десенситизируются в присутствии агониста и характеризуются высокой проницаемостью для Ca^{2+} [4]. В то же время $\alpha 4\beta 2$ -рецепторы имеют более высокое сродство к никотину и более медленный темп десенситизации [10]. В целом активация никотиновых АХ-рецепторов вызывает деполяризацию мембраны нейронов и (прямым или косвенным образом) увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Таким образом, когда активируются никотиновые АХ-рецепторы, локализованные пресинаптически, это увеличивает вероятность высвобождения трансмиттера. Когда же активируются рецепторы постсинаптических мембран, инициированный АХ-рецепторами кальциевый сигнал и деполяризация мембраны активируют внутриклеточные сигнальные механизмы и процессы генной транскрипции. Совместная активация пре- и постсинаптических никотиновых АХ-рецепторов обуславливает облегчение индукции долговременных изменений синаптической передачи [11]; это, возможно, имеет терапевтическое значение при таких патологических состояниях, как болезни Альцгеймера и Паркинсона. На срезах тканей моторной, париетальной и ассоциативной коры никотиновые агонисты оказывают на пирамидные нейроны незначительное прямое действие, но интенсивно возбуждают ГАМК-эргические и иные локальные интернейронные цепи.

Локализация никотиновых рецепторов различных подтипов в различных полях неокортекса человека была определена с помощью ауторадиографии и меченных по тритию никотина ($[^3\text{H}]$ никотина) и его агонистов ($[^3\text{H}]$ цитизина и $[^3\text{H}]$ эпибатидина). Характер ауторадиографических картин связывания трех лигандов оказался относительно спе-

цифическим. В первичной моторной коре меченые эпибатидин и цитизин более интенсивно связывались в III и V слоях коры. Для $[^3\text{H}]$ никотина связывание было выше в I и VI слоях моторной коры. По мнению авторов, все три лиганда связываются с идентичными рецепторными местами у, скорее всего, $\alpha 4$ -никотиновых рецепторов.

Результаты ряда исследований подтверждают общую гипотезу о том, что пресинаптические никотиновые АХ-рецепторы регулируют процессы таламо-корковой передачи в сенсорной коре. Такая регуляция в значительной степени обеспечивается влияниями на тормозные ГАМК-эргические интернейроны и опосредуется активацией никотиновых рецепторов интернейронов поверхностного I слоя коры. Аппликация никотиновых агонистов на нейроны I слоя активирует там никотиновые рецепторы интернейронов, а это, в свою очередь, содействует развитию ТПСР в интернейронах II и III слоев, но не в пирамидных нейронах [12, 13]. Таким образом, пирамидные нейроны более глубоких уровней коры растормаживаются [14]. Это, по мнению авторов, подтверждает представления о двух главных функциях Н-холинорецепторов в коре: они участвуют в пресинаптической регуляции таламо-корковой глутаматергической передачи и в постсинаптическом возбуждении ГАМК-эргических интернейронов.

Мускариновые рецепторы, как уже упоминалось, – рецепторы, связанные с G-протеинами. Их активация приводит к развивающимся с большей задержкой, но более продолжительным ответам, чем активация никотиновых рецепторов. В церебральной коре млекопитающих различают пять подтипов мускариновых рецепторов. По некоторым данным [15], в коре грызунов M1-рецепторы составляют до 40, M2 – до 37 и M4 – до 5 % общего количества мускариновых рецепторов. Установлено [16], что во фронтальной, темпоральной и париетальной коре человека M1-рецепторы составляют 35–60 % общего количества упомянутых рецепторов. Особое внимание привлекают рецепторы M1 и M2. В сенсорной и моторной коре наибольшую плотность имеют M2-рецепторы. Эти рецепторы локализованы преимущественно на пирамидных нейронах III–V слоев. Плотность M1-рецепторов наиболее высока в лимбической и ассоциативной коре. Результаты электронномикроскопических исследований коры приматов показали, что M1-рецепторы локализируются постсинаптически на дендритах и шипиках; они присутствуют и в асимметричных, и в симме-

тричных холинергических синапсах [8]. Пресинаптически локализованные M2-рецепторы (в частности, в зрительной коре приматов) ассоциированы с ассиметричными синапсами. Это свидетельствует о том, что M2-рецепторы могут действовать как гетерорецепторы, регулирующие возбуждающую передачу. Они также могут локализоваться постсинаптически, на мембранах пирамидных клеток III и V слоев и непиримидных клеток, расположенных во всех слоях коры.

Длительное время влияние АХ на неокортекс рассматривалось только в аспекте его действия на мускариновые рецепторы. Позже были предприняты попытки проанализировать особенности влияния АХ и на никотиновые рецепторы. Работы проводились на срезах префронтальной коры, которая, как известно, принимает особое участие в когнитивных процессах. На пирамидных нейронах префронтальной коры крыс, в частности, было показано, что ионофоретическая аппликация агониста никотина увеличивает амплитуду моносинаптических возбуждающих потенциалов, опосредованных активацией НМДА-рецепторов. Этот эффект устранялся с помощью селективных блокаторов никотиновых рецепторов бунгаротоксина и дигидро- β -эритроидина. Известно, что воздействие никотиновыми агонистами не изменяет мембранного потенциала, входного сопротивления и вольт-амперных характеристик у кортикальных нейронов. Они также не влияют на деполяризацию, вызванную ионофоретической аппликацией глутамата в слоях коры, содержащих в себе преимущественно сомы или дендриты клеток [17]. В то же время мускариновые агонисты снижали амплитуду ВПСР в 100 % тестированных кортикальных нейронов. Было продемонстрировано [18], что активация мускариновых рецепторов непосредственно приводит к торможению пирамидных нейронов V слоя неокортекса.

Ранее Хохловой и соавт. [19] было показано нечто противоположное. В результате системного введения блокаторов мускариновых холинорецепторов скополамина и тригексифенидила нарушалась реализация инструментального пищедобывательного рефлекса. Подавление моторного компонента инструментальной реакции, вызванное введением антихолинергического препарата, по мнению цитируемых авторов, скорее всего, свидетельствует о нарушении запуска и реализации моторной программы. В исследованиях, выполненных Раевским и соавт. [1], было установлено, что кондиционирующее раздражение холинергической системы при-

водит к селективному угнетению реакций нейронов неокортекса, вызванных сенсорной стимуляцией. Такое тормозное влияние холинергической системы опосредуется, по мнению авторов, ГАМК-эргическими нейронами и реализуется через бихукуллинчувствительные ГАМК_B-рецепторы, которые локализованы на афферентных терминалях.

Полученные в наших экспериментах факты также указывают на важную многостороннюю роль АХ в регуляции деятельности нейронов неокортекса, реализуемой в физиологических условиях. Прежде всего, очевидно, что через активацию мускариновых рецепторов в подобных условиях АХ заметно повышает способность нейронов неокортекса реагировать на афферентную стимуляцию. Блокирование этих афферентных входов к нейронам коры в результате аппликаций атропина или скополамина вызывает значительное угнетение импульсных реакций отдельных кортикальных нейронов. В то же время активация никотиновых рецепторов (видимо, расположенных на пресинаптических окончаниях тормозных интернейронов) сопровождается угнетением активности пирамидных нейронов неокортекса. Именно поэтому аппликация тубокураина, блокируя такое влияние никотина на систему пресинаптических волокон тормозных нейронов, вызывает столь выраженное усиление активности исследуемых пирамидных нейронов неокортекса.

В. М. Сторожук¹

РОЛЬ АЦЕТИЛХОЛИНУ В МОДУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ НЕОКОРТЕКСУ ТВАРИН У СТАНІ НЕСПАННЯ ПРИ РЕАЛІЗАЦІЇ ІНСТРУМЕНТАЛЬНОГО УМОВНОГО РЕФЛЕКСУ

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Досліджені модулюючі впливи холинергічної системи на активність нейронів сенсомоторної кори, пов'язану із здійсненням інструментального умовного рефлексу постановки лапи на опору. Досліди були виконані на котах у стані неспання; для позаклітинного відведення імпульсної активності нейронів сенсомоторної кори та іонофоретичної аплікації синаптично активних речовин у ділянку відведення використовували багатоканальний скляний мікроелектрод. Реєстрували фонову та викликану активність нейрона під час виконання умовнорефлекторного руху, а потім її зміни при аплікації синаптично активних речовин.

Аплікації ацетилхоліну та карбахолу призводили до під-

вищення інтенсивності імпульсних реакцій нейронів неокортексу, викликаних пред'явленням звукового сигналу, з одночасним скороченням латентного періоду (ЛП) відповіді. Схожий вплив на викликану активність нейронів сенсорної кори справляв і агоніст мускаринових рецепторів пілокарпін. Блокатори мускаринових рецепторів атропін і скополамін, навпаки, різко пригнічували інтенсивність імпульсних реакцій нейронів кори на аферентну стимуляцію та одночасно вірогідно збільшували їх ЛП. Аплікація агоніста нікотинових рецепторів нікотину супроводжувалася пригніченням імпульсних відповідей нейронів, збільшенням ЛП нейронних реакцій на пред'явлення звукового сигналу та відповідним збільшенням ЛП умовнорефлекторної рухової реакції. Аплікація антагоніста нікотинових рецепторів тубокурарину, навпаки, сприяла значному посиленню імпульсних реакцій нейронів і скороченню їх ЛП. Обговорюються механізми впливів агоністів та антагоністів мембранних мускаринових і нікотинових холінорецепторів і роль активації цих рецепторів у модуляції активності пірамідних і непірамідних нейронів неокортексу, пов'язаної з реалізацією інструментального рухового рефлексу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. В. В. Раевский, К. П. Будко, П. Мареш, "Холинергическая система переднего мозга модулирует активность ГАМК-эргических интернейронов, осуществляющих пресинаптическую регуляцию в неокортексе котят", *Журн. высш. нерв. деятельности*, **38**, № 6, 1068-1075 (1988).
2. Q. Gu, "Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity," *J. Neurosci.*, **111**, No. 4, 815-835 (2002).
3. В. М. Сторожук, *Дофаминергическая модуляция нейронной активности в коре головного мозга бодрствующего животного*, Наук. думка, Киев (2008).
4. Z. W. Zhang, S. Vijayaraghavan, and D. K. Berg, "Neuronal acetylcholine receptors that bind α -bungarotoxin with high affinity function as ligand-gated ion channels," *Neuron*, **12**, 167-177 (1994).
5. R. Metherate, "Nicotinic acetylcholine receptors in sensory cortex," *Learning Memory*, **11**, No. 1, 50-59 (2004).
6. R. W. Dykes, "Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**, No. 5, 535-545 (1997).
7. P. Turini, M. A. Casu, T. P. Wong, et al., "Cholinergic nerve terminals establish classical signal synapses in the rat cerebral cortex; synaptic pattern and age-related atrophy," *J. Neurosci.*, **105**, No. 3, 277-285 (2001).
8. L. Mrzljak, M. Pappy, C. Lewranth, and P. S. Goldman-Rakich, "Cholinergic synaptic circuitry in the macaque prefrontal cortex," *J. Comp. Neurol.*, **357**, No. 4, 603-617 (1995).
9. M. Alkondon, E. F. R. Pereira, H. M. Eisenberg, et al., "Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks," *J. Neurosci.*, **20**, No. 1, 66-75 (2000).
10. C. P. Fenster, M. F. Rains, B. Noerager, et al., "Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine," *J. Neurosci.*, **17**, No. 15, 5747-5759 (1997).
11. B. E. McKay, A. N. Placzek, and J. A. Dani, "Regulation of synaptic transmission and plasticity neuronal nicotinic acetylcholine receptors," *Biochem. Pharmacol.*, **74**, No. 8, 1120-1133 (2007).
12. E. Christophe, A. Roebuck, J. F. Staiger, et al., "Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons," *J. Neurophysiol.*, **88**, No. 3, 1318-1327 (2002).
13. I. Férézou, E. L. Hill, B. Cauli, et al., "Extensive overlap of mu-opioid and nicotinic sensitivity in cortical interneurons," *Cerebr. Cortex*, **17**, No. 8, 1948-1957 (2007).
14. W. Sihver, P. G. Gillberg, and A. Norberg, "Laminar distribution of nicotinic receptor subtypes in human cerebral cortex as determined by [³H] (-) nicotine, [³H] cytisine [³H] epibatidine *in vitro* autoradiography," *J. Neurosci.*, **85**, No. 4, 1121-1133 (1998).
15. A. I. Levey, C. A. Kitt, W. F. Simonds, et al., "Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies," *J. Neurosci.*, **11**, No. 10, 3218-3226 (1991).
16. D. D. Flynn, G. Ferrari-DiLeo, D. C. Mash, et al., "Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease," *J. Neurochem.*, **64**, No. 4, 1888-1891 (1995).
17. C. Vidal and J. P. Changeux, "Nicotinic and muscarinic modulation of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex *in vitro*," *J. Neurosci.*, **56**, No. 1, 23-32 (1993).
18. A. T. Gullledge and G. J. Stuart, "Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons," *J. Neurosci.*, **25**, No. 44, 10308-10320 (2005).
19. В. Н. Хохлова, Г. Х. Мержанова, Э. Е. Долбакян, "Роль мускариновых холинорецепторов в воспроизведении инструментального пищевого условного рефлекса у кошек," *Журн. высш. нерв. деятельности*, **50**, № 3, 482-491 (2000).