

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. ВОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

САНЖАРОВСЬКИЙ Анатолій Васильович

МОДУЛЯЦІЯ ВПЛИВУ ГЛУТАМАТУ НА АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ КОРИ
ПРИ УМОВНОМУ РЕФЛЕКСІ

14.03.03 - нормальна фізіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

КМІВ - 1997

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті
Національної Академії наук

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00760984 (Y)

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Сторожук Віктор Максимович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Чайченко Геннадій Михайлович
доктор медичних наук, професор
Синицький Валентин Миколайович

Провідна установа: Інститут фізіології при Національному
університеті ім. Т. Г. Шевченка

Захист відбудеться "11" березня 1997 р. о 14 годині на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д-01.13.01
при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України
за адресою: 252024, м. Київ, вул. Богомольця 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
фізіології ім. О. О. Богомольця.

Автореферат розісланий "4" лютого 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук

З. О. Сорокіна-Маріна

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. В останні роки виявляється все більший інтерес до глутаматергічних міжнейронних зв'язків (Lynch, Baudry, 1984; Tsumoto et al., 1987; Tsukada, 1988; Kennedy, 1989; Miller et al., 1989; Wroblewski, Danysz, 1989; Lynch et al., 1991; Самойлов, 1992; Dudkin et al., 1993; Дудкин и др., 1995). Цей інтерес обумовлен, в основному, тим, що глутамат, виступаючи як збуджуючий медіатор, та опосередковуючи синаптичну передачу у внутрішньокіркових міжнейронних зв'язках, приймає участь у забезпеченні процесів вищої нервової діяльності, зокрема таких, як навчання та пам'ять.

Вивчення внутрішньокіркових глутаматергічних зв'язків, у тому числі їх участі в умовнорефлекторній діяльності, а також модулюючих впливів з боку інших нейромедіаторних (нейромодуляторних) систем неокортексу на ефекти глутамату, до теперішнього часу проводилося або *in vitro*, або на наркотизованих тваринах, або на алертних тваринах, але у модельних експериментах з аналогом виробки умовного рефлексу (Котляр, Овчаренко, 1980; Котляр, 1986; Годухин, 1987; Metherate et al., 1987; Metherate et al., 1988b; Котляр, 1989; Markram, Segal, 1990; Tremblay et al., 1990a; Tremblay et al., 1990b; Комиссаров, Абрамець, 1994). В цих умовах проведення експериментів картина синаптичних впливів на нейрони залишається неповною. Дані ж про роль глутаматергічної нейромедіаторної системи неокортексу у формуванні імпульсної активності кіркових нейронів при умовнорефлекторній діяльності в природних умовах, а також про модулювання, при цьому, ефектів глу-

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

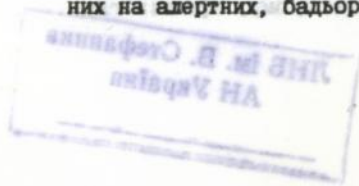
таматної передачі у корі екстраталамічними системами інших ергічнихостей, практично відсутні.

МЕТА РОБОТИ: з'ясувати роль глутаматергічної синаптичної передачі у формуванні імпульсної активності нейронів сенсомоторної кори кішки при здійсненні умовного рефлексу, а також оцінити модулювання ефектів глутамату такими нейромедіаторними (нейромодуляторними) системами, як холінергічна, норадренергічна та дофамінергічна.

ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Проаналізувати зміни фонові та викликані умовним подразником активності кіркових нейронів при мікроіонофоретичній аплікації глутамату та його блокаторів.
2. Вивчити зміни фонові та викликані імпульсної активності нейронів неокортексу при мікроіонофоретичному підведенні до них ацетилхоліну та при спільному його аплікуванні з глутаматом.
3. Дослідити зміни імпульсної активності нейронів сенсомоторної кори при іонофоретичному прикладанні до них блокатору бета-адренорецепторів обзидану (пропранолоду) та при його сумісному мікроіонофорезі з глутаматом.
4. З'ясувати зміни імпульсної активності кіркових нейронів при аплікуванні неспецифічного блокатору дофамінових рецепторів галоперідолу та при спільній його аплікації з глутаматом.

НАУКОВА НОВИЗНА. Новизна цієї роботи полягає, у першу чергу в тому, що всі дані одержані в експериментах, проведених на алертних, бадьорих тваринах, при здійсненні умовного



рефлексу, в умовах, максимально наближених до природних.

Уперше показано, що, в таких умовах, глутаматергічна синаптична передача в сенсомоторній корі, мало беручи участь в організації фонові активності, здійснює досить тривалий слідовий полегшуючий вплив на нейронні реакції, що викликані умовною стимуляцією. Цей полегшуючий ефект продовжував спостерігатися через 10 хвилин після закінчення безпосередньої дії глутамату. Висловлено припущення про можливе його опосередкування N-метил-D-аспартатними (НМДА) рецепторами.

Показано, що у алертних тварин, в умовах, наближених до природних, при здійсненні умовного рефлексу на фоні спільної мікроіонофоретичної аплікації глутамату та ацетілхоліну, останній пригнічував підсилюючий ефект глутамату на фонову активність та потенціював його полегшуючий вплив на викликані нейронні реакції, продовжуючи виявляти свій потенціюючий ефект через 10 хвилин після закінчення аплікування.

Встановлено, що норадренергічна система, через бета-адренорецептори, здійснює тонічний пригнічуючий вплив на ефекти глутамату в неокортексі.

Показано, що дофамінергічна система пригнічує як фонову, так і викликану активність під час здійснення умовного рефлексу, а також викликає послаблення підсилюючого ефекту глутамату по відношенню до фонові активності кіркових нейронів при здійсненні умовного рефлексу та потенціює полегшуючий вплив глутаматергічної системи на нейронні реакції, що викликаються умовною стимуляцією.

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Одержані в цій роботі дані суттєво доповнюють та розвивають уявлення про функціонування однієї з основних нейромедіаторних систем неокортексу - глутаматергічної, при умовнорефлекторній діяльності в природних умовах. Показано, що крім її власних ефектів, як безпосередніх, так і слідових, виявляються різноспрямовані модулюючі впливи на її ефекти в корі мозку з боку різних екстраталамічних нейромедіаторних (нейромодуляторних) систем.

Ці дані можуть сприяти більш повному розумінню патогенезу розладів психічної сфери, а також більш детальному поясненню механізму дії деяких психотропних препаратів, що широко використовуються в клініці. Результати даного дослідження можуть бути також використані при підготовці лекцій по фізіології вищої нервової діяльності для біологічних та медичних спеціальностей.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ

1. У алертної, бадьорої кішки при виконанні умовного рефлексу в умовах, близьких до природної поведінки, глутамат, викликаючи підсилення імпульсної активності нейронів кори головного мозку під час своєї безпосередньої дії, чинить також слідовий ефект на нейронну активність. Цей слідовий вплив виражається у полегшенні викликаних нейронних реакцій через кілька хвилин після припинення прямої дії глутамату. Це вказує на те, що глутаматергічна нейромедіаторна система неокортексу здійснює пластичний вплив на активність кіркових нейронів, сприяючи тривалому полегшенню нейронних реакцій,

що виникають при умовнорефлекторній діяльності у природних умовах, забезпечуючи, тим самим, підсилення нейронних реакцій на послідовні подразники. У цьому полегшенні приймають участь НМДА-рецептори.

2. Ацетилхолін, при своєму виділенні у неокортексі, пригнічує вплив глутамату на фонову імпульсацію кіркових нейронів, але потенціює ефекти глутамату на нейронні реакції, що викликаються умовною стимуляцією.

3. Норадренергічна система при умовнорефлекторній діяльності через бета-адренорецептори пригнічує вплив глутамату як на фонову, так і на викликану активність нейронів неокортексу.

4. Дофамінергічна система мозку чинить тонічний пригнічуючий вплив на імпульсну активність кіркових нейронів у бадьорої тварини при здійсненні умовного рефлексу. Вплив глутамату на фонову імпульсацію нейронів кори при умовнорефлекторній діяльності дофамін пригнічує, але ефекти глутамату на нейронні реакції, що викликаються умовною стимуляцією, під впливом дофаміну потенціюються.

АПРОВАЦІЯ РОБОТИ. Основні матеріали дисертації демонструвались, доповідались та обговорювались на міжнародному симпозіумі "Дослідження мозку та суспільство" (Барселона, 1995), V Європейському Конгресі Невропатологів (Париж, 1996), семінарах сектору загальної фізіології нервової системи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, (Київ, 1991 - 1996).

ПУБЛІКАЦІЇ. За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових праць.

ДЕКЛАРАЦІЯ ОСОБИСТОГО ВНЕСКУ. Експериментальне дослідження, обробка, аналіз і викладення результатів, автором проведено самостійно.

ОБСЯГ ТА СТРУКТУРА РОБОТИ. Дисертація викладена на 191 сторінці машинописного тексту, ілюстрована 18 рисунками та 5 таблицями, складається із вступу, чотирьох розділів, висновків та списку цитованої літератури, який вміщує 76 вітчизняних та 196 зарубіжних джерел.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводились на половозрілих кішках-самцях масою 2,5 - 4 кг, в умовах хронічного експерименту. Був проведений аналіз активності 258 нейронів сенсомоторної кори. У даній роботі використовували харчовий інструментальний умовний рефлекс постановки лапи на опору (Amassian et al., 1972; Котляр и др., 1975). Під час вироблення умовного рефлексу та під час дослідів тварина знаходилась у напівжорсткому гамачку, у якому тудуб та задні кінцівки були у підвішеному стані, а передні кінцівки вільно звисали. Голова не фіксувалась.

Спочатку у тварини виробляли умовний рефлекс постановки лапи на опору у відповідь на пред'явлення умовного стимулу (звукового клацання), з послідовним харчовим підкріпленням (шматочок м'яса або риби). Потім тварину оперували під внутрішньочеревним наркозом (40 мг/кг, інтраперітоніально), вживляючи у кістки черепа, над представництвом відповідної передньої

лапи (поля 4, 6 по Вулсі) (Woolsey, 1958), полу втулку з харчової неіржавіючої сталі (наружний діаметр - 10 мм, внутрішній - 6 мм). Перед дослідом у втулку вставляли вкладиш, з внутрішнім каналом для мікроелектроду. На вкладиші жорстко закріплювали мікроманіпулятор. Для того, щоб мати можливість міняти місце відведення, застосовували набір вкладишів, які розрізнялись ексцентричним розташуванням внутрішнього каналу для мікроелектроду. Використовували трьохканальні скляні мікроелектроди (наружний діаметр кінчика становив 5 - 10 мкм), один канал яких призначався для реєстрації нейронної активності, а два інших - для іонофорезу синаптично активних речовин. Канал мікроелектроду, призначений для реєстрації імпульсної нейронної активності, заповнювали розчином NaCl, у концентрації 4 моль/л. Опір цього каналу становив 1 - 4 мОм. Канали, які використовувались для іонофорезу, заповнювали розчинами таких речовин: глутамат натрію - 0,5 моль/л (рН 8,4); кетамін гідрохлорид - 0,2 моль/л (рН 5,5); dl-2-аміно-5-фосфоновалеріанова кислота (АФК) - 40 ммоль/л (рН 8,0); кенуренат натрію - 50 ммоль/л (рН 8,4); ацетилхолін солянокислий - 0,5 моль/л (рН 4,0); пропранолол гідрохлорид - 3 ммоль/л (рН 4,5); галоперідол - 15 ммоль/л (рН 5,0).

Для мікроіонофорезу речовин використовували багатоканальне джерело струму. Сила струму іонофорезу, як правило, не перевищувала 40 нА. Величина струму підпору не перевищувала 10 нА.

З метою фіксації початку умовнорефлекторного руху вико-

ристовували черезшкірне відведення міограми.

Загальна схема проведення експериментів була такою. Спочатку реєстрували імпульсну активність окремого нейрону під час здійснення умовного рефлексу. Потім реєстрували нейронну активність того ж нейрону під час здійснення умовного рефлексу, використовуючи мікроіонофоретичне підведення речовин. Умовний стимул наносився на фоні аплікацій. Тривалість іонофореау звичайно становила п'ять секунд. Проміжки між окремими реалізаціями становили 1 - 2 хвилини. Після кожної серії реалізацій із застосуванням іонофореау робили відновну паузу (10 хвилин). Після цього реєстрували активність нейрону під час виконання умовного рефлексу (без використання іонофореау) через 5 - 10 хвилин після закінчення попередньої серії реалізацій.

Обробку одержаного експериментального матеріалу проводили за допомогою ЕОМ. Задля аналізу одержаних даних будували усереднені, тобто приведені до одної реалізації, гістограми двох типів: перистимульні, побудовані відносно моменту пред'явлення умовного стимулу, та гістограми, побудовані відносно початку умовнорефлекторного руху. Достовірність викликаних реакцій, при аналізі гістограм, визначали по перевищенню фонового рівня імпульсної активності більш ніж на два середньоквадратичних відхилення.

Використовуючи непараметричний критерій Вілкоксона для сполучених пар при $p < 0,05$ (Урбах, 1963), у деяких випадках порівнювали пари окремих бінів гістограм у різних ситуаціях (до, під час та після мікроіонофореау).

При аналізі одержаних даних, досліджували, переважно, такі параметри нейронної імпульсації:

1. Рівень фонові активності.
2. Нейронну реакцію, пов'язану з умовнорефлекторним рухом, яка представляє собою почашення нейронної імпульсації при виконанні постановчого руху, і яка виникала або одночасно з моментом початку рухової реакції, або після нього, або випереджуючи останній на 50 - 500 мс. Тривалість даної реакції звичайно не перевищувала 1,5 - 2 с.
3. Ранню реакцію на умовний звуковий стимул (кляцання), яка виникала з латентним періодом 50 - 100 мс, тривалістю до 500 мс.
4. Пізню реакцію, яка представляє собою підвищення частоти нейронних розрядів у проміжку між закінченням умовнорефлекторного руху та стриманням твариною харчового підкріплення. Тривалість даної реакції була досить варіабельною: від 500 мс до 3 с.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. ВПЛИВ МІКРОІОНОБОРЕЗУ ГЛУТАМАТУ ТА БЛОКАТОРІВ ГЛУТАМАТЕРГІЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ НА ІМПУЛЬСНУ АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ СЕНСОМОТОРНОЇ КОРИ ПІД ЧАС ЗДІЙСНЕННЯ УМОВНОГО РЕФЛЕКСУ

При вивченні впливу глутамату на активність кіркових нейронів під час здійснення інструментального умовного рефлексу була досліджена активність 156 нейронів.

Чутливість до мікроіонофоретичного підведення глутамату виявили 71% досліджених нейронів. Мікроіонофоретична аплікація глутамату викликала у більшості нейронів підвищення рівня фонові активності та приводила до покращення (збільшення інтенсивності, зменшення латентних періодів) нейронних реакцій, які викликались умовною стимуляцією. Іноколи мікроіонофоретична аплікація глутамату приводила до виникнення викликаних нейронних реакцій, таких як реакція, пов'язана з умовнорефлекторним рухом, рання реакція на умовний звуковий стимул, пізня реакція, які були відсутні початково.

У деяких випадках мікроіонофоретичні аплікації глутамату приводили до зміни типу нейронних реакцій, пов'язаних з умовнорефлекторним рухом. У десяти нейронів, у яких нейронна реакція, пов'язана з умовнорефлекторним рухом, початково виникала одночасно або після початку рухової реакції, на фоні мікроіонофорезу глутамату вона починала випереджувати момент початку руху. Нейрони, у яких реакція, пов'язана із постановочним рухом, початково випереджувала момент початку руху, під впливом глутамату виявляли збільшення часу випередження, починаючи раніше залучатися до реакції.

Було також виявлено, що зміни імпульсної нейронної активності, які виникали на фоні аплікації глутамату, продовжували виявлятися, у більшості нейронів, і через 5 - 10 хвилин після закінчення мікроіонофорезу.

З метою більш детального вивчення функціонування глутаматергічної синаптичної передачі у неокортексі, використовували

вали мікроіонофоретичне підведення до кіркових нейронів блокаторів НМДА типу глутаматних рецепторів: 2-аміно-5-фосфоновалеріанової кислоти (АФК), кенуренату та кетаміну. Мікроіонофоретичні аплікації даних блокаторів, під час здійснення умовного рефлексу, не виявляли переважного впливу (підсилюючого або пригнічуючого) на рівень фонові активності (крім кетаміну, аплікація якого приводила до зниження частоти фонові імпульсації), викликали зміни імпульсної нейронної активності, протилежні всім тим, які викликав глутамат, як під час аплікування, так і після нього. Ефекти даних блокаторів, виникаючи на фоні аплікацій, були ще більш виражені через кілька хвилин після закінчення іонофорезу, що вказує на поступовий, наростаючий характер впливу цих блокаторів.

2. ВПЛИВ ІЗОЛЬОВАНИХ АПЛІКАЦІЙ АЦЕТИЛХОЛІНУ ТА ЙОГО СПІЛЬНОГО АПЛІКУВАННЯ З ГЛУТАМАТОМ НА ІМПУЛЬСНУ АКТИВНІСТЬ КІРКОВИХ НЕЙРОНІВ ПРИ УМОВНОМУ РЕФЛЕКСІ

При дослідженні впливу іонофоретичної аплікації ацетилхоліну на імпульсну активність кіркових нейронів при виконанні умовного рефлексу була зареєстрована активність 24 нейронів. Зміни імпульсації 39 нейронів були досліджені при спільному одночасному аплікуванні ацетилхоліну та глутамату.

Мікроіонофоретичне підведення ацетилхоліну до нейронів сенсомоторної кори викликало зміну їх імпульсної активності у 62% випадків. Превалюючого впливу на частоту фонові імпульсації, мікроіонофорез ацетилхоліну практично не вияв-

ляв, у той час як викликана активність, у більшості випадків, покращувалась, а інколи і вперше з'являлась, будучи відсутньою початково.

Фонові імпульсація кіркових нейронів під час спільного мікроіонофореу ацетилхоліну та глутамату пригнічувалась, у порівнянні з ізольованим прикладанням глутамату. Однак, після закінчення спільного аплікування, домінування спрямованості змін вже не виявлялось. Викликана ж активність, під час спільного аплікування глутамату та ацетилхоліну, у протилежність змінам фонові активності, у більшості випадків зростала: підсилюючись у одинадцяти нейронів, у одного нейрону вона ослаблялася і у 14 нейронів залишалась без змін. Нейронні реакції, що викликаються умовною стимуляцією, були підсилені, у порівнянні з початковим рівнем, і через кілька хвилин після закінчення спільного мікроіонофореу.

3. ВПЛИВ МІКРОІОНОФОРЕТИЧНОЇ АПЛІКАЦІЇ БЕТА-АДРЕНОВЛОКАТОРУ ОБЗИДАНУ (ПРОПРАНОЛОЛУ) ТА ЙОГО СПІЛЬНОГО АПЛІКУВАННЯ З ГЛУТАМАТОМ НА АКТИВНІСТЬ НЕЙРОНІВ СЕНСОМОТОРНОЇ КОРИ ПІД ЧАС ЗДІЙСНЕННЯ УМОВНОГО РЕФЛЕКСУ

Використання обзидану в даній серії експериментів було обумовлено тим фактом, що у корі мозку, з адренотропних рецепторів поширені, в основному, бета-адренорецептори (Ильченко, Гилянский, 1971), що опосередковують вплив норадренергічної системи на активність нейронів неокортексу.

Зміни імпульсної активності при мікроіонофоретичній аплікації обзидану були досліджені у 23 нейронів. Активність

32 нейронів аналізувалась при спільних аплікаціях обидану та глутамату.

До мікроіонофоретичної аплікації обидану виявили реактивність 61% досліджених нейронів сенсомоторної кори. При його підведенні до кіркових нейронів під час здійснення умовного рефлексу, як фонова імпульсація останніх, так і нейронні реакції, викликані умовним подразником, у більшості випадків підсилювались. Інколи викликані нейронні реакції, будучи відсутні початково, вперше виникали на фоні мікроіонофорезу обидану.

При одночасному аплікуванні глутамату та обидану, рівень фонові активності та імпульсні реакції, викликані умовною стимуляцією, у більшості досліджених нейронів підвищувались, у порівнянні з ізольованим прикладанням глутамату.

Деякі нейрони виявляли підсилення, у порівнянні з початковим рівнем, як фонові імпульсації, так і викликаних нейронних реакцій, через 10 хвилин після припинення спільного мікроіонофорезу.

Характерно, що на фоні спільних аплікацій глутамату та обидану викликана активність підсилювалась, у порівнянні з ізольованим прикладанням глутамату, у тих нейронів, у яких рівень фонові активності при цьому не змінювався: з одинадцяти нейронів з підвищеним рівнем викликані активності, фонова активність залишалась без змін у семи.

4. ВПЛИВ ІОНОФОРЕТИЧНИХ АПЛІКАЦІЙ НЕСПЕЦИФІЧНОГО БЛОКАТОРУ ДОФАМІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ ГАЛОПЕРІДОЛУ ТА ЙОГО СПІЛЬНОГО МІКРОІОНОФОРЕЗУ З ГЛУТАМАТОМ НА АКТИВНІСТЬ КІРКОВИХ НЕЙРОНІВ ПРИ УМОВНОМУ РЕФЛЕКСІ

Вибір галоперідолу був обумовлений його блокуючою дією як на D₁-, так і на D₂-рецептори, що дозволяє повністю усунути дофамінергічні впливи.

У цій серії експериментів були досліджені зміни імпульсної активності 37 нейронів під час ізольованих аплікацій галоперідолу та 20 нейронів під час спільного мікроіонофорезу галоперідолу та глутамату.

Чутливість до мікроіонофоретичної аплікації галоперідолу виявляли 70% досліджених нейронів. Рівень фонові активності під час ізольованого мікроіонофорезу галоперідолу, підвищуючись у більшості нейронів під час самих аплікацій, не виявляв домінування спрямованості змін (як у бік підвищення, так і у бік зниження) після закінчення іонофорезу. Викликані ж нейронні реакції, покращуючись (а інколи і вперше виникаючи) на фоні мікроіонофорезу галоперідолу, виявляли дане підсилення і через 10 хвилин після припинення аплікацій.

При використанні спільного одночасного аплікування глутамату та галоперідолу, відмічалось підвищення рівня фонові активності, у порівнянні з ізольованим аплікуванням глутамату, у той час як викликана активність, у більшості нейронів, пригнічувалась. Заслугує на увагу той факт, що нейрони, відповідаючи підсиленню реакції, пов'язаної з умовно-

рефлекторним рухом, на ізольовані прикладання глутамату та галоперідолу, могли виявляти практично повне її зникнення при спільному одночасному аплікуванні цих речовин. Дане пригнічення продовжувало виявлятися і через кілька хвилин після закінчення спільного іонофорезу.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дана робота виконана на алертних, бадьорих тваринах, у хронічних експериментах, в умовах, близьких до природної поведінки тварини, що дозволяє, з деякими припущеннями, розглядати одержані данні, як відображаючі нейронну активність сенсомоторної кори при умовнорефлекторній діяльності у природних умовах. Дані припущення обумовлені, переважно, особливостями, притаманними методиці мікроіонофоретичного підведення синаптично активних речовин до нейронів неокортексу. Речовина, що аплікується мікроіонофоретично, імітуючи вплив певної нейромедіаторної (нейромодуляторної) системи, чинить дію на імпульсну активність не тільки того нейрону, що досліджується, але і на активність нейронів, розташованих поруч, які, маючи власну ергічність, можуть самі чинити той чи інший вплив на нейрон, активність якого реєструється. Однак, неважачи на ці та інші недоліки даної методики, та враховуючи те, що вона застосовувалася для дослідження нейронної активності бадьорого мозку, можна думати, що такий підхід дозволяє одержати цінні дані про вплив різних нейромедіаторних (нейромодуляторних) систем на активність нейронів неокортексу при умовнорефлекторній діяльності, а також

про взаємодію цих систем між собою при виконанні реальних функцій.

Мікроіонофоретична аплікація глутамату, при здійсненні умовного рефлексу, приводила до підвищення рівня фонової активності та покращувала (а в деяких випадках і вперше викликала) нейронні реакції, пов'язані з умовнорефлекторним рухом.

Раніше було встановлено (Котляр, 1989), що мікроіонофорез глутамату викликає короточасні слідові зміни фонової активності нейронів неокортексу, що вимірювалися секундами. Як показало наше дослідження, зміни, аналогічні тим, що виникали на фоні аплікацій, відмічалися як при нанесенні умовного стимулу відразу після закінчення мікроіонофорезу (через 2 секунди), так і через 5 - 10 хвилин, що вказує на досить тривалі слідові полегшувачі ефекти глутамату.

При аплікуванні блокаторів НМДА-рецепторів (АФК, кенуренату та кетаміну), фонова активність не виявляла домінування спрямованості змін (підвищення чи зниження), у той час як викликані нейронні реакції, у більшості нейронів пригнічувались.

Зміни як фонової, так і викликані активності, що виникали на фоні аплікацій блокаторів глутаматної передачі, продовжували спостерігатися через 5 - 10 хвилин після закінчення мікроіонофорезу, будучи навіть підсилені, у порівнянні з початковим рівнем та тими, які відмічалися на фоні аплікацій. Це може вказувати на те, що для розвинення ефекту даних блокаторів необхідний певний проміжок часу і їх дія

розвивається поступово.

Можна думати, що глутаматергічна нейромедіаторна система неокортексу у природних умовах сприяє полегшенню нейронних реакцій, що виникають при умовнорефлекторній діяльності, мало беручи участь в організації фонові активності. Своєю полегшуючою дією на нейронні реакції глутамат здійснює мабуть за участю НМДА-рецепторів.

Однак, глутамат, діючи на нейрональну мембрану, активує не тільки іонотропні, але й метаботропні глутаматні рецептори. Впливаючи, через останні, на внутрішньоклітинний метаболізм, глутамат також може обумовлювати довготривалі зміни в імпульсній нейронній активності (Nakanishi, 1992; Pin, Duvoisin, 1995). Таким чином, показаний нами довготривалий слідовий полегшуючий вплив глутамату на викликані нейронні реакції при здійсненні умовного рефлексу, може забезпечуватися функціонуванням як іонотропних глутаматних рецепторів, так і метаботропних, на що раніше вказували і інші автори (Lo Turco et al., 1990; McCormick, 1992). Однак, ці дані, на відміну від результатів нашої роботи, відносно участі НМДА-рецепторів у слідових ефектах глутамату, були одержані *in vitro*.

Крім того, при вивченні впливу глутамату на імпульсну нейронну активність, не можна не враховувати міжрецепторну взаємодію між іоно- та метаботропними глутаматними рецепторами (Aniksztejn et al., 1992; Bleakman et al., 1992; Colwell, Levine, 1994).

Таким чином, на нашу думку, одним із аспектів функціо-

нування глутаматергічної системи кори є її пластичний вплив на неокортекс, що створює умови для більш ефективного реагування кіркових нейронів при наступних умовнорефлекторних реакціях.

Рівень фонової активності, при мікроіонофоретичних аплікаціях ацетилхоліну на нейрони сенсомоторної кори під час здійснення інструментального умовного рефлексу, не виявляв превалювання у спрямованості змін: кількість нейронів, які підвищували та знижували свою фонову активність, була, приблизно, однакова. У той же час, реакції, які викликалися умовною стимуляцією, були покращені, що вказує на полегшуючий вплив ацетилхоліну на викликану активність.

Дані, одержані при спільному аплікуванні глутамату та ацетилхоліну, оцінювались шляхом порівняння з аналогічними даними при ізольованому прикладанні глутамату. Спільна мікроіонофоретична аплікація глутамату та ацетилхоліну призводила до зниження рівня фонової активності нейронів під час самої аплікації. Однак, після закінчення спільного мікроіонофорезу домінування спрямованості змін фонової активності виявлено не було. Викликана ж активність, як на фоні спільних аплікацій, так і 5 - 10 хвилин потому, була більш вираженою і виникала з меншим латентним періодом, ніж при ізольованих аплікаціях глутамату.

В експериментах, проведених на наркотизованих тваринах (Metherate et al., 1987; Metherate et al., 1988b; Tremblay et al., 1990a; Tremblay et al., 1990b), було показано, що ацетилхолін, при спільній аплікації з глутаматом, підсилював

ефекти останнього. Це відносилось як до фонової, так і до викликаної активності. Результати, одержані в нашій роботі, виконаній на бадьорих тваринах, крім самого факту модулювання ацетилхоліном ефектів глутамату, демонструють також різну спрямованість модулюючого впливу ацетилхоліну на зміни фонові та викликані умовним стимулом активності, які викликаються глутаматом.

Ізольована мікроіонофоретична аплікація блокування бета-адренорецепторів обидану призводила як до підвищення рівня фонові активності, так і до покращення всіх, що досліджувалися нами, викликаних нейронних реакцій, шр, з урахуванням переважування в неокортексі бета-адренорецепторів (Ильченко, Гишинский, 1971), співпадає з даними інших дослідників про гальмівний вплив норадренергічної системи *in vivo* на фонову та викликану активність (Reader et al., 1979; Сторожук и др., 1990а).

Літературні дані відносно спрямованості впливу норадреналіну на глутаматвикликану активність кіркових нейронів достатньо суперечливі (Waterhouse, Woodward, 1980; Armstrong-James, Fox, 1983; Bassant et al., 1990b). Згідно результатам, одержаним в нашій роботі, під час мікроіонофоретичної аплікації обидану спільно з глутаматом, відбувалося полегшення ефектів останнього, що вказує на те, що норадренергічна система неокортексу, при своєму функціонуванні в природних умовах, очевидно, пригнічує вплив глутамату на імпульсну активність кіркових нейронів.

Дані літератури про вплив дофамінергічної системи на

імпульсну активність кіркових нейронів також неоднозначні (Krnjevic, 1967; Bunney, Aghajanian, 1976; Reader et al., 1979; Sawaguchi et al., 1990a; Sawaguchi et al., 1990b). Згідно нашим даним, блокатор дофамінових рецепторів галоперідол, під час свого ізолюваного мікроіонофоретичного підведення до нейронів сенсомоторної кори, при здійсненні умовного рефлексу, істотно підвищував рівень фонові активності, не виявляючи домінування спрямованості змін після завершення мікроіонофорезу. Викликана ж активність, становлячись більш вираженою на фоні аплікації галоперідолу, продовжувала залишатися підсиленою і через 10 хвилин після закінчення іонофорезу.

Важливим є те, що зміни в імпульсній активності нейронів при аплікуванні галоперідолу виникали при достатньо малих значеннях струмів форезу (5-20 нА), що вказує на високу чутливість нейронів неокортексту до дофамінергічних впливів.

При сполученому одночасному мікроіонофорезі глутамату та галоперідолу, зміни фонові та викликані активності були різноспрямовані: рівень фонові активності, у більшості нейронів, підвищувався під час аплікацій, у той час як викликана активність на фоні спільного аплікування пригнічувалась, у порівнянні з ізолюваним підведенням глутамату. Причому, погіршення викликаних реакцій при спільних аплікаціях глутамату та галоперідолу, розвивалося при їх покращенні на фоні попередніх ізолюваних підведень цих речовин. Це можна спробувати пояснити тим, що галоперідол, являючись блокатором як D₁-, так і D₂-рецепторів, сполучених тим чи іншим чи-

ном з аденілатциклазою системою, може, шляхом зміни активності останньої, сприяти усуненню полегшуючого впливу глутамату, який може здійснюватися також за участю аденілатциклазої системи. Це добре узгоджується із фактом зміни активності аденілатциклази, що викликається активацією деяких підтипів метаботропних глутаматних рецепторів (Nakanishi, 1992).

Незалежні, а іноді і різноспрямовані, зміни фонової та викликаної умовною стимуляцією нейронної імпульсної активності, які спостерігалися нами при аплікуванні деяких синаптично активних речовин, можуть бути обумовлені або задученням різних типів рецепторів до речовини, що аплікується, або, що більш вірогідно, активацією різноякісних синаптичних входів під час здійснення умовного рефлексу.

ВИСНОВКИ

У експериментах на бадьорих кішках, в умовах близьких до природної поведінки тварин, було проведено дослідження впливу мікроіонофоретичної аплікації глутамату та блокаторів глутаматергічної синаптичної передачі на імпульсну активність нейронів сенсомоторної кори під час здійснення умовного рефлексу, а також модулювання ефектів глутамату в неокортексі такими нейромедіаторними (нейромодуляторними) системами мозку як холінергічна, норадренергічна та дофамінергічна.

1. Встановлено, що глутамат, викликаючи підсилення нейронної активності під час самої аплікації, виявляє також і слідові ефекти, які проявляються у полегшенні викликаних

нейронних реакцій через 10 хвилин після закінчення мікроіонофорезу. При блокуванні НМДА-рецепторів, превалювання спрямованості змін фонової активності не виявляється, однак нейронні реакції, які викликаються умовною стимуляцією, явно пригнічуються, як на фоні аплікації блокаторів, так і після її завершення. Це дозволяє заключити, що в природних умовах глутаматергічна система неокортексу, мало беручи участь в організації фонової активності кіркових нейронів, сприяє тривалому полегшенню нейронних реакцій, які виникають при умовнорефлекторній діяльності, забезпечуючи тим самим підсилення нейронних реакцій на послідовні подразники. У цьому полегшенні беруть участь НМДА-рецептори.

2. Мікроіонофоретична аплікація ацетилхоліну, не чинячи домінуючого збуджуючого чи гальмівного впливу на рівень фонової активності кіркових нейронів, у більшості випадків полегшує нейронну активність, що викликається умовною стимуляцією. Вплив глутамату на фонову активність нейронів неокортексу ацетилхолін пригнічує, але потенціює його ефекти на викликані нейронні реакції.

3. Аплікація бета-адреноблокатору, обидану призводить як до підвищення рівня фонової активності нейронів неокортексу, так і до покращення викликаних реакцій, що говорить про опосередкування бета-адренорецепторами тонічного пригнічуючого впливу норадренергічної системи кори на імпульсну активність нейронів при умовнорефлекторній діяльності. Обидан, при аплікуванні спільно з глутаматом, підсилює ефекти глутамату по відношенню як до фонової, так і до викликані

активності. Виходячи з цього, можна зробити висновок про те, що норадренергічна система, через бета-адренорецептори, пригнічує вплив глутаматергічної системи на активність кіркових нейронів під час здійснення умовного рефлексу.

4. Мікроіонофоретичне підведення неспецифічного блокатору дофамінових рецепторів галоперідолу до нейронів сенсомоторної кори, під час здійснення умовного рефлексу, підвищує рівень фонові активності та полегшує викликані нейронні реакції. Його полегшувачий вплив виявляється і через 10 хвилин після закінчення аплікації. Це говорить про тонічне пригнічення дофамінергічною системою імпульсної активності кіркових нейронів у бадьорої тварини при умовному рефлексі.

5. Під час спільного аплікування галоперідолу та глутамату, галоперідол підсилює вплив глутамату на фонову активність та пригнічує його дію на нейронні реакції, які викликаються умовною стимуляцією, що говорить про те, що дофамінергічна система, в природних умовах, пригнічує підсилюючий ефект глутамату на фонову активність, у той час як полегшувача дія глутамату на нейронні реакції, які викликаються умовною стимуляцією, під впливом дофаміну потенціюється.

6. Глутаматергічна нейромедіаторна система неокортексу, під час умовнорефлекторної діяльності в природних умовах, постійно відчуває на собі потужні різноспрямовані модулюючі впливи з боку різних екстраталамічних нейромедіаторних (нейромодуляторних) систем мозку.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сторожук В. М., Иванова С. Ф., Санжаровский А. В. Участие глутаматных внутрикорковых связей в условнорефлекторной деятельности // *Нейрофизиология.* -1992. -24, N 6. -С. 701-712.
2. Сторожук В. М., Санжаровский А. В., Трофимчук Л. И. Нейронная активность сенсомоторной коры при осуществлении условного рефлекса на фоне блокирования дофаминергической передачи // *Нейрофизиология.* -1994. -26, N 5. -С. 347-355.
3. Storozhuk V. M., Sanzharovsky A. V., Sachenko V. V. Modulation of glutamatergic inputs of cortical neurons by extrathalamic structures // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* -1995. -54, Supplement. -84S.
4. Storozhuk V. M., Sanzharovsky A. V., Sachenko V. V. Direct and indirect aminergic influences on neuronal activity in neocortex // *Neuropathology and Applied Neurobiology.* -1996. -22, Suppl. I, P. 52-53.
5. Storozhuk V. M., Sanzharovsky A. V., Sachenko V. V. Interaction of glutamatergic and adrenergic inputs of cortical neurons during conditioning // *Neuroscience.* -1997. -76, N 3. -P. 877-894.

Sanzharovsky A.V. Modulation of influence of glutamate on activity of neurons of cortex during conditioned reflex. The dissertation (manuscript) is presented in accordance with requirements for the degree of candidat of medical sciences in the speciality 14.03.03 - Normal Physiology (Medical Sciences). A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1997.

We studied influence of the microiontophoretic application of glutamate and its blockers on impulse activity of the sensorimotor cortex neurons of the awake cats, under conditions approximate natural behaviour of the animals, during fulfilment of conditioned instrumental placing reflex, and also changes of the effects of glutamate during application others synaptically active substances, which characterize cholinergic, noradrenergic and dopaminergic influences on neocortex. It was shown a long-term improving influence of the microiontophoretic application of glutamate on the activity of cortical neurons during of conditioned reflex, and also participation NMDA-receptors in present effect. It was demonstrated the powerful diverse modulating influences on effects of glutamate by cholinergic, noradrenergic and dopaminergic systems of the brain during conditioning.

Санжаровский А.В. Модуляция влияния глутамата на активность нейронов коры при условном рефлексе. Диссертация (рукопись) на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - нормальная физиология (медицинские науки). Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, 1997.

Исследовали влияние микроионофоретического апплицирования глутамата и его блокаторов на импульсную активность нейронов сенсомоторной коры бодрствующей, необездвиженной кошки, в условиях близких к естественному поведению животного, во время осуществления инструментального условного рефлекса постановки лапы на опору, а также изменение эффектов глутамата при апплицировании других синаптически активных веществ, отражающих холинергические, норадренергические и дофаминергические влияния на неокортекс. Показано продолжительное следовое облегчающее влияние микроионофореза глутамата на активность корковых нейронов при условном рефлексе, а также участие NMDA-рецепторов в данном облегчении. Премонстрированы мощные разнонаправленные модулирующие влияния на эффекты глутамата, со стороны холинергической, норадренергической и дофаминергической систем мозга, при условном рефлексе.

Ключові слова: неокортекс, умовний рефлекс, глутамат, ацетилхолін, обзидан, галоперідол.

442184

AV 36.925