

УДК 612.825:612.822

О. В. Денисенко, ст. викл., **Т. В. Бузика**, асп., **Л. І. Сьомік**, канд. біол. наук, доц., **Л. М. Карпов**, д-р біол. наук, проф.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра фізіології людини та тварин,
вул. Дворянська 2, Одеса, 65026, Україна.
Тел.: (048) 776-01-28, e-mail: ksenia_den@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ НЕЙРОНАЛЬНОЇ АКТИВАЦІЇ СЕНСОМОТОРНОЇ КОРИ ЩУРІВ ПРИ АПЛІКАЦІЇ ГЛУТАМАТУ

У гострих дослідах на ненаркотизованих, знерухомлених щурах внутрішньо- та позаклітинно реєстрували реакції нейронів сенсомоторної кори головного мозку до та після аплікації глутамату. Показано, що при аплікації глутамату спостерігається активація не тільки глутаматергічної синаптичної передачі, але і гальмівної. Генерація синхронізованої активності у виді пароксизмальних деполаризаційних зміщень мембранного потенціалу в усіх випадках супроводжується розвитком слідових гіперполяризаційних потенціалів (СГП). У верхніх та глибинних шарах СГП мали різний компонентний склад. Аналізуючи позаклітинну активність, виявили, що імпульсація нейронів V–VI шарів значно зростала по частоті та амплітуді. У цих шарах реєстрували посилення "пачкоподібного" типу активності зі зростанням тривалості міжімпульсних інтервалів. При введенні неспецифічного антагоніста NMDA-рецепторів — кетаміну — достовірні зміни параметрів імпульсації відбувалися тільки у клітинах глибинних шарів.

Ключові слова: сенсомоторна кора, глутамат, пароксизмальна активність, кетамін.

Відомо, що глутамат є одним із основних медіаторів постсинаптичного збудження в гіпокампі, корі головного мозку та інших відділах ЦНС [1]. Нейромедіаторна система збуджуючих амінокислот, зокрема L-глутамату, є чільною збуджуючою системою головного мозку та відіграє важливу роль у регуляції психічних функцій, моторної активності, сприйнятті сенсорної інформації та інших фізіологічних актах. Чисельні патологічні прояви, зокрема судомні стани, гіпоксія головного мозку, деякі харчові отруєння пов'язані з порушенням нормальної роботи глутаматергічної нейропередачі. Однак, дослідження *in vivo* особливостей нейрональної гіперактивації і, як наслідок, виникнення патологічно зміненого типу активності нейронів залишаються актуальними і на цей час.

Мета роботи полягала у вивченні впливу аплікації глутамату на особливості змін нейрональної активності у різних шарах сенсомоторної кори мозку щурів. У зв'язку з цим до задач дослідження входило:

1. Вивчити модуляцію збуджуючої та гальмівної синаптичної коркової передачі при внутрішньоклітинній реєстрації в умовах аплікації глутамату;
2. Дослідити вплив аплікації глутамату на пошарову динаміку коркової позаклітинної нейрональної активності;
3. При застосуванні кетаміну вивчити можливу роль NMDA-рецепторів нейронів різних шарів у розвитку коркової нейрональної гіперактивації.

Матеріали та методи дослідження

Експерименти були проведені на 19 щурах лінії Вістар вагою 200–270 г. Підготовчі операції здійснювали під етаміналовим наркозом (30 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Усі точки фіксації, ранові поверхні обробляли розчином новокаїну. Протягом досліду тварину знерухомлювали за допомогою d-тубокурарину (10 мг/кг) і переводили на штучне дихання. На протязі експерименту безперервно реєстрували електрокортикограму (ЕКoГ) та електрокардіограму (ЕКГ). Оголювали сенсомоторну зону нової кори. Внутрішньокоркові подразнення здійснювали монополярно прямокутними імпульсами струму (1–40 В, 0,2 мс) за допомогою ніхромового електрода (діаметр 200 мкм). Біля подразнюючого електрода розташовували смужку фільтрувального паперу розміром 2 мм x 2 мм, на якому знаходилась канюля, з'єднана з мікрошприцом. Його наповнювали розчином у фізіологічному розчині L-глутаматом ("Sigma", США; 50 мкМ), який подавали до кори в об'ємі біля 10 мкл.

Позаклітинну активність нейронів відводили скляними мікроелектродами з опором 7–15 МОм, які були заповнені розчином ацетату калію (3,0 М). Мікроелектроди для внутрішньоклітинних відведень були заповнені розчинами цитрату калію (2,0 М), КСl (2,0 М) з опором 20–40 МОм. Трепанаційний отвір після встановлювання електродів і канюлі заливали теплим 3% розчином агар-агару. Після розвитку глутамат-викликаної активності здійснювали внутрішньовенне (в/в) введення у хвостову вену розчину кетаміну (10 мг/кг).

Всі одержані результати обробляли статистично із розрахунком середнього значення та стандартного відхилення, а також довірчого інтервалу (P), що використовувався для оцінки ступеня вірогідності відмінностей за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності вважалися статистично вірогідними при $P < 0,05$. Криві, які відображають електрофізіологічні процеси при внутрішньоклітинних реєстраціях, є суперпозиціями декількох реакцій нейронів.

Результати дослідження та їх обговорення

На внутрішньокоркові подразнення до та після поверхневої аплікації розчину L-глутамату внутрішньоклітинно були зареєстровані реакції 11 нейронів сенсомоторної кори головного мозку щурів.

Більша частина досліджених клітин ($n = 10$) знаходилася на глибині III–VI шарів. Нейрони на ВКП відповідали стандартними реакціями типу: збуджуючий постсинаптичний потенціал (ЗПСП)-гальмівний постсинаптичний потенціал (ГПСП), ЗПСП-пік-ГПСП (рис. 1, А-В). Амплітуда ЗПСП в середньому складала $7,5 \pm 0,3$ мВ, а їх тривалість $18,1 \pm 0,1$ мс. Амплітуда та тривалість ГПСП в середньому складала $5,0 \pm 0,6$ мВ і $140,5 \pm 7,0$ мс. Величина мембранного потенціалу (МП) нейронів в середньому складала $51,5 \pm 1,0$ мВ. Після аплікації глутамату зареєстрували реакції 9 клітин. При цьому розвиток синхронізованої пароксизмальної активності супроводжувався збільшенням амплітуди та тривалості збуджуючих постсинаптичних реакцій з виникненням хвилі пароксизмального деполяризаційного зміщення (ПДЗ) МП (рис. 1, Г1, Д1). Амплітуда та тривалість ПДЗ в середньому досягали $21,0 \pm 2,0$ мВ та $112,0 \pm 4,7$ мс відповідно. Крім того, при активації глутаматних рецепторів відбувалася модуляція гальмівної синаптичної передачі. Усі зареєстровані реакції супроводжувалися слідовими гіперполяризаціями. У різних шарах кори можна було виділити короткі (тривалістю 100–250 мс) і тривалі (400–1000 мс) слідові гіперполяризаційні потенціали (СГП) (рис. 1, Г2, Д2). Короткі гіперполяризації можна було зареєструвати на глибині II–III шарів, а тривалі — на глибині IV–VI шарів. За допомогою мікроелектродів, заповнених КСІ, здійснювали реверсію хлорних струмів СГП. СГП верхніх шарів були СІ-опосередковані, а тривалі — мали складну природу і склалися не менш, ніж із двох компонентів. Висока щільність ГАМК_A-рецепторів виявлена саме у верхніх шарах, а низька — у V–VI [2].

Часовий перебіг розвитку синхронізованих розрядів свідчить про те, що при посиленні деполяризаційного потенціалу пригнічення міг зазнавати ранній СІ-залежний компонент СГП із збереженням пізнього.

Дані, отримані при позаклітинних відведеннях, показали, що аплікація глутамату призводить до збільшення ефективності синаптичної передачі по всіх шарах неокортексу. Оцінювали амплітуду (рис. 2), частоту (рис. 3) та тривалість міжімпульсних інтервалів (рис. 4) активності нейронів у кожному шарі. Різні варіанти імпульсації клітин можна поділити на три типи: поодинокі

Реверсію хлорного компоненту слідової гіперполяризації здійснювали за допомогою мікроелектродів, які заповнювали розчином КСІ спайки; спайки, згруповані у вигляді окремих "пачок"; проміжні або сумісні форми. Зареєстрований до аплікації тип активності за основними параметрами не відрізнявся від того, що був описаний раніше [3]. При аплікації глутамату активації підпадали клітини усіх шарів сенсомоторної зони кори. Найбільше посилення збуджуючої передачі проявлялося зміною параметрів імпульсації нейронів V та VI шарів, які реагували значним зростанням частоти та амплітуди активності. У меншій мірі ці ж зміни спостерігали з боку активності нейронів верхніх шарів (рис. 2, 3).

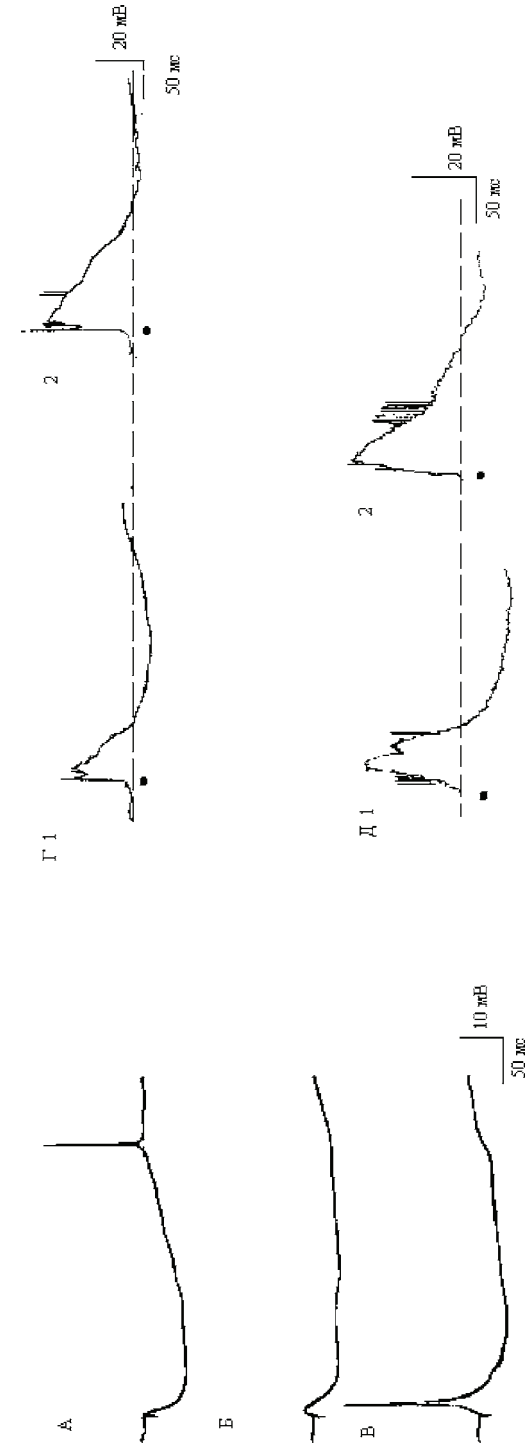


Рис. 1. Постсинаптичні реакції нейронів сенсорної кори щурів до (А, В, В) і після аплікації глутамату (Г, Д): А — первинний ГПСП; В — ЗПСП-ГПСП; В — ЗПСП-пік-ГПСП; Г — пароксизмальне деполаризаційне зміщення (ПДЗ) мембранного потенціалу з короткою слідвою гіперполяризації (розвивалася у нейронів II, III шарів) до та після реверсії хлорного току; Д — ПДЗ МП нейронів та тривала слідва гіперполяризація (розвивалася у нейронів V, VI шарів) до та після реверсії хлорного току

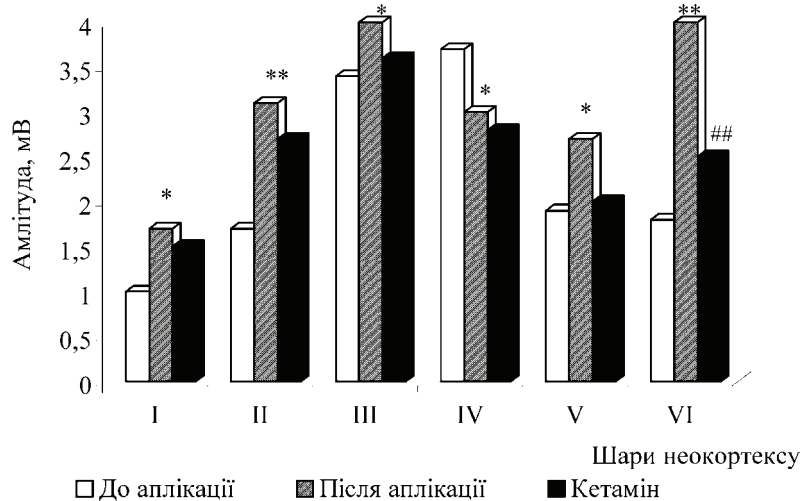


Рис. 2. Пошарові відмінності амплітуди нейрональної активності після аплікації глутамату і введення кетаміну

Примітка: * — $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — достовірні розходження амплітуди імпульсації нейронів до аплікації глутамату щодо амплітуди після аплікації глутамату; ## — $p < 0,01$ — достовірне розходження амплітуди імпульсації нейронів після аплікації глутамату щодо амплітуди після введення кетаміну.

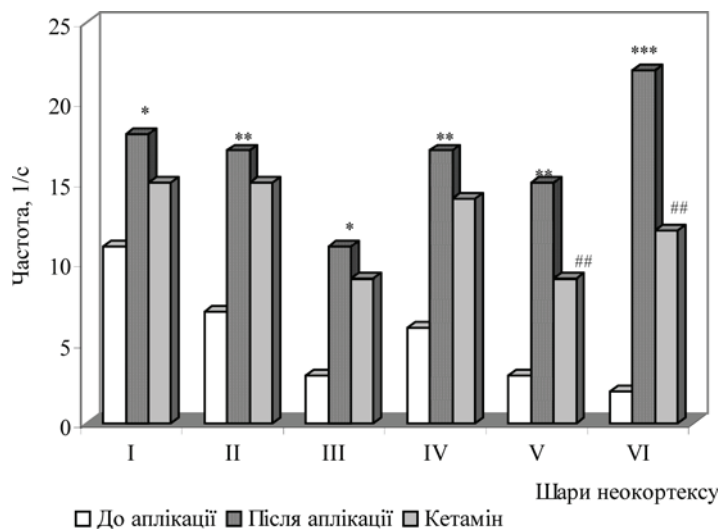


Рис. 3. Пошарові відмінності частоти імпульсації нейрональної активності після аплікації глутамату і введення кетаміну

Примітка: * — $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — достовірні розходження частоти імпульсації нейронів до аплікації глутамату щодо частоти після аплікації глутамату; ## — $p < 0,01$ — достовірне розходження частоти імпульсації нейронів після аплікації глутамату щодо частоти після введення кетаміну.

Особливості гіперактивації нейронів сенсомоторної кори узгоджуються з даними літератури про важливу роль нейронів глибинних шарів кори у збуджуючій синаптичній передачі [4].

В цілому, при активації виявили два різних варіанти змін рисунка фонові імпульсації нейронів II–III та V, VI шарів. В глибинних шарах реєстрували посилення "пачкоподібного" типу та збільшення частоти спайків у групі і тривалості генерації "пачок" (у VI шарі тривалість складала до аплікації — 655 ± 78 мс, після аплікації — 1581 ± 44 ; у V шарі до аплікації — 406 ± 21 мс, після — 766 ± 34). В той же час у II–III шарах не спостерігали значних змін у типі генерації активності, яка переважно була представлена нетривалими "пачками" спайок або, на відміну від глибинних шарів, поодинокими спайками. Слід зазначити, що одночасно у VI шарі відбувалося підвищення тривалості міжімпульсних інтервалів (рис. 4). Відомо, що у самій корі є перемикаюча система — вставлена гальмівна, клітини якої мають глутаматчутливі рецептори.

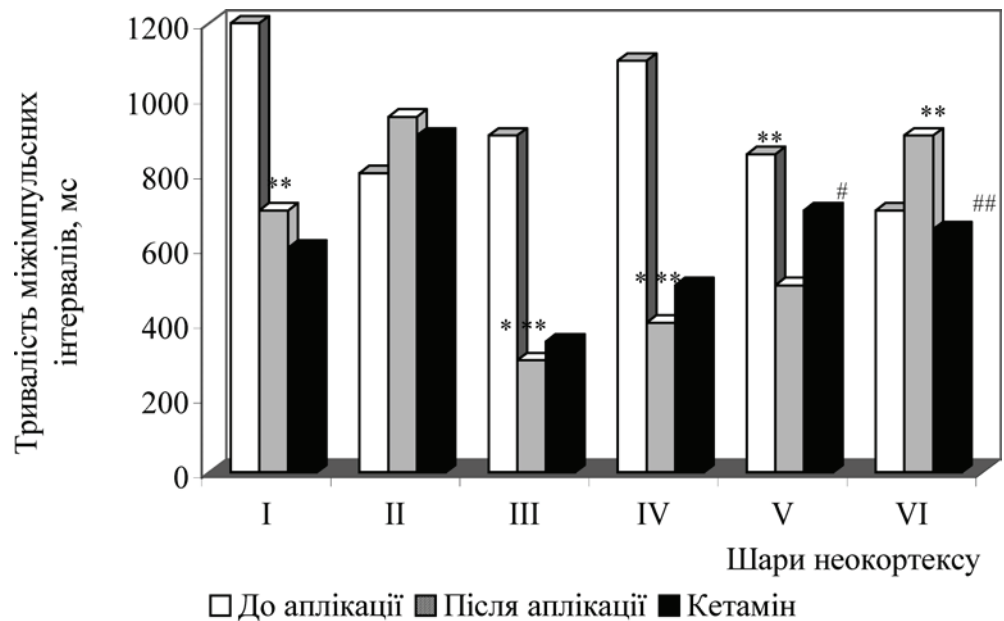


Рис. 4. Пошарові відмінності тривалості міжімпульсних інтервалів нейрональної активності після аплікації глутамату і введення кетаміну

Примітка: ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$ — достовірні розходження тривалості межімпульсних інтервалів нейрональної активності до аплікації глутамату щодо аналогічного показника після аплікації глутамату; # — $p < 0,1$; ## — $p < 0,01$ — достовірне розходження тривалості межімпульсних інтервалів нейрональної активності після аплікації глутамату щодо аналогічного показника після введення кетаміну.

На нейронах, які отримують аферентну імпульсацію, зокрема зірчастих IV шару та сусідніх ділянок III і V шарів, ці рецептори широко представлені. В цілому, зсув в бік підвищення упорядкованості імпульсного потоку, що відповідає посиленню "пачкоподібного" типу активності зі зростанням інтервалів "мовчання" між цими групами імпульсів, може бути пов'язаний з активацією вище згаданих зірчастих гальмівних клітин [5], аксони яких направляються до верхніх та нижніх шарів. Це сприяє синхронізації активності нейронів з посиленням збуджуючих синаптичних впливів по усьому поперечнику кори. Слід додати, що за внутрішньоклітинних відведень активності від нейронів V–VI шарів розвиток ПДЗ часто супроводжується тривалими слідовими гіперполяризаціями.

За проведення експериментів з неспецифічним антагоністом NMDA-рецепторів — кетаміном — спостерігали незначне зменшення нейротоксичного вкладу глутамату у розвиток патологічного збудження в корі. З'ясували, що при в/в введенні кетаміну на фоні гіперактивації нейрональної активності відбуваються достовірні зміни параметрів імпульсації тільки у клітин глибинних шарів. Після введення кетаміну внутрішньоклітинна реєстрація нейронів III та IV шарів ($n = 3$) не виявила значних змін у перебігу пароксизмальних розрядів. Однак, слід зазначити, що високочастотна (30–40 Гц) внутрішньокоркова стимуляція нейронів не викликала ефекту підвищення патологічного ритму на відміну від результатів, отриманих в умовах аплікації тільки глутамату. За даними літератури, на відміну від гіпокампу, де NMDA і не-NMDA-рецептори мають спільне постсинаптичне розташування [6], у сенсомоторній корі виявляють шари з більшим або меншим представництвом цих рецепторно-каналних комплексів [7]. Виявлено, що на нейронах глибинних шарів у більшому ступені, в порівнянні з іншими шарами, представлена NMDA-рецепція [8]. При цьому інтернейрони середніх шарів не чутливі до блокаторів NMDA-рецепторів і регулюються виключно через не-NMDA-трансмісію [7].

Необхідно відмітити, що за аплікації глутамату ми спостерігали активацію не тільки глутаматергічної системи, але і гальмівної. Аналіз внутрішньо- та позаклітинних відведень показує, що посилення та синхронізація нейрональної імпульсації перед усім відбувається за активації глутаматергічних входів пірамідних нейронів. В міру залучення поворотних шляхів, ритмічного потенціювання, зокрема ГАМК_A-рецепторів, вірогідно, і формується патологічний тип активності. Результати великої кількості досліджень *in vitro* на гіпокампі, різних коркових ділянках з використанням експериментальних моделей без блокування ГАМК_A-рецепторів вказують на розвиток повільної ГАМК_A-залежної деполаризації [9, 10]. Можливо, що модуляція ГАМК_A-ергічної передачі з гальмівної на збуджуючу, при одночасному посиленні глутаматергічної трансмісії, й призводить до розвитку потужної синхронізова-

ної високоамплітудної пароксизмальної активності у пірамідних нейронах верхніх та глибинних шарів.

Отримані результати можуть бути використані за подальшого вивчення механізмів взаємодії збуджуючої та гальмуючої синаптичної передачі, сприяти розумінню особливостей пошкоджуючої дії збуджуючих амінокислот при розвитку розладів ЦНС різної природи.

Висновки

1. За аплікації глутамату активації підпадали клітини усіх шарів сенсомоторної зони кори. Найбільш значні зміни параметрів імпульсації виявили у нейронів V та VI шарів.
2. Посилення нейрональної активності після аплікації глутамату супроводжується активацією не тільки глутаматергічної синаптичної передачі з розвитком пароксизмальних деполяризаційних зміщень мембранного потенціалу, але й гальмівної передачі. У всіх випадках внутрішньоклітинної реєстрації пароксизмальні деполяризаційні зміщення супроводжуються слідовими гіперполяризаційними потенціалами.
3. При введенні кетаміну спостерігається незначне зменшення нейротоксичного впливу глутамату на розвиток патологічного збудження у корі. З'ясувалось, що його застосування на фоні гіперактивації достовірно змінює нейрональну активність тільки у клітинах глибинних шарів кори.

Література

1. Johnson J. W., Koerner J. E. Excitatory amino acid neurotransmission // *J. Med. Chem.* — 1988. — Vol. 31. — P. 2057–2066.
2. Timofeev I., Grenier F., Steriade M. The role of chloride-dependent inhibition and the activity of fast-spiking neurons during cortical spike-wave electrographic seizures // *Neuroscience.* — 2002. — Vol. 114. — P. 1115–1132.
3. Чиженкова Р. А. Структурно-функциональная организация сенсомоторной коры. — М.: Наука, 1986. — 240 с.
4. Лопанцев В. Э., Тараненко В. Д., Одинцова Т. Б. Постсинаптические компоненты пароксизмальных реакций нейронов стрихнинизированной новой коры мозга // *Нейрофизиология.* — 1990. — Т. 22, № 5. — С. 642–643.
5. Zhou F. M., Hablitz J. J. Metabotropic glutamate receptor enhancement of spontaneous IPSPs in neocortical interneurons // *J. Neurophysiol.* — 1997. — Vol. 78, N 5. — P. 2287–2295.
6. Bekkers J. M., Stevens C. F. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus // *Nature.* — 1989. — Vol. 341. — P. 230–233.
7. Ling D. S., Benardo L. S. Recruitment of GABA_A inhibition in rat neocortex is limited and not NMDA dependent // *J. Neurophysiol.* — 1995. — Vol. 74, N 6. — P. 2329–2335.
8. Flint A. C., Connors B. W. Two types of network oscillations in neocortex mediated by distinct glutamate receptor subtypes and neuronal populations // *J. Neurophysiol.* — 1996. — Vol. 75, N 2. — P. 951–957.

9. *On the origin of interictal activity in human temporal-lobe epilepsy in vitro* / I. Cohen, V. Navarro, S. Clemenceau, M. Baulac, R. Miles // *Science*. — 2002. — Vol. 298. — P. 1418–1421.
10. *Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA 1 pyramidal cell* / Y. Fujiwara-Tsucamoto, Y. Isomura, A. Nambu, M. Takada // *Neuroscience*. — 2003. — Vol. 119. — P. 265–275.

О. В. Денисенко, Т. В. Бузыка, Л. И. Семик, Л. М. Карпов

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра физиологии человека и животных,
ул. Дворянская 2, Одесса, 65026, Украина

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ СЕНСОМОТОРНОЙ КОРЫ КРЫС ПРИ АППЛИКАЦИИ ГЛУТАМАТА

Резюме

В острых опытах на ненаркотизированных обездвиженных крысах внутри- и внеклеточно регистрировали реакции нейронов сенсомоторной коры головного мозга до и после аппликации глутамата. Показано, что при аппликации наблюдается активация не только глутаматергической синаптической передачи, но и тормозной. Генерация синхронизированной активности в виде пароксизмальных депполяризационных сдвигов мембранного потенциала во всех случаях сопровождалась развитием следовых гиперполяризационных потенциалов (СПП). В верхних и нижних слоях коры СПП имели разный компонентный состав. Анализируя внеклеточную активность, выявили, что импульсация нейронов V–VI слоев значительно увеличивалась по частоте и амплитуде. В этих слоях регистрировали усиление "пачкоподобного" типа активности с увеличением длительности межимпульсных интервалов. При введении неспецифического антагониста NMDA-рецептора — кетамина — достоверные изменения параметров импульсации отмечались только в глубоких слоях коры.

Ключевые слова: сенсомоторная кора, глутамат, пароксизмальная активность, кетамин.

O. V. Denisenko, T. V. Buzyka, L. I. Somik, L. M. Karpov

Odessa National University, Department of Human and Animals Physiology,
Dvoryanskaya St., 2, 65026, Ukraine

GLUTAMATE APPLICATION EFFECTS ON NEURONAL ACTIVITY SPECIFIC OF RAT SENSORIMOTOR CORTEX

Summary

The intra- and extracellular recording of sensorimotor cortex neuronal reactions was made in the acute experiments on non-narcotized immobilized rats before and after glutamate application. It was shown that the application of the glutamate activate has not only excitatory synaptic transmission, but the inhibitory too. Generation of the paroxysmal depolarizing shifts of the membrane potential was in any case accompanied by afterhyperpolarization (AHP) during the development of synchronized paroxysmal

activity. AHP has got different components in upper the and down cortical layers. As it turned out, the frequency and amplitude of the cortical neurons extracellular activity in the V–VI layers had increased. The form of rhythmic population activity and the duration of the intervals between these oscillations were increased. Non-selective antagonist NMDA-receptors ketamin produced the significant changes only in the V–VI layers.

Keywords: sensorimotor cortex, glutamate, paroxysmal activity, ketamin.