

10. Фомовский Б. И. Реакции нейронов проекционной зоны вибрисс соматосенсорной коры кошки на афферентную активацию.— Там же, с. 550—559.
11. Шевелев И. А. Нейроны зрительной коры. Адаптивность и динамика рецептивных полей.— М.: Наука, 1984.— 232 с.
12. Alger B. E., Nicoll R. A. Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells *in vitro*.— J. Physiol. 1982, 328, p. 105—123.
13. Alexandrov A. A. Intracortical inhibition and neuronal receptive fields of the sensorimotor cortex.— In: XXVIII Intern. Congr. of physiol. sci.: Abstracts of lectures, symposia and free communications. Budapest, 1980, vol. 14, p. 295.
14. Ashwood T. J., Lancaster B., Wheal H. V. Electrophysiological studies on rat hippocampal interneurons which may mediate feed-forward inhibition.— J. Physiol. 1982, 327, P65—P66.
15. Batuev A. S., Alexandrov A. A., Scheynikov N. A. Inhibition as the basis for neuronal plasticity.— Adv. Physiol. Sci., 1981, 36, p. 11—22.
16. Batuev A. S., Alexandrov A. A., Scheynikov N. A. Picrotoxin action on the receptive fields of the cat sensorimotor cortex neurons.— J. Neurosci. Res., 1982, 7, N 1, p. 49—55.
17. Dykes R. W., Dudar J. D., Tanji D. G., Publicover N. G. Somatotopic projections of mystacial vibrissae on cerebral cortex of cats.— J. Neurophysiol., 1977, 40, N 5, p. 997—1014.
18. Sillito A. M. The contribution of inhibitory mechanisms to the receptive fields properties of neurones in the striate cortex of the cat.— J. Physiol., 1975, 250, p. 305—329.
19. Sillito A. M. Inhibitory processes underlying the directional specificity of simple, complex, and hypercomplex cells in the cats visual cortex.— Ibid., 1977, 251, p. 699—720.
20. Tsumoto T., Eckart W., Creutzfeldt O. D. Modification of orientation sensitivity of cat visual cortex neurons by removal of GABA-mediated inhibition.— Exp. Brain Res., 1979, 34, p. 351—363.

Физиол. ин-т Ленингр. ун-та

Поступила 09.04.85

УДК 612.825.23:615.33

В. И. Хоревин, Ю. И. Янин

ВЛИЯНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНА НА ПРОЦЕССЫ ТОРМОЖЕНИЯ В КОРКОВЫХ НЕЙРОНАХ

В нейрофизиологических исследованиях пенициллин широко используется для создания экспериментальной модели эпилептического очага. Общеизвестно, что эпилептиформная активность является следствием нарушений нормальных взаимоотношений между процессами возбуждения и торможения. Однако вопрос о механизмах этого нарушения окончательно не выяснен, а данные о влиянии пенициллина на процессы торможения противоречивы.

Так, в настоящее время широко распространено представление, что пенициллин является антагонистом ГАМК и угнетает процессы торможения [8, 9, 10].

Вместе с тем известно, что в корковых «пенициллиновых очагах» отмечаются периоды снижения возбудимости нейронов. Так, генерация пик-волн сопровождается развитием в нейронах мощных процессов торможения [12], а в ответ на афферентные раздражения нейроны очага могут реагировать ТПСП, которые по своему происхождению не отличаются от ТПСП, зарегистрированных у интактных животных [13]. Показано также, что во время развития судорог некоторые нейроны могут реагировать увеличением мембранного потенциала [6].

Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют, что пенициллин, хотя и является антагонистом ГАМК и угнетает процессы торможения, тем не менее в «пенициллиновом очаге» существуют выраженные процессы торможения.

Настоящая работа посвящена изучению влияния пенициллина на процессы торможения в корковых нейронах, а также выяснению возможной роли изменения этих процессов в формировании эпилептического очага.

Методика

Опыты проведены на кошках, наркотизированных нембуталом (35 мг/кг внутривенно) и обездвиженных миорелаксином, а также на крысах под уретановым наркозом (1,2 г/кг, внутривенно). К регистрации электрической активности коры приступали через 4—5 ч после наркотизации. Зоны отведения — слуховая кора (AI) у кошек и соматосенсорная и слуховая у крыс. В качестве афферентного раздражения использовали звуковой щелчок и электрокожное раздражение (ЭКР) подушечки передней контралатеральной лапы.

Эпилептический макроочаг создавали путем приложения ватного тампона, смоченного раствором натриевой соли бензилпенициллина (1:125000 ЕД), к поверхности коры мозга. При микроаппликации использовали более концентрированный раствор пенициллина (1:500000 ЕД). В последнем случае применяли два способа подведения вещества к нейронам коры: первый — путем микроэлектрофореза, второй — с помощью микроинъекций. Микроэлектрофоретическую аппликацию осуществляли токами отрицательной полярности в пределах 10—150 нА. Для устранения эффектов тока через один из стволых трехствольной микропипетки пропускали компенсирующий ток, равный по величине, но обратный по направлению выводящему току. Для предотвращения диффузии пенициллина применяли запирающий ток положительной полярности величиной 10 нА при соответствующей его компенсации.

Более значительные дозы (по сравнению с микроэлектрофорезом) можно вывести из микропипетки давлением. Для этого использовали двухствольные клееные микропипетки, одна использовалась как отводящий микроэлектрод, вторая служила для аппликации пенициллина. Расстояние между кончиками отводящей и апплицирующей микропипеток составляло 30—70 мкм, а диаметр кончика последней был около 3—5 мкм. Эту пипетку заполняли раствором пенициллина и соединяли толстостенной полиэтиленовой трубкой с масляным микроманипулятором. Для предотвращения диффузии пенициллина в микропипетке создавалось небольшое отрицательное давление.

Реакции нейронов оценивали по постстимульным гистограммам, построенным с помощью специализированной лабораторной ЭВМ «Анолс-101».

Результаты

В I серии опытов проведено изучение процессов торможения коры после создания эпилептического макроочага в зоне отведения. При исследовании вызванных потенциалов (ВП) обнаружено, что после аппликации пенициллина в эпилептическом очаге продолжительность рефрактерного периода, определяемого с помощью кондиционирующего и тестирующего раздражений, значительно увеличивается. Так, до аппликации пенициллина рефрактерный период составлял 150—300 мс, а в эпилептическом очаге — 300—600 мс. Аналогичные данные об удлинении периода рефрактерности в эпилептическом очаге получены при изучении взаимодействия разномодальных афферентных стимулов в участке коры крысы, пограничном между соматосенсорной и слуховой зонами, где имеется конвергенция синаптических входов слуховой и соматической систем.

Исследование импульсной активности нейронов указанных проекционных областей коры также показало наличие продолжительных процессов торможения в реакциях на афферентное раздражение при макроаппликации пенициллина. Эти наблюдения проведены при внеклеточном отведении электрической активности нейронов и о процессах торможения судили по продолжительности угнетения фоновой импульсной активности (ФИА), если таковая была, или по периоду рефрактерности, определяемому методом парных раздражений. При этом в большинстве наблюдений регистрировался довольно продолжительный период торможения, длительностью 300—600 мс.

Характер реакции нейронов макроочага в разные периоды времени после аппликации пенициллина неодинаков. Динамика этого процесса представлена на рис. 1. До аппликации нейрон отвечал на ЭКР одним-двумя потенциалами действия (ПД) с последующим торможением ФИА до 150 мс (рис. 1, а). Через 3 мин после аппликации пени-

цилина появились пик-волны и ВП приобрел характерные изменения в виде резкого увеличения отрицательности. К 10 мин ФИА нейрона почти исчезла. Постстимульная гистограмма, строившаяся с 6 по 9 мин после аппликации, показала уменьшение периода торможения в два раза (рис. 1, б). К 13 мин ФИА исчезла совсем, а фазный ответ на ЭКР стал пачечным (рис. 1, в). Теперь процессы торможения, выявляемые с помощью парных раздражений, стали более продолжительными, и период рефрактерности составлял более 400 мс (рис. 1, д). К 20

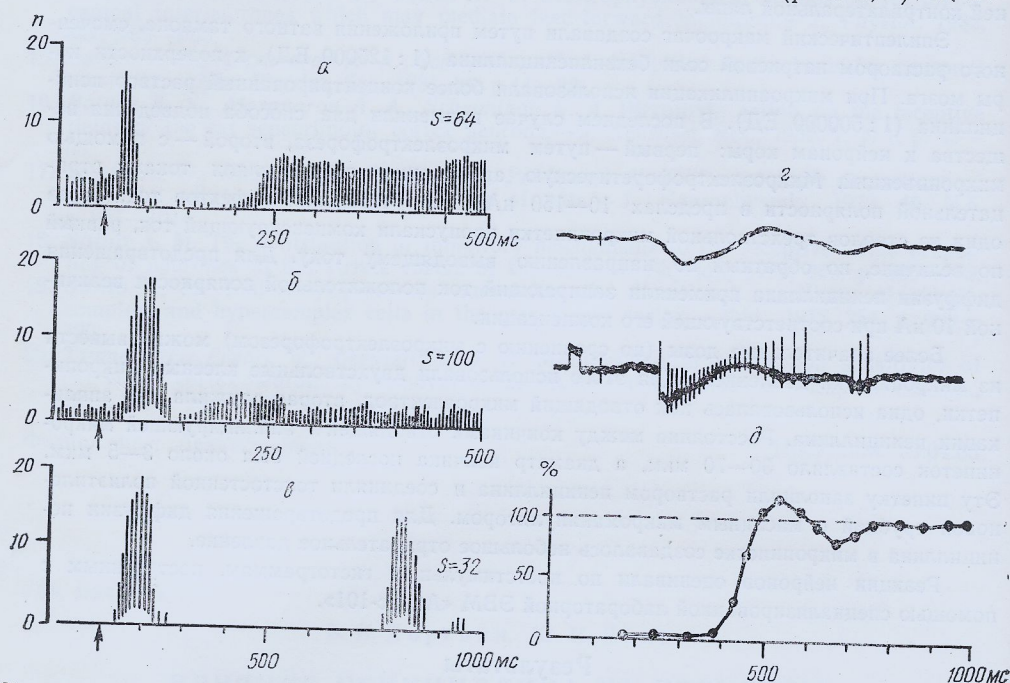


Рис. 1. Изменение характера реакции нейрона при формировании эпилептического очага после макроаппликации пенициллина на кору мозга.

а, б, в — постстимульные гистограммы (бин — 5 мс, S — количество реализаций, n — количество пиков в бине) до аппликации пенициллина (а), через 6 мин после аппликации, но до образования очага (б), через 20 мин после аппликации в сформировавшемся очаге (в); осциллограмма ответа нейрона в очаге (г); кривая восстановления ответспособности нейрона в очаге (д). Калибровочный сигнал на нейрограмме — 1 мВ, 5 мс. Верхний луч — ЭКГ.

мин ответ нейрона состоял уже из двух пачек ПД: вторая возникала через 500 мс после первой, по-видимому, по типу «отдачи» (рис. 1, в).

Пенициллин считается антагонистом ГАМК, однако тормозные компоненты ответов нейронов при макроаппликации пенициллина на кору не уменьшаются, а даже наоборот, несколько увеличиваются. Для выяснения причин этого противоречия было проведено исследование влияния пенициллина на корковые нейроны при микроаппликации разных его доз.

При микроэлектрофоретическом подведении пенициллина непосредственно к нейрону иногда наблюдалось учащение или появление ФИА. Ответы нейронов, состоявшие из одного-двух ПД, при аппликации пенициллина становились более продолжительными и состояли из четырех-восьми импульсов. Однако такие длинные пачки ПД, какие часто наблюдаются в эпилептическом очаге (30—40 ПД), не возникали даже при значениях силы форетического тока 200 нА. В ответ на афферентные стимулы реакции торможения при электрофорезе пенициллина, определяемые по угнетению ФИА или методом парных раздражений, значительно изменялись. Их продолжительность, а также выраженность уменьшались, иногда до полного исчезновения. Так, пауза, существовавшая в ответе нейрона (рис. 2, а), на фоне электрофореза заполнялась импульсами (рис. 2, б), а период рефрактерности уменьшался, иногда почти до нуля.

Эффекты микроэлектрофоретического подведения пенициллина обратимы, они начинаются, обычно, через 1—2 мин после включения выводящего тока и заканчиваются примерно через тот же промежуток времени после его выключения.

В ответах двух нейронов наблюдали исчезновение тормозной паузы через 10—15 мин после выключения запирающего тока и при отсутствии выводящего тока (рис. 2). Вероятно, этот эффект обусловлен диффузией пенициллина из выводящей микропипетки.

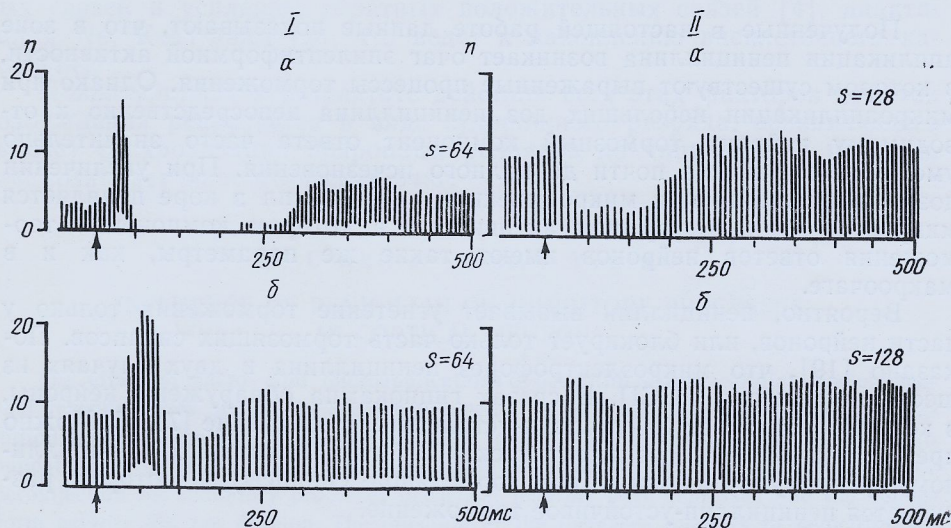


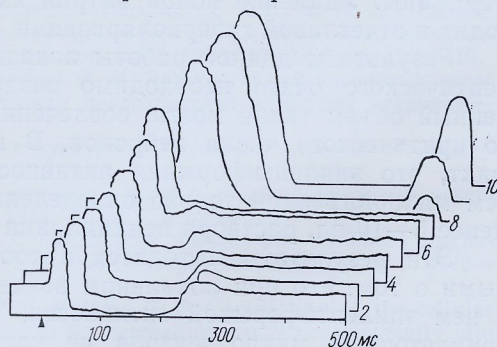
Рис. 2. Изменение реакций двух нейронов при микроэлектрофоретической аппликации пенициллина.

Постстимульные гистограммы с периодом анализа 500 мс: α — до аппликации пенициллина, β — после аппликации, I, β — апплицирующий ток 40 нА в течение 3 мин, II, β — через 15 мин после отключения запирающего тока.

При подведении малых доз пенициллина путем микроинъекций изменение реакций торможения сходно с тем, что наблюдается при микроэлектрофоретическом его подведении: процессы торможения в нейронах угнетаются, а их возбудимость увеличивается (рис. 3, 1—7). В этом случае, хотя и имеет-

Рис. 3. Динамика ответсposности нейрона в процессе формирования эпилептического микроочага, вызванного микроинъекцией пенициллина.

1—10 — постстимульные гистограммы, строившиеся через каждую минуту после начала микроинъекции. 1—7 — постепенное исчезновение периода торможения. 8—10 — угнетение ФИА и появление пачечных ответов в возникшем эпилептическом микроочаге.



ся значительное усиление возбудительных реакций, тем не менее, в зоне аппликации пенициллина не обнаружено генерации судорожных разрядов, столь характерных для пенициллиновых макроочагов.

Если увеличить количество инъецируемого пенициллина до 5—10 пл, т. е. до величины, эквивалентной объему капли диаметром 30—50 мкм, то в зоне инъекции возникает микроочаг эпилептической активности. В таком очаге развиваются пик-волны, импульсные реакции возникают в виде пачек потенциалов действия (рис. 3, 8—10) на фоне пароксизмального деполяризационного сдвига (ПДС).

В большинстве случаев ФИА нейронов сформированного микроочага ослабевала, иногда сменяясь высокочастотной регулярной активностью, напоминающей разряд повреждения, что, вероятно, обусловле-

но значительной деполяризацией мембраны. При наличии такой «вызванной» ФИА в ответ на афферентный стимул можно было обнаружить паузу продолжительностью 300—600 мс, которая обычно возникала после фазного пачечного ответа. Период рефрактерности, определяемый с помощью парных раздражений, имеет такую же продолжительность, как и у нейронов эпилептического макроочага.

Обсуждение

Полученные в настоящей работе данные показывают, что в зоне аппликации пенициллина возникает очаг эпилептиформной активности, в котором существуют выраженные процессы торможения. Однако при микроаппликации небольших доз пенициллина непосредственно к отводимому нейрону тормозный компонент ответа часто значительно уменьшается, иногда почти до полного исчезновения. При увеличении дозы пенициллина при микроинъекции до 5—10 пл в коре появляется микроочаг эпилептиформной активности, в котором компоненты торможения ответов нейронов имеют такие же параметры, как и в макроочаге.

Вероятно, пенициллин вызывает угнетение торможения только у части нейронов, или блокирует только часть тормозящих синапсов. Показано [19], что микроэлектродфорез пенициллина в двух случаях из шести не изменял ТПСР. В срезах гиппокампа обнаружены нейроны, в которых возникает бикукуллин-устойчивое торможение [7, 15]. Можно предположить, что в эпилептических очагах, вызванных пенициллином, существуют нейроны (или тормозящие синапсы), в которых развивается пенициллин-устойчивое торможение.

Однако не исключена возможность, что торможение после фазного ответа обусловлено инактивацией мембраны нейрона, не связанной с синаптическими процессами. Одним из возможных механизмов, обеспечивающих это торможение, может быть избыток ионов натрия в клетке, возникающей в результате мощной возбудительной реакции в виде длинной пачки потенциалов действия. Показано [3, 11], что внутриклеточная инъекция ионов натрия приводит к активации электрогенного транспорта, в результате которой возникает гиперполяризация мембраны. Удаление ионов натрия из окружающей среды также приводит к отчетливой гиперполяризации [1].

Результаты данной работы показывают, что для образования эпилептического очага необходимо воздействие пенициллина на определенный объем ткани мозга, вовлечение в сферу его действия некоторого критического числа нейронов. В пользу этого свидетельствует тот факт, что эпилептиформная активность начинается при введении путем микроинъекции только определенного количества пенициллина (не менее 5—10 пл, раствора пенициллина 1 : 500000 ЕД).

Эти результаты находятся в соответствии с литературными данными о том, что при локальном воздействии на нейрон нельзя вызвать в нем эпилептиформной активности. Так, при поляризации через внутриклеточный микроэлектрод не удавалось вызвать в нейроне ПДС даже при значительных величинах ($3 \cdot 10^{-8}$ А) деполяризующего тока [18]. При микроионофорезе пенициллина никогда не развивались ПДС, если вещество подводилось к отдельному нейрону [19].

Развитие эпилептиформной активности происходит не только вследствие изменения параметров торможения в нейронах очага, но, возможно, также и из-за резкого усиления возбуждения, что может быть связано и с прямым возбуждающим влиянием пенициллина на внутрикорковые аксонные разветвления нейронов, в результате чего они могут стать источником пиковых разрядов [16, 17].

Исходя из вышесказанного, можно представить такую модель развития эпилептического очага.

Если пенициллин воздействует на совокупность нейронов, количество которых меньше некоторого критического числа, то интенсивность

импульсации этих нейронов невелика, и не создаются условия для поддержания возбуждения.

В том случае, когда действию пенициллина подвергнуто критическое число нейронов, возникают условия не только для распространения возбуждения, но и присоединяется еще и действие других факторов, наиболее важными из которых являются: блокада пенициллином торможения, в первую очередь возвратного, предохраняющего нейроны от перевозбуждения [5], что ведет к устранению обратных отрицательных связей и усилению обратных положительных связей [4], инактивация Na, K-АТФазы [2], что ведет к накоплению внеклеточного кальция [14].

Появляющийся в результате действия всех этих факторов избыток возбуждения реализуется в виде судорожного разряда, возникающего за счет синхронизации нейронных разрядов по типу цепной реакции, т. е. возникает эпилептический очаг.

V. I. Khorevin, Yu. I. Yanin

INFLUENCE OF PENICILLIN ON INHIBITORY PROCESSES IN CORTICAL NEURONS

The effect of macro- and microapplications of penicillin on extracellular cortical neuronal responses was studied in acute experiments on cats and rats. The pronounced inhibition processes lasting for 400-600 ms were found in the studied neurons after macroapplication of penicillin. After microapplication of penicillin by microelectrophoresis or microinjection the inhibitory processes in cortical neurons were depressed and the epileptiform activity did not develop. The injection of the increased quantity of penicillin (5-10 pl) produced the microfocus of epileptiform activity where inhibitory processes possessed the same characteristics as in the macrofocus.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Герасимов В. Д., Костюк П. Г., Майский В. А. Ионная проводимость мембраны гигантской нервной клетки виноградной улитки. — Биофизика, 1965, 10, № 1, с. 82—89.
2. Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Молекулярные механизмы патогенеза эпилептической активности. Сообщ. 1. — Успехи физиол. наук, 1983, 14, № 1, с. 102—119.
3. Костюк П. Г., Крышталь О. А., Пидопличко В. И. Электрогенный натриевый насос и связанные с ним изменения проводимости поверхностной мембраны нейронов. — Биофизика, 1972, 17, № 6, с. 1048—1054.
4. Крыжановский Г. Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы. — М.: Медицина, 1980. — 358 с.
5. Серков Ф. Н. Нейронные механизмы и функциональное значение торможения в нейронах слуховой коры. — Физиол. журн., 1984, 30, № 5, с. 520—526.
6. Ayala G. F., Matsumoto H., Gumnit R. J. Excitability changes and inhibitory mechanisms in neocortical neurons during seizures. — J. Neurophysiol., 1970, 33, N 1, p. 73—85.
7. Bowery N. G., Price G. W., Turnbull M. J., Wilkins G. P. Comparison of the cellular locations of GABA_A and GABA_B receptors in the cerebellum using neurologically mutant mice. — Brit. J. Pharmacol., 1983, 79, Proc. Suppl., 277 P.
8. Curtis D. R., Game J. C., Johnston G. A. R. et al. Convulsive action of penicillin. — Brain Res., 1972, 43, N 2, p. 242—245.
9. Davidoff R. A. Penicillin and inhibition in the cat spinal cord. — Brain Res., 1972, 45, N 3, p. 638—642.
10. Dingledine R., Gjerstad L. Reduced inhibition during epileptiform activity in the in vitro hippocampal slice. — J. Physiol., 1980, 305, N 1, p. 205—209.
11. Kerkut G. A., Thomas R. C. An electrogenic sodium pump in snail nerve cells. — Comp. and Biochem. Physiol., 1965, 14, N 1, p. 167—183.
12. Matsumoto H., Ajmon Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. — Exp. Neurol., 1964, 9, N 2, p. 286—304.
13. Matsumoto H., Ayala G. F., Gumnit R. J. Neuronal behavior and triggering mechanism in cortical epileptic focus. — J. Neurophysiol., 1969, 32, N 3, p. 688—703.
14. Moody W. J., Futamachi K. J., Prince D. A. Extracellular potassium activity during epileptogenesis. — Exp. Neurol., 1974, 42, N 2, p. 248—263.
15. Newberry N. R., Nicoll R. A. A bicuculline-resistant inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal cells in vitro. — J. Physiol., 1984, 348, N 2, p. 239—254.