

О.О. Щигло

## Вплив карбахолу й атропіну на нейрони моторної кори кішки при виконанні оперантного рефлексу

*Изучали эффекты влияния карбахола и атропина на вызванную и фоновую импульсную активность нейронов. По эффектам импульсной активности нейронов на аппликацию карбахола, нейроны моторной коры кошки при осуществлении оперантного рефлекса. Карбахол, микроионофоретически подводимый к нейронам моторной коры, способствовал достоверному увеличению частоты фоновой импульсной активности и продолжительности вызванной реакции. По характеру изменения частоты импульсной активности нейронов на аппликацию карбахола нейроны моторной коры были поделены на две группы: первая с продолжительным влиянием на частоту импульсной активности и вторая с кратковременным влиянием. Подведение блокатора м-холинорецепторов – атропина, достоверно снижало уровень фоновой импульсной активности и продолжительность вызванной реакции. Высказано предположение, что ацетилхолин, выделяемый терминалями холинергических волокон, в естественных условиях принимает участие в поддержании уровня частоты фоновой импульсной активности нейронов моторной коры и обеспечении процесса формирования моторных команд, генерируемых этими клетками; указанные эффекты опосредованы м-холинорецепторами.*

### ВСТУП

Холінергічна активація в корі мозку має універсальне значення беручи участь у таких процесах, як емоції, свідомість [3], увага [11], а також в умовнорефлекторній діяльності [2]. Відомо, що основним джерелом проєкцій холінергічних волокон у кору головного мозку людини та приматів є нейрони базальних гангліїв переднього відділу мозку: ядер Мейнерта та діагонального пучка, а також інтерпедункулярних ядер [4, 7, 13]. Холінергічні волокна головного мозку котів надходять у неокортекс переважно з *substantia innominata*, 87 % нейронів якої є холінергічні [9]. Згідно з даними морфологічних досліджень, холінергічні волокна утворюють у корі головного мозку щільну сітку, рівномірно розташовану по всіх кірковим шарах, іннервуючи різні типи кіркових клітин. Мішенями холінергічної іннервації є як пірамідальні клітини,

так і клітини з ознаками ГАМК-ергічних. Холінергічні аксони формують синапси в основному на стовбурах дендритів (70,5 %), на шипиках (25 %) і незначною мірою (4,5 %) на тілах нейронів. Деякі дендритні шипики отримують множинні, близько розташовані один до одного холінергічні синапси. Це підтверджує, що пірамідальні нейрони є об'єктом інтенсивних холінергічних впливів [10].

Незважаючи на пізнавальну цінність наявних даних про холінергічну систему, все ж їх мало для пояснення процесів навчання в головному мозку ссавців. Тому мета нашої роботи полягала в дослідженні можливих модуляторних впливів карбахолу та атропіну, агоніста та антагоніста холінергічної системи на фонову та викликану імпульсну активність нейронів моторної кори кішки під час виконання оперантного рефлексу.

© О.О. Щигло

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на неанестезованих кішках, у котрих попередньо виробляли оперантний рефлекс постановки лапи на опору. Імпульсну активність нейронів відводили позаклітинно від моторної зони кори, яка за номенклатурою кори [1], відповідає полю 4, за допомогою триканальних скляних мікроелектродів (зовнішній діаметр їх кінчика становив 5–10 мкм). Один із каналів заповнювали розчином NaCl у концентрації 4 моль/л і застосовували для відведення імпульсної нейронної активності. Два інших канали мікроелектрода використовували для іонофоретичної аплікації синаптично активних речовин і заповнювали розчинами карбахолу (0,5 моль/л, рН 6) та атропіну (0,3 моль/л, рН 4). Для мікроіонофоретичної аплікації речовин використовували силу струму 10–20 нА. Загальна схема окремого експерименту складалася з 7 серій, кожна з яких нараховувала 10 реалізацій тривалістю 30 с кожна. В першій, третій, п'ятій і сьомій контрольних серіях, реєстрували імпульсну активність нейронів під час виконання оперантного рефлексу. В другій і четвертій серії проводили таку саму реєстрацію, але на фоні іонофоретичної аплікації синаптично активних речовин – карбахолу в другій, та атропіну в четвертій. У шостій серії проводили реєстрацію під час одночасної аплікації цих речовин. Контрольною була імпульсна активність нейронів через 10 хв після аплікації синаптично активних речовини.

Обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою ЕОМ. При аналізі ефектів фармакологічних речовин враховували такі показники нейронної імпульсації: 1) середню частоту фонові імпульсної активності (кількість імпульсів за секунду); 2) інтенсивність викликані реакції (кількість імпульсів за одну реалізацію), пов'язаної зі збільшенням частоти імпульсної активності нейрона при здійсненні руху при постановці лапи на опору; 3) тривалість

викликані реакції; 4) латентний період викликані реакції. Статистичну обробку експериментальних результатів виконували за допомогою програми Origin 7.0 для Windows; оцінку вірогідності результатів до та після дії мікроіонофоретичної аплікації речовин проводили за допомогою дисперсійного аналізу повторних вимірювань (ANOVA repeated measures) і критерію Ньюмена – Кейлса для множинних порівнянь.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час експерименту зареєстровано імпульсну активність 20 нейронів. Мікроіонофоретична аплікація карбахолу на нейрони моторної кори призводила до збільшення імпульсної активності окремих нейронів. За характером змін реакцій імпульсної активності нейронів були поділені на 2 групи (по 10 у кожній). До першої групи були включені нейрони, у яких ефект аплікації карбахолу викликав зміни імпульсної активності більше ніж 5 хв (рис. 1, I). До другої групи були віднесені нейрони з короткотривалим впливом карбахолу – менше ніж 5 хв (див. рис. 1, II). Зміна характеру частоти імпульсної активності нейронів з подібним типом фонові активності після аплікації агоніста була описана раніше Woody [14]. Аплікація карбахолу у нейронів першої групи в наших дослідах викликала поступове підвищення частоти фонові імпульсної активності нейронів на 73 % (з 4,4 до 7,6 імп/с), а через 10 хв – ще на 44 % (з 7,6 до 11 імп/с; рис. 2, а). Такий ефект тривалого посилення нейронної збудливості раніше було показано Metharate [8] на нейронах моторної кори кішки та на нейронах сенсомоторної кори щурів Lamour [5]. Цими дослідниками було доведено про підвищення нейронної відповіді від 10 хв до години. Відомо, що активація мускаринових холінорецепторів викликає збільшення внутрішньоклітинної концентрації  $Ca^{2+}$ , стимулюючи його вивільнення з внутрішньоклітинного депо через фосфатидиліно-

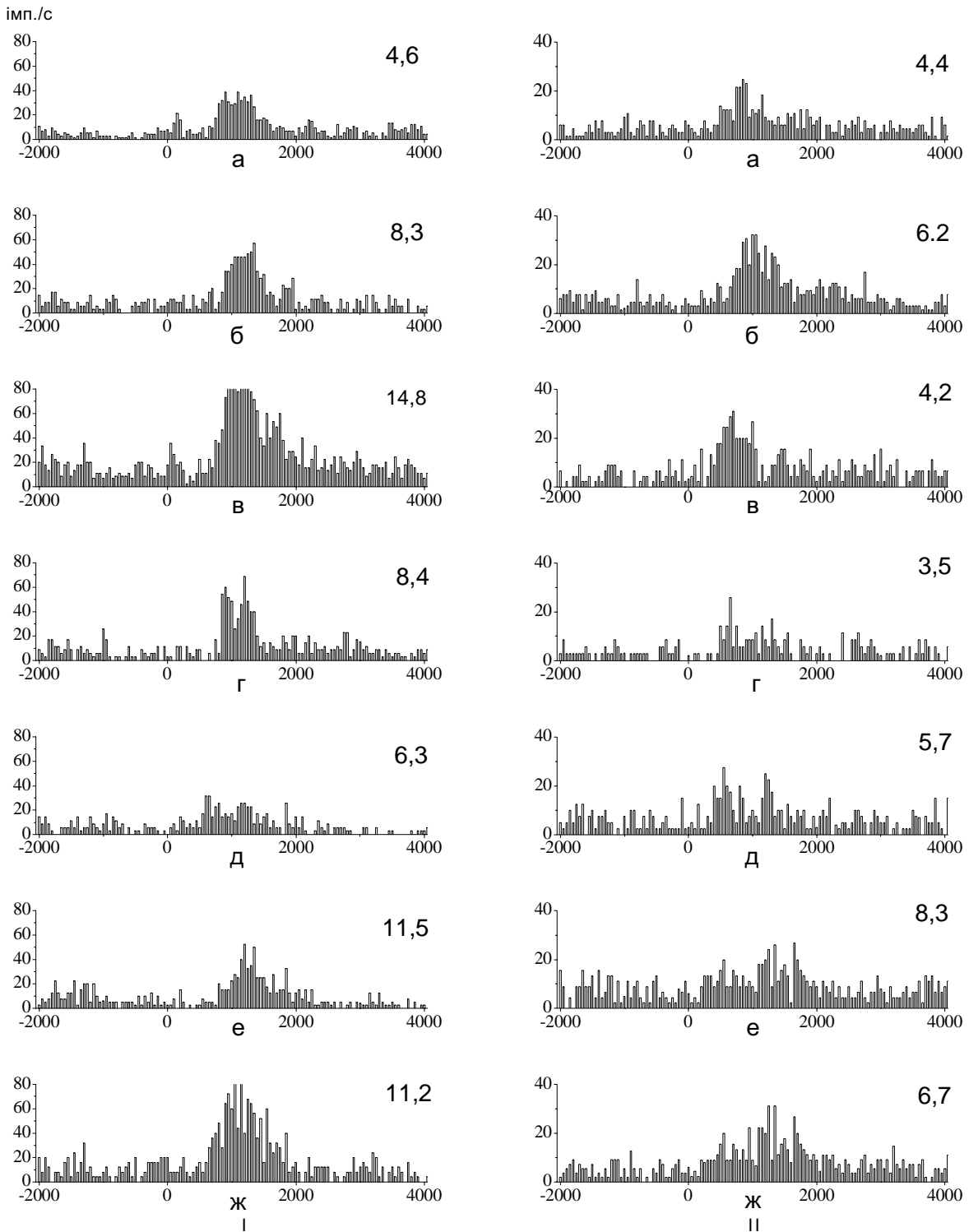


Рис. 1. Фонова та викликана імпульсна активність одного нейрона з кожної групи, при аплікації карбахолу й атропіну: I – перша група нейронів з довготривалим ефектом на аплікацію карбахолу; II – друга група нейронів з короткотривалим ефектом на аплікацію карбахолу; а – контроль, б – карбахол (20 нА), в – контроль, г – атропін (20 нА), д – контроль, е – карбахол і атропін (20 нА), ж – контроль. На кожній гістограмі зверху позначено частоту імпульсів фонової активності

зитольний шлях. Отже, зростає амплітуда N-метил-D-аспартат (NMDA)-рецептор-залежної синаптичної пластичності [6]. Такий шлях впливу нейромедіатора може підвищити ймовірність того, що збуджувальний вхід сягає порога активації NMDA-рецепторів, що призводить до посилення мембранної збудливості та виникнення більш інтенсивних і тривалих імпульсних відповідей на інші деполяризуючі впливи. Не можна виключати, що деякі ефекти деполяризації, в результаті позаклітинної аплікації агоніста до нейронів неокортексу,

викликають також активацію сусідніх нейронів [15]. У свою чергу, наступна аплікація атропіну в наших дослідженнях викликала спочатку пригнічення фонові імпульсної активності на 37 % (з 11 до 6,8 імпульс/с), яке поступово збільшувалося на 54 %, таким чином блокуючи реакцію на іонофорез карбахолу (див. рис. 2,а). Отримані результати повільної блокади активації фонові імпульсної активності, викликані карбахолом, збігаються з даними Swartz [12], де показана блокада атропіном довготривалого ефекту ацетилхоліну.

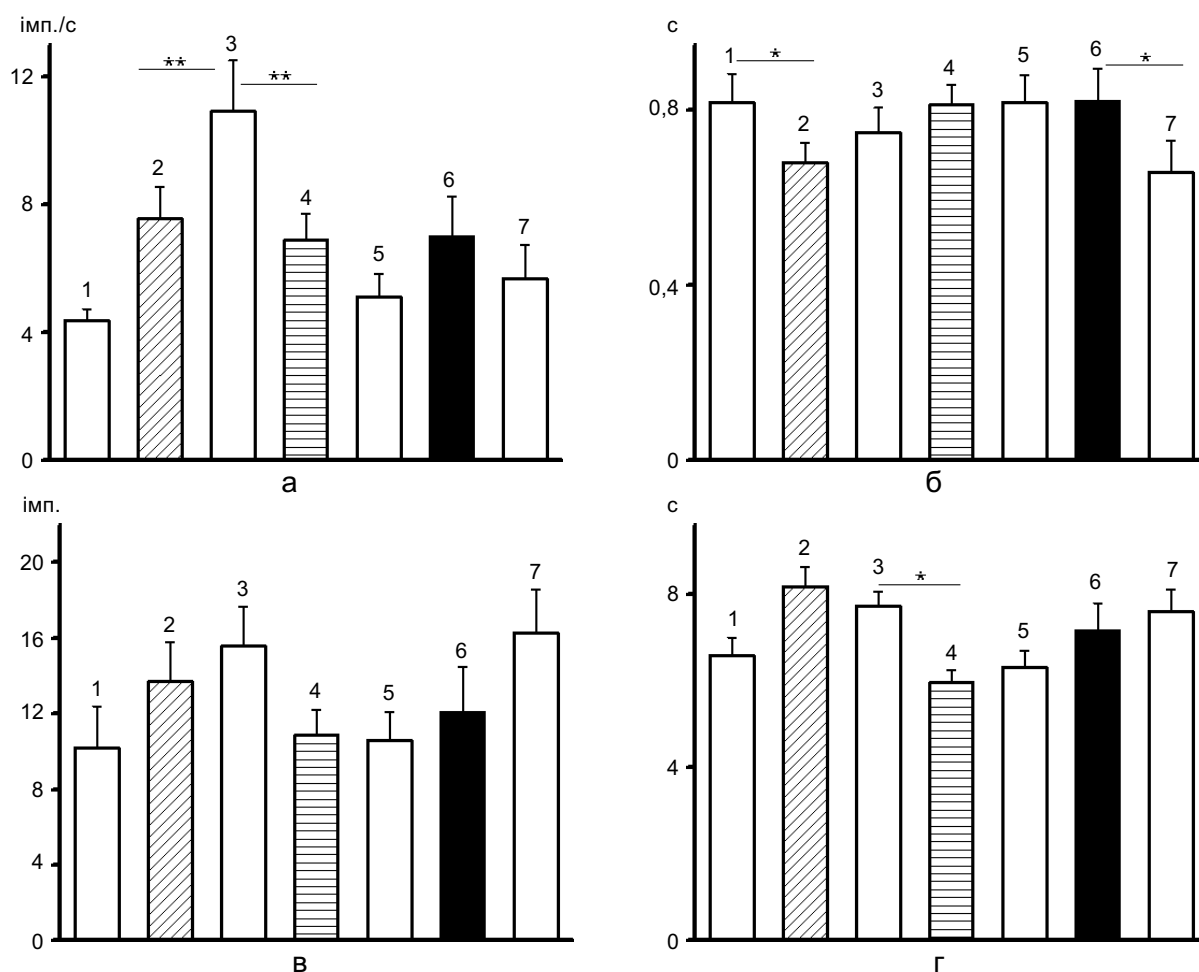


Рис.2. Вплив ізольованої та одночасної аплікації карбахолу й атропіну на імпульсну активність 10 нейронів моторної кори з довготривалим ефектом на аплікацію карбахолу: 1 – контроль, 2 – карбахол (20 нА), 3 – контроль через 10 хв після аплікації агоніста, 4 – атропін (20 нА), 5 – контроль через 10 хв після аплікації антагоніста, 6 – сумісна аплікація карбахолу й атропіну (20 нА), 7 – контроль через 10 хв після сумісної аплікації речовин; а – частота фонові імпульсної активності, імпульс/с, б – латентний період викликані реакції, с, в – інтенсивність викликані реакції, кількість імпульсів за реалізацію, с, г – тривалість викликані реакції, с, \*P < 0,05; \*\*P < 0,01

Комплексна аплікація карбахолу й атропіну викликала підвищення частоти фонової імпульсної активності на 37 % (з 5,1 до 7 імп/с) та наступне її зниження на 20 % . Це, можливо, відбувалося внаслідок впливу атроніну (див. рис. 2,а.). Латентний період викликаної реакції при аплікації карбахолу знижувався на 20 %, а при аплікації атропіну – збільшувався, але не достовірно. Сумісна аплікація згаданих речовин не викликала змін латентного періоду викликаної реакції. Однак через 10 хв цей показник достовірно зменшувався на 26 % ( $P < 0,05$ ). Можна зробити припущення, що за таких умов атропін суттєво не впливає на латентний період викликаної реакції (див. рис. 2,б). Її

інтенсивність при аплікації карбахолу збільшувався на 34 %, в той час як аплікація атропіну пригнічувала інтенсивність реакції на 32 % і наближала її до вихідного рівня (див. рис. 2,в). Аплікація карбахолу та атропіну підвищувала інтенсивність викликаної реакції, яка через 10 хв збільшувалося ще на 35 %. Достовірні зміни відбувалися при дослідженні тривалості викликаної реакції при аплікації атропіну, який зменшував її на 32 % (з 950 до 750 мс,  $P < 0,05$ ; див. рис. 2,г). Аплікація карбахолу призводила до достовірного збільшення частоти фонової імпульсної активності моторної кори другої групи нейронів на 37 % (з 4,9 до 8 імп/с,  $P < 0,01$ ),

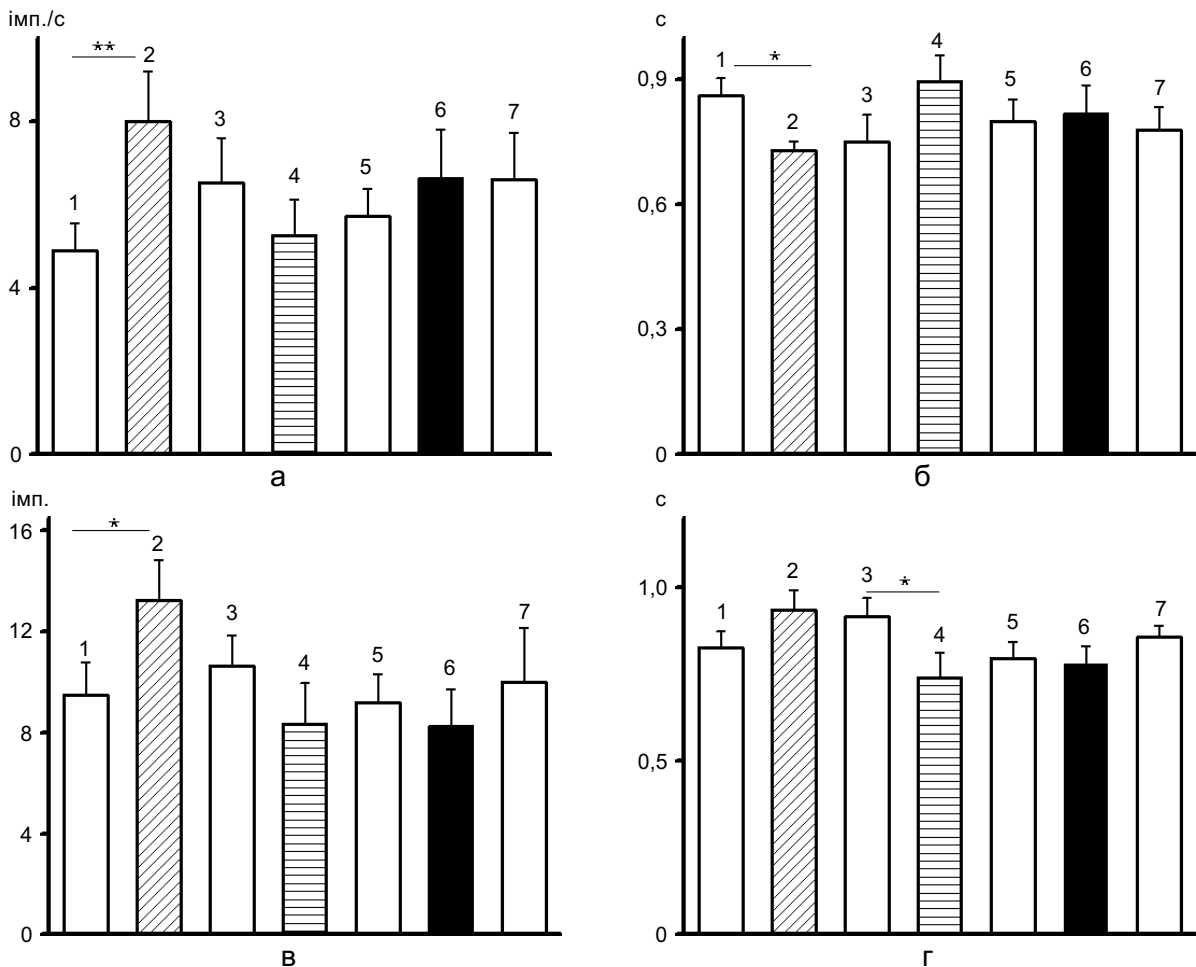


Рис.3. Вплив ізольованої та одночасної аплікації карбахолу й атропіну на імпульсну активність 10 нейронів моторної кори з короткотривалим ефектом на аплікацію карбахолу. Позначення див. рис. 2

яка через 10 хв після аплікації агоніста зменшувалась, але не сягала вихідного рівня (рис. 3,а). Аплікація атропіну недостовірно впливала на зменшення частоти фонові імпульсної активності. При сумісній аплікації карбахолу й атропіну відмічали недостовірне підвищення фонові імпульсної активності, яке через 10 хв залишалося без змін (див.рис. 3,а). Латентний період викликані реакції достовірно ( $P<0,05$ ) знижувався при аплікації карбахолу, а аплікація атропіну викликала підвищення цього показника на 20 %. Сумісна аплікація синаптично активних речовин не викликала змін латентного періоду викликані реакції (див. рис. 3,б). Інтенсивність викликані реакції збільшувалася на 40 % ( $P<0,05$ ) під час аплікації карбахолу, а через 10 хв знижувалася на 25 %. Аплікація атропіну викликала зниження інтенсивності викликані реакції лише на 27 %. Комплексна дія речовин не впливала достовірно на інтенсивність викликані реакції, а при реєстрації через 10 хв спостерігали підвищення цього показника на 33 % (див. рис. 3,в). Тривалість викликані реакції при аплікації атропіну достовірно знижувалася з 900 до 700 мс ( $P<0,05$ ). Протягом сумісного впливу речовин цей показник залишався без змін (див. рис.3 ,г).

Отримані результати дозволяють припустити, що ацетилхолін, який вивільнюється терміналами холінергічних волокон у природних умовах може брати участь у регулюванні рівня фонові активності нейронів моторної кори та забезпеченні процесу формування моторних команд, що генеруються цими клітинами. Як впливає з наших дослідів, ініціація таких ефектів помітно залежить від функції м-холінорецепторів.

**Е.А. Schygló**

#### **INFLUENCE OF CARBAHOL AND ATROPINE ON THE MOTOR CORTEX NEURONS IN CAT DURING OPERANT REFLEX**

Effects of carbachol and atropine on the caused and background impulse neurons activity during operant reflex were

studied on twenty motor cortex neurons. Motor cortex neurons in dependence of changes impulse neurons activity after carbachol administration have been divided into two groups; the first group includes neurons with a long influence on impulse activity and the second – with short. Carbachol applied by iontophoresis to motor cortex promoted authentic increase of background impulse activity and duration of the caused reaction in both groups. Administration of atropine, an antagonist of m-cholinergic receptors significantly reduced parameters of background impulse activity and duration of the caused reaction. It was suggested that acetylcholine released by terminals of the cholinergic fibers in natural conditions takes part in maintenance of motor cortex neuron background activity and provides sufficient intensity of the motor commands generated by these cells; the given effects mediated by m-cholinergic receptors.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Батуев А.С. Функции двигательного анализатора. – М.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1970. – 224 с.
2. Чернышев Б.В., Майоров В.И., Москвитин А.А. Облегчение и угнетение под влиянием ионофоретической аппликации ацетилхолина разных компонентов реакций нейронов двигательной коры при выполнении условного рефлекса постановки лапы на опору // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1998. – 48, №1. – С. 99–112.
3. Acquas E., Wilson C., Fibiger H.C. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear // J. Neurosci. – 1996. – 16, № 9. – P. 3089–3096.
4. Kievit J., Kuypers H.G. J. Basal forebrain and hypothalamic connections to the frontal cortex and parietal cortex in the Rhesus monkey // Science. – 1975. – 187, № 4177. – P. 660–662.
5. Lamour Y., Dutar P., Jobert A., Dykes R.W. An iontophoretic study of single somatosensory neurons in rat granular cortex serving the limbs: a laminar analysis of glutamate and acetylcholine effects on receptive-field properties // J. Neurophysiol. – 1988. – 60. – P. 725–750.
6. Markram H., Segal M. The inositol 1,4,5-triphosphate pathway mediates cholinergic potentiation of rat hippocampal neuronal responses to NMDA // J. Physiol. – 1992. – 447. – P. 513–533.
7. Mesulam M.M., Van Hoesen G.W. Acetylcholinesterase-rich projections from the basal forebrain of the Rhesus monkey to neocortex // Brain Res. – 1976. – 109, № 1. – P. 152–157.
8. Metherrate R., Tremblay N., Dykes R.W. Transient and prolonged effects of acetylcholine on responsiveness of cat somatosensory cortical neurons // J. Neurophysiol. – 1988. – 59, №4. – P. 1253–1276.

9. Reiner P.B., Semba K., Fibiger H.C., McGeer E. G. Physiological evidence of cortically projecting basal forebrain neurons in the anaesthetized rat // *Neuroscience*. – 1987. – **20**, № 2. – P. 629–636.
10. Rose S.P.R., Gibbs M.E., Hambley J. Transient increase in forebrain muscarinic avoidance learning in the young chick // *Ibid.* – 1980. – **5**, №1. – P. 169–178.
11. Sarter M., Bruno J.P. Trans-synaptic stimulation of cortical acetylcholine and enhancement of attention function: a rational approach, for the development of cognition enhancers // *Behav. Brain Res.* – 1997. – **83**, № 1–2. – P. 7–14.
12. Swartz B.E., Woody C.D. Correlated effects of acetylcholine and cyclic guanosine monophosphate on membrane properties of mammalian neocortical neurons // *J. Neurobiol.* – 1979. – **10**. – P. 465–488.
13. Wenk H., Bigl V., Mayer U. Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats // *Brain Res. Rev.* – 1980. – **2**, № 9. – P. 295–316.
14. Woody C.D., Swartz B.E., Gruen E. Effects of acetylcholine and cyclic GMP on input resistance of cortical neurons in awake cats // *Ibid.* – 1978. – **158**. – P. 373–395.
15. Woody C. Gruen E. Responses of morphologically identified cortical neurons to intracellularly injected cyclic AMP // *Exp. Neurol.* – 1986. – **91**. – P. 596–612.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,  
Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 26.09.2005*