

УДК 612+616.8

**Микроэлектрофизиологическое изучение соотношения
возбудительных и тормозных синаптических
процессов в кортико-нигральной проекции
у интактных крыс**

Л.М.Хачатрян

*Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА
0028, Ереван, ул. Бр.Орбели, 22*

Ключевые слова: первичная моторная кора мозга (M1), компактный(с) и ретикулярный (r)отделы черной субстанции (SN)

Черная субстанция (*Substantia nigra* – SN) – важная нейрональная структура, расположенная в вентральном отделе среднего мозга, которая через nigrostriатный путь осуществляет регуляцию базальных ганглиев (БГ). БГ – сеть взаимосвязанных ядер, вовлекаемых в моторный контроль, целенаправленное поведение и процессуальное обучение [1]. Постеромедиальная область SN – *pars compacta* (SNc), одна из четырех первичных допаминергических (ДА) ядер мозга, вместе с вентральным тегментальным (VTA), ретрорубральными полями и аркуатным ядром гипоталамуса [13], главным образом, связана с дорсальным стриатумом через nigrostriатный путь [18]. Антеро-латеральная зона *pars reticulate* (SNr) состоит из ГАМКергических нейронов, воспринимающих афференты от стриатума и субталамического ядра, и, в свою очередь, проецируется к вентральному переднему и вентральному латеральному таламическим ядрам [20]. Продемонстрирована обширная подкорковая сеть для SNc и SNr [4, 5, 12]. БГ обрабатывают информацию от мозговой коры через три главных пути. Стриатум является входным ядром прямого (кортико-стриато-нигрального) и непрямого (кортико-стриато-паллидо-субталамо-нигрального) путей, в то время как субталамическое ядро является входной структурой гиперпрямого (кортико-субталамо-нигрального) пути. Лишь недавно доказано существование кортико-нигральной проекции у людей. Была применена вероятностная диффузионная тензорная магнитно-резонансная томография (*diffusion-tensor magnetic resonance imaging* – DTMRI), с целью дифференциации взаимоотношений SNc и SNr с мозговой корой посредством таламуса. Показан высочайший профиль связи SNc с префронтальной корой (ПФК), при этом SNr оказался больше связанным с моторной и премоторной корой [12]. Наконец, Kwon and Jang описали связь SN с

различными структурами мозга (мозолистое тело, первичная сенсорная кора, премоторная кора, хвостатое ядро, скорлупа, nucleus accumbens, височно-затылочные доли, pontine basis, передняя доля мозжечка, наружная капсула) [11]. Согласно ранним работам, одностороннее удаление фронтальной коры сопровождается значительной редукцией глутаминовой кислоты в ипсилатеральной SN, при неизменном содержании ГАМК, что свидетельствует о глутамате в качестве передатчика в кортико-нигральном тракте [10]. Основанный на изучении грызунов корковый контроль среднего мозга – один из важных механизмов, которым глутаматергический вход прямо или непрямо может управлять или модулировать ДА клетки [16]. Недавно, с применением современных антероградных трассеров, обнаружено, что связи SN с мозговой корой вовлекают префронтальную кору, пре- и постцентральную извилины и верхнюю парietальную долю. Эти результаты могут быть релевантными для понимания патофизиологии нейрологических болезней, вовлекающих SN (БП, шизофрения, патологическое пристрастие). В целом, подкреплена гипотеза, что SN не только часть сети подкорковых БГ, но также обладает связью с корой посредством дополнительного параллельного круга. Кроме того, представлены трактографические находки наличия кортико-нигрального пути у людей, подтверждая предварительные изучения на животных [2]. В заключение, применением DTMRI и CSD (constrained spherical deconvolution) трактографии продемонстрировано наличие прямой анатомической кортико-нигральной связи, уже широко описанной у кошек, родентов и приматов, но лишь предполагаемой у людей. Эта прямая связь может быть другой составной частью озадачивающего вопроса в направлении более всестороннего понимания корковой регуляции как моторных БГ, так и ДА подкрепляющих кругов и может проложить путь для последующих биохимических и физиологических исследований.

Продолжает оставаться предполагаемой большая выраженность связей моторной и премоторной коры с SNr, по сравнению с SNc, на основе вышеотмеченного современного трактографического морфологического изучения у людей. Предметом настоящего изучения явилась необходимость дальнейшего исследования сравнительной степени выраженности кортико-нигральных связей в микроэлектрофизиологическом исследовании на примере соотношения возбуждательных и тормозных процессов в нейронах SNc и SNr, в условиях активации первичной моторной коры мозга (M1), что может содействовать новому пониманию механизмов контроля моторики и когнитивных функций мозга, в условиях изменения его пластичности при нейродегенеративных болезнях, что является предметом следующего сообщения.

Материал и методы

Исследования проводили на 8 крысах-самцах Альбино, массой 300 г, в серии экспериментов на интактных животных, согласно «Правилам ухода за лабораторными животными» (публикации НИИ за № 85-23, исправленной в 1985 году). Проводили экстраклеточную регистрацию спайковой активности одиночных нейронов SNc (107 нейронов, $n=4$) и SNr (87 нейронов, $n=4$) в ответ на высокочастотную стимуляцию (ВЧС) первичной моторной коры мозга (M1). После краниотомии раздражающий электрод вживляли в ипсилатеральную M1 по стереотаксическим координатам [14] ($AP+2.1$, $L\pm 2.6$, $DV+1.6$ мм), стеклянный отводящий микроэлектрод с диаметром кончика 1 мкм, заполненный 2М раствором NaCl, погружали в SNc ($AP-5.0$, $L\pm 2.0$, $DV+8.1$ мм) и SNr ($AP-5.1$, $L\pm 2.0$, $DV+8.6$ мм). В целом, была зарегистрирована активность 194 нейронов. ВЧС (100 Гц в течение 1 сек) M1 осуществляли посредством прямоугольных толчков тока длительностью 0,05 мс и силой 0,10–0,16 мА.

Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и депрессии (ТД) с посттетаническими – ПТП и ПТД. Проводили программный математический анализ спайковой активности нейронов в режиме online. Использовали построения комплексных усредненных и суммированных перистимульных временных гистограмм (PETH) числа спайков с разностной кривой и гистограмм частоты, с вычислением средней частоты спайков. Регистрацию выполняли с помощью программы, позволяющей произвести селекцию спайков амплитудной дискриминацией, с выводом «растеров» перистимульного спайкинга, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков. Анализ данных проводили по разработанному алгоритму, обеспечивающему достоверность перистимульных изменений межспайковых интервалов. Однородность двух независимых выборок контролировалась t -критерием Стьюдента. С целью повышения статистической достоверности изменений межспайковых интервалов использовали также двухвыборочный критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, в качестве непараметрического, оценивающего однородность независимых двух выборок. Использовалась разновидность указанного теста – z -тест, определяющий его асимптотическую нормальность. Учет критических значений, в сравнении с таковыми нормального распределения при уровнях 0.05, 0.01 и 0.001, показал, что в большинстве случаев спайкинга статистически значимое изменение достигало, как минимум, уровня 0.05.

Результаты и обсуждение

Посредством анализа на основе усредненного количества спайков, с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты, по сравнению с

престимульным уровнем были обнаружены следующие изменения нейрональной активности.

В нейронах SNc в ответ на ВЧС М1 значения занижения (ТД) и завышения (ТП) относительно престимульной активности исчислялись в следующих пределах. В депрессорной последовательности ТД достигало 1.66-кратного занижения относительно престимульной активности, в депрессорно-возбудительной – 2.5-кратного занижения (рис. 1 А, группы А, Б). В возбудительной последовательности ТП завышала престимульную активность в пределах 1.5-кратного, а в возбудительно-депрессорной – 1.33-кратного (рис. 1 Б, группы А, Б). Таким образом, очевидно приближение усредненных значений занижения и завышения активности в постстимульных однонаправленных проявлениях (1.66 против 1.5) нейронов SNc на ВЧС М1 и меньший уровень постстимульных возбудительно-депрессорных проявлений активности в сравнении с разнонаправленными депрессорно-возбудительными (1.33 против 2.5).

В нейронах SNr в ответ на ВЧС М1 в норме значения занижения (ТД) и завышения (ТП) престимульной активности исчислялись в следующих пределах. В депрессорной последовательности ТД достигало 4.0-кратного занижения, в депрессорно-возбудительной – 3.0-кратного (рис. 1 А, группы В,Г). В возбудительной последовательности ТП исчислялась в пределах 5.66-кратного завышения, а в возбудительно-депрессорной – 1.31-кратного (рис. 1 Б, группы Б, Г). Иными словами, ТП в нейронах SNr оказалось выше ТД в однонаправленной последовательности и, наоборот, ТД намного (более чем вдвое) превысила ТП в разнонаправленной последовательности.

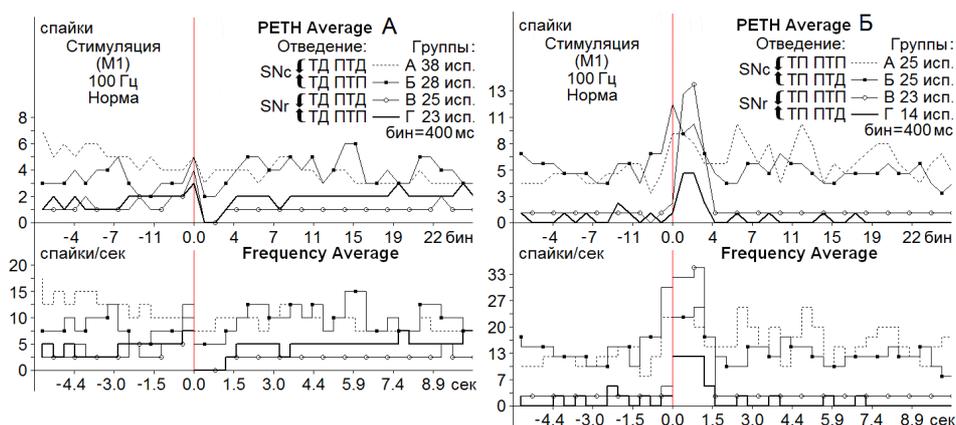


Рис. 1. Усредненные перистимульные гистограммы (PETN Average) и гистограммы частоты (Frequency Average) депрессорных (А, группы А, Б), депрессорно-возбудительных (А, группы Б, Г), возбудительных (Б, группы А, В), возбудительно-депрессорных (Б, группы Б, Г) постстимульных тетанических и посттетанических проявлений активности нейронов SNc и SNr в ответ на ВЧС М1 в норме. Остальные обозначения на рисунке

При оценке относительной степени выраженности вышеотмеченных эффектов, на примере диаграмм усредненной частоты спайков, выведенных на основе растров пре- и постстимульных проявлений спайковой активности нейронов SNc и SNr при ВЧС М1 в норме, с указанием средних цифровых значений в реальном времени 20 сек до и после стимуляции, получены значения, представленные на рис. 2 и 3, на основе которых составлены дисковые диаграммы (рис. 4).

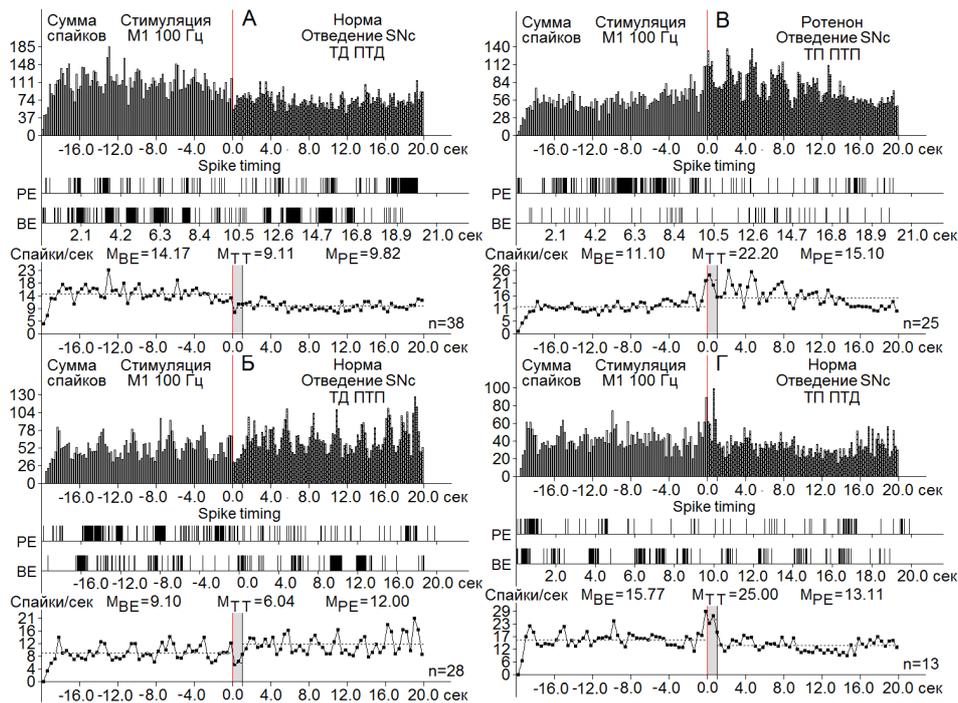


Рис. 2.А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений активности – ТД ПТД (А), в сочетании с возбудительными – ТД ПТП (Б), возбудительных – ТП ПТП (В) и возбудительно-депрессорных – ТП ПТД (Г) (в реальном времени 20 сек до и после стимуляции) нейронов SNc, вызванных ВЧС М1 в норме. Здесь и в следующем рисунке: диаграммы частоты спайков, представленных в гистограммах, с усредненными значениями (М) для временных отрезков до стимуляции (ВЕ – before event), на время стимуляции (ТТ – time tetanization) и после стимуляции (РЕ – post event). Справа от диаграмм – количество испытаний (n)

На рис. 4 в нейронах SNc на ВЧС М1 значения ТД в однонаправленных депрессорных постстимульных проявлениях (А) оказались ниже соответствующих возбудительных – ТП (В), в то время как ТД в сочетании с разнонаправленными посттетаническими (Б) выявлялись почти в равном соотношении разнонаправленным ТП (Г), но с незначительным

превалированием последних. В нейронах SNr, при почти равном соотношении депрессорных одно- и разнонаправленных постстимульных эффектов (рис. 4 А, Б), в возбуждательных – однонаправленные почти втрое превышали разнонаправленные (рис. 4 Б, В).

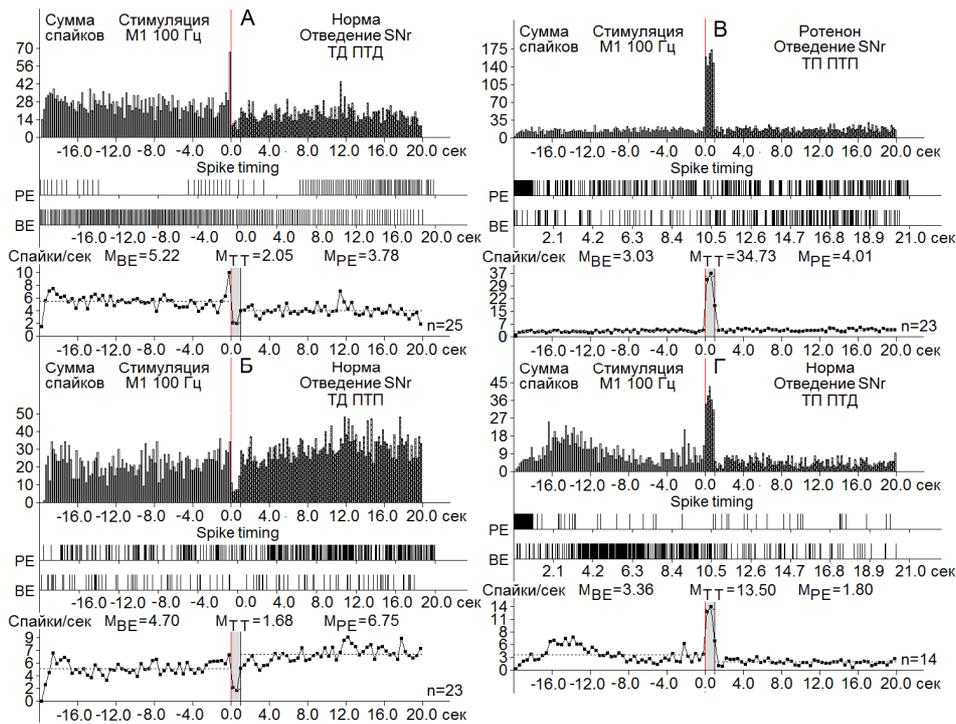


Рис. 3. А-Г – гистограммы суммы спайков пре- и постстимульных депрессорных проявлений активности – ТД ПТД (А), в сочетании с возбуждательными – ТД ПТП (Б), возбуждательных – ТП ПТП (В) и возбуждательно-депрессорных – ТП ПТД (Г), в реальном времени (20 сек до и после стимуляции) нейронов SNr, вызванных ВЧС М1 в норме

На уровне слайсов у грызунов представлены свойства и моноси-наптические признаки между фронтальной корой и STN, и между STN и SNr, выходного ядра гиперпрямого пути [1]. Методом антеро- и ретроградного волоконного трассирования, выявлены кортико-нигральные проекции от префронтальной коры мозга (ПФК) у родентов [7, 8, 19,]. У грызунов этот путь играет центральную роль в регуляции образцов залпирования ДА нейронов, что привело к важным гипотезам, касающимся взаимодействия ПФК/БГ при шизофрении. К тому же проекции ПФК к SN/VTA первоначально документированы у грызунов. Изучение организации афферентов ПФК к среднему мозгу (SN/VTA) у родентов привело к заключению об их важном регуляторном влиянии на систему БГ (кортико-базальный круг).

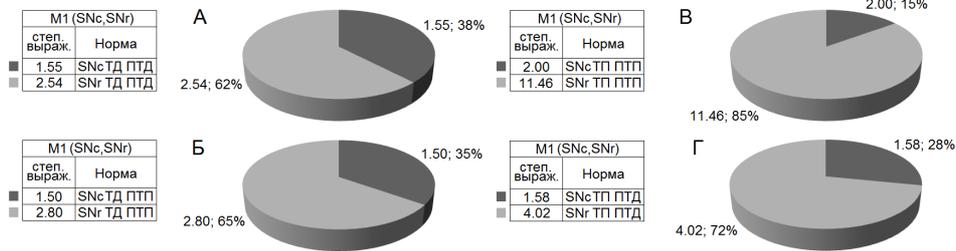


Рис. 4. Процентное соотношение степени выраженности (по усредненной частоте) депрессорных (А), депрессорно-возбудительных (Б), возбудительных (В) и возбудительно-депрессорных (Г) постстимульных эффектов в одиночных нейронах SNc и SNr в ответ на ВЧС М1 в норме

Анатомически и электрофизиологически охарактеризованы прямые и/или не прямые взаимоотношения гиппокампа, ПФК и nucleus accumbens с DA нейронами VTA/SNc у родентов, играющими фундаментальную роль в мотивационных процессах [17]. Согласно данным, на родентах SNr, в частности главная выходная инстанция БГ, воспринимающая информацию от мозговой коры через три главных пути, т.е. прямого тормозного трансстриатного, непрямого возбудительного трансстриатного, который вовлекает паллидум и субталамическое ядро, и прямого возбудительного транс-субталамического пути [9]. Ранее, наличие прямого кортико-нигрального пути было продемонстрировано у кошек методом серебряной импрегнации [15]. Было изучено терминальное распределение кортико-нигральных волокон после разрушения различных полей мозговой коры. Количество кортико-нигральных волокон оказалось значительно меньше, чем ожидалось, главным образом гомолатеральных [15]. Недавние исследования Frankle W. et al. [6] показали очень ограниченную проекцию от ПФК к среднемозговым DA нейронам (SN/VTA) у макаки. Они возникали от широкой области ПФК, включающей DLPF, цингулярную и орбитальную кору. Однако, несмотря на относительный недостаток коркового входа к среднемозговым клеткам у приматов, эти клетки богаты глутаматными рецепторами [6]. К тому же нисходящие ПФК проекции к SN/VTA первоначально документированы у родентов.

В настоящих экспериментах проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов SNc (107 нейронов, n= 4) и SNr (87 нейронов, n=4) в ответ на ВЧС М1 в норме. Анализ на основе усредненного количества спайков, с пересчетом в межимпульсные интервалы и частоты, обнаружил следующие изменения нейрональной активности. Выявлены приближение усредненных значений тетанического занижения и завышения престимульной активности в постстимульных однонаправленных проявлениях (1.66 против 1.5) нейронов SNc на ВЧС М1 и мень-

ший уровень постстимульных возбуждительно-депрессорных проявлений активности в сравнении с разнонаправленными депрессорно-возбудительными (1.33 против 2.5). ТП в нейронах SNr оказалась выше ТД в однонаправленной последовательности и, наоборот, ТД намного (более чем вдвое) превысила ТП в разнонаправленной последовательности. Анализ относительной степени частотной выраженности вышеотмеченных депрессорных и возбуждительных эффектов, на основе диаграмм усредненной частоты спайков, представленный в виде дисковых диаграмм (в %), привел к следующим заключениям. В нейронах SNc депрессорные эффекты по уровню уступали возбуждительным. В нейронах SNr при активации M1 во всех видах последовательностей, как депрессорных, так и возбуждительных, постстимульные реакции оказались резко превалирующими над таковыми в нейронах SNc, что свидетельствует о большей выраженности корковой проекции к SNr, в сравнении с SNc.

Поступила 18.12.17

Վորտիկոնիգրալ պրոյեկցիայի դրդող և արգելակող սինապտիկ պրոցեսների հարաբերակցության միկրոէլեկտրոֆիզիոլոգիական ուսումնասիրությունը ինտակտ առնետների մոտ

Լ.Մ. Խաչատրյան

Փորձերի երկու սերիաներում այբինո ցեղատեսակի 8 առնետների մոտ (300 գ.) իրականացվել է նորմալում *substantia nigra compacta*-ի (SNc- 107 նեյրոններ, n=4) և *substantia nigra reticulate*-ի (SNr - 87 նեյրոններ, n=4) մեկական նեյրոնների իմպուլսային ակտիվության համեմատական վերլուծություն՝ գլխուղեղի առաջնային մոտոր կեղևի (M1) բարձր հաճախականության դրդման (ԲՀԴ) պայմաններում: Սպայկերի միջինացված քանակի, միջիմպուլսային ինտերվալների և հաճախականության վերահաշվարկի վերլուծությունը բացահայտել է հետևյալ տետանիկ դեպրեսոր և դրդող (SԴ և SՊ) և պոստտետանիկ ռեակցիաները միատողված (SԴ ՊSԴ և SՊ ՊSՊ) և տարատողված (SԴ ՊSՊ և SՊ ՊSԴ) հետստիմուլային շարքերում: Բացահայտվել է SNc նեյրոններում M1 ԲՀԴ-ից միջինացված արժեքների մոտեցում տետանիկ իջեցմանը և նախաստիմուլային ակտիվության բարձրացում՝ հետստիմուլային միատողված դրսևորումներում (1.66 դեմ 1.5-անգամի) և հետստիմուլային դրդող-դեպրեսոր ակտիվության դրսևորման ցածր մակարդակ՝ համեմատած տարատողված դեպրեսոր – դրդողի հետ (1.33 դեմ 2.5-ի):

ՏՊ-ն SNr նեյրոններում պարզվեց ՏԴ-ից բարձր է միատողոված շարքում, և ընդհակառակը, տարատողոված շարքում ՏԴ-ն ավելի քան երկակի գերազանցել է ՏՊ-ին: Վերոնշյալ դեպրեսոր և դրդող պրոցեսների հաճախականության դրսևորման համեմատական աստիճանի վերլուծությունը սպայկերի միջինացված քանակի դիագրամների հիման վրա, ներկայացված սկավառակային դիագրամների տեսքով (%), բերեց հետևյալ եզրակացության: SNc նեյրոններում դեպրեսոր էֆեկտներն ըստ մակարդակի զիջել են դրդողներին: SNr նեյրոններում գլխուղեղի կեղևի M1 ակտիվացումից, ընդհանուր առմամբ, ինչպես դեպրեսոր, այնպես էլ դրդող հետստիմուլային ռեակցիաները, պարզվեց, կտրուկ գերակշռող են այդպիսիներից SNc նեյրոններում, որը վկայում է կեղևի պրոյեկցիայի մեծ արտահայտվածության մասին SNr-ի նկատմամբ համեմատած այդպիսիին SNc ի նկատմամբ:

The microelectrophysiological study of synaptic excitatory and depressor processes correlation at cortico-nigral projection in intact rats

L.M. Khachatryan

In 2 series of experiments in 8 albino rats (300g.) a comparative analysis of single neuron's impulse activity of substantia nigra compacta – SNc (107 neurons, n=4) and substantia nigra reticulate – SNr (87 neurons, n=4) at high frequency stimulation (HFS) of the brain primary motor cortex (M1) in norm has been conducted. By means of analysis on the basis of the spikes average number, with conversion in inter-impulse intervals and frequencies, the following changes of depressor and excitatory tetanic (TD and TP) and posttetanic reactions in unidirectional (TD PTD and TP PTP) and in multidirectional (TD PTP and TP PTD) poststimulus sequences have been revealed. It has been revealed the approximation of average values of tetanic understatement and overstatement of prestimulus activity in poststimulus unidirectional manifestations (1.66-against 1.5-multiple) of the SNc neurons at M1 HFS and smaller value of poststimulus excitatory-depressor activity, in comparison with depressor-excitatory (1.33-against 2.5-multiple). TP in the SNr neurons proved above TD in unidirectional succession and, contrary, in multidirectional succession TD much (more than twice) exceeded TP. Analysis of relative degree of above mentioned depressor and excitatory effects intensity on the basis of spikes average frequency diagrams, the meaning in per cent resulted in the following conclusions. In the SNc neurons depressor effects on the level of the inferior excitatory. In the SNr neurons, in general, depressor as well as excitatory poststimulus reactions in the SNr neurons under M1 activation dramatically

prevailed, over such in the SNc neurons, that testified to the higher intensity of cortical projections to SNr, in comparison with such in the SNc.

Литература

1. *Bosch C., Maily P., Degos B., Deniau J.-M., Venance L.* Preservation of the hyperdirect pathway of basal ganglia in a rodent brain slice. *Neuroscience*, 2012; 215:31-41.
2. *Cacciola A., Milardi D., Quartarone A.* Role of cortico-pallidal connectivity in the pathophysiology of dystonia. *Brain*, 2016. doi: 10.1093/brain/aww102. [Epub ahead of print].
3. *Carma J.B.* Anatomic basis of surgical treatment of Parkinson's disease. *N. Engl. J. M.*, 1968, 17: 919–930.
4. *Chowdhury R., Lambert C., Dolan R.J., Düzel E.* Parcellation of the human substantia nigra based on anatomical connectivity to the striatum. *Neuroimage*, 2013, 81:191–198.
5. *Düzel E., Bunzeck N., Guitart-Masip M., Wittmann B., Schott B.H., Tobler P. N.* Functional imaging of the human dopaminergic midbrain. *Trends Neurosci.*, 2009,32: 321–328.
6. *Frankle W.G., Laruelle M., Haber S.N.* Prefrontal cortical projections to the midbrain in primates: evidence for a sparse connection. *Neuropsychopharmacology*, 2006, 31: 1627–1636.
7. *Höglinger G.U., Alvarez-Fischer D., Arias-Carrión O. et al.* A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathol.*, 2015,130: 333–348.
8. *Jasmin L., Granato A., and Ohara P.T.* Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat. *J. Comp.Neurol.*, 2004, 468: 425–440.
9. *Kolomiets B.P., Deniau J.M., Glowinski J., Thierry A.M.* Basal ganglia and processing of cortical information: functional interactions between trans-striatal and trans-subthalamic circuits in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience*, 2003, 117(Issue 4): 931-938.
10. *Kornhuber J.* The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantianigra following frontal cortex ablation in the rat. *Brain Res.*, 1984, 322:124–126.
11. *Kwon H.G., Jang S.H.* Differences in neural connectivity between the substantia nigra and ventral tegmental area in the human brain. *Front. Hum. Neurosci.*, 2014, 8:41
12. *Menke R. A., Jbabdi S., Miller K. L., Matthews P. M., Zarei M.* Connectivity-based segmentation of the substantianigra in human and its implications in Parkinson's disease. *Neuroimage.*, 2010, 52: 1175–1180.
13. *Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R.C.* *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience.* New York, NY: McGraw-Hill Medical., 2009.
14. *Paxinos G., Watson C.* *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier, Academic Press, 5th ed., 2005.
15. *Rinvik E.* The cortico-nigral projection in the cat an experimental study with silver impregnation methods. *J. Compar. Neurol.*, 1966, 126(Issue 2): 241–254.
16. *Sesack S.R., Carr D.B.* Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol. Behav.*, 2002, 77: 513–517.

17. *Thierry A.-M., Gioanni Y., Dégénétais E., Glowinski J.* Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*, 2000, 10(Issue 4): 411–419.
18. *Voorn P., Vanderschuren L. J., Groenewegen H. J., Robbins T. W., Pennartz C. M.* Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.*, 2004, 27: 468–474.
19. *Zakiewicz I.M., Bjaalie J.G., Leergaard T.B.* Brain-wide map of efferent projections from rat barrel cortex. *Front. Neuroinform.*, 2014, 8: 5.
20. *Zhou F. M., Lee C. R.* Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience*, 2011, 198: 69–94.