

**В.М. Казаков, Л.В. Натрус, О.В. Гайдарова,
О.В.Терещенко, В.Г. Гур'янов, А.А. Віслий**

Новий метод аналізу імпульсної активності нейронів мозку

Исследование импульсной активности (ИА) нейронов мозга имеет большое значение как попытка связать функцию нейронов с их фоновой активностью. Нами предложен оригинальный метод анализа фоновой и вызванной ИА термосенситивных нейронов переднего гипоталамуса при температурных воздействиях. В остром опыте на кошках под кетаминевым наркозом отводили ИА нейронов внеклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов. Запись фона ИА нейронов гипоталамуса осуществляли в течение 30 с, а постстимульной активности – 60 с. По гистограмме средней частоты ИА нейрона компьютерная программа давала возможность вычислять среднее значение фоновой активности, а затем относительное отклонение от среднего значения в каждом бине вызванной ИА. По результатам строилась гистограмма распределения отклонений в диапазоне $\pm 100\%$ с периодом 10%. По оси ординат отмечалась частота встречаемости данных отклонений. Сравнивались гистограммы распределения отклонений фоновой активности данного нейрона и его ИА после воздействия. Предполагается, что результаты анализа фоновой активности термочувствительных нейронов гипоталамуса, корреляция их с типом ответов нейронов на наносимые висцеральные стимулы, сопоставление полученных результатов с локализацией нейронов может позволить более детально интерпретировать особенности функции нейронов гипоталамуса.

ВСТУП

Відомо, що функціональні особливості нейронів корелюють з характером їх фонової імпульсної активності (ФІА). При цьому під ФІА маються на увазі ті електричні процеси, що розвиваються в нервовій клітині без будь-яких контрольованих експериментатором зовнішніх впливів [2]. Вважається, що причиною фонових ритмів є аферентна імпульсація, що надходить до нейрона від екстеро- та інтерорецепторів і інших нервових клітин. Установлено, що ФІА одного і того самого нейрона може змінюватися під дією факторів, що впливають на функціональний стан нервової системи. У таких умовах імпульсну активність (ІА) нейрона характеризують як викликану дією подразника. У цьому зв'язку дослідження змін імпульсації

нейронів гіпоталамуса у разі впливу будь-яких висцеральних подразнень має велике значення для спроби визначення ролі ФІА в зв'язку з функцією нейрона.

Існує низка методів і підходів з використанням різних статистичних програм для опису ФІА нейронів. Так, були описані: структура щільності ймовірностей розподілу міжімпульсних інтервалів нейрональної активності, як показника функціонального стану нейрона [5], і характеристики гістограм розподілу міжімпульсних інтервалів, залежно від структури ФІА. Виділено три типи розподілів: асиметричне, симетричне і бімодальне (полімодальне) [7, 8]. Охарактеризовано автокорелограми розподілів міжімпульсних інтервалів, щоб відобразити ступінь регулярності поточної ІА нейронів [1, 10], а також описано метод визначення

© В.М. Казаков, Л.В. Натрус, О.В. Гайдарова, О.В.Терещенко, В.Г. Гур'янов, А.А. Віслий

частот ФІА за умов хронічного вісцерального впливу [4]. Однак жоден з описаних методів не дозволяє однозначно інтерпретувати отримані результати для з'ясування функціональних особливостей нервових клітин.

Нами раніше було відзначено [7, 8], що в деяких випадках тип розподілу гістограм міжімпульсних інтервалів міг змінюватися під впливом електричної стимуляції різних ділянок кори головного мозку. Після нанесення вісцеральних стимулів тип фонові ритміки в деяких нейронах також може значно змінитися. Проте застосовувані нами статистичні методи (фрактальний, кластерний, спектральний аналіз), вірогідно не підтверджували візуальні спостереження, а, як правило, дозволяли розділяти всі нейрони по групах залежно від середньої частоти ФІА.

Установлено, що варіабельність частоти фонові активності нейронів гіпоталамуса знаходиться в широкому діапазоні – від 0,2 до 40 імпл/с, а в деяких випадках відбувається зміна частоти ІА нейрона в післядії (як відображення реакції на вплив). Усе це не дозволяє відповісти на запитання про стабільність типу активності даного нейрона. Тому вивчення структури ФІА нейронів гіпоталамуса після нанесення вісцеральних подразнень безсумнівно є актуальним.

Для таких досліджень був розроблений універсальний, статистичний метод аналізу ІА нейронів без розрахунку її середньої частоти, що дозволив би порівняти між собою ФІА нейронів і оцінити перетворення ІА кожного нейрона після пред'явлення короткочасного вісцерального стимулу. Причому очікувалося, що вісцеральна стимуляція може впливати на досліджуваний нейрон як безпосередньо, так і опосередковано, через систему клітин, що входять до складу нейронних мереж, залучених до регуляції гомеостазу. З цією метою вивчалася ФІА нейронів преоптичної ділянки

гіпоталамуса кішки і ІА цих нейронів під впливом температурного чинника (зміни температури подушечки лапи тварини), найбільш адекватного стимулу для даної структури мозку.

Передбачається, що за допомогою проведеного аналізу можна буде виявити статистично достовірні розходження в структурі ФІА нейронів переднього гіпоталамуса, зміни вихідного типу фонові ритміки під дією вісцеральних стимулів у нейронів, причетних до центральної регуляції гомеостазу у тварин.

МЕТОДИКА

У гострих дослідах на 10 дорослих кішках різної статі масою 2,5–3,2 кг під кетаміновим наркозом (Calypsol, “Гедеон Ріхтер А.О.”, Угорщина, 25 мг/кг внутрішньом'язово) відводили позаклітинно ФІА від гіпоталамічних нейронів за допомогою скляних мікроелектродів, заповнених розчином NaCl (2 моль/л), з опором 10–30 МОм. Реєстрацію й аналіз біопотенціалів, а також індикацію положення кінчика мікроелектрода при його переміщенні здійснювали за допомогою програмно-технічного комплексу [3]. Процедуру реєстрації реакцій нейронів на вісцеральну стимуляцію запускали тільки в тому разі, якщо ФІА, що відводиться від нейрона, мала стійкий характер. Подачі вісцерального стимулу передував запис фону протягом 30 с, далі впливав температурний чинник у вигляді нагрівання чи охолодження подушечки лапи тварини на 7°C (раніше докладно описано й обґрунтовано [9]). Застосована стимуляція давала можливість ідентифікувати нейрони як термосенситивні. Цикл стимуляції завершувався як мінімум хвилинним постстимульним записом ІА нейрона. Будували гістограми середньої частоти ІА нейрона з біном 1000 мс. Вірогідність розходжень середніх частот ФІА нейронів і ІА під час стимуляції і після неї визначали за допо-

могою критерію U (Вілкоксона-Манна-Уїтні). Розходження вважали вірогідними при $P < 0,05$. Таким чином, при достовірному збільшенні/зниженні ІА під час подразнення або відразу після нього, можна було визначити здатність нейрона на відповідь.

Аналіз ІА досліджуваних нейронів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми, що дозволяє обчислювати медіану частот у двох епохах: ФІА протягом 30 с і ІА протягом 30 с відразу після закінчення стимуляції. Розраховували відносне відхилення поточної частоти ІА нейрона від медіани в кожному біні. Отримані результати відображали на двох гістограмах (перша – аналіз ФІА, друга – ІА після стимуляції). Гістограми будували таким чином, щоб частота, яка відповідає середній (тобто відхилення від медіани частот дорівнює нулю) відкладалася в середній частині графіка на відмітці $\Delta 0\%$. Інші точки, що характеризували відхилення від медіани частот на $\pm 10, \pm 20 \dots \pm 100\%$ розташовувалися на гістограмах відповідно по обидва боки від нульової відмітки. Порівнювали гістограми розподілу відносного відхилення від медіани в кожному біні ФІА даного нейрона до стимуляції і його ІА після неї.

Потім проводили кластерний аналіз отриманих гістограм (методом К-середніх). Було виділено три варіанти гістограм відхилень, що достовірно відрізнялися один від одного. За допомогою усереднення гістограм відхилень для перших двох варіантів було побудовано теоретичні функції розподілу. Для класифікації гістограм розподілу відхилень ФІА і ІА після стимуляції кожного нейрона порівнювали ці гістограми з теоретичними функціями за критерієм згоди Пірсона (χ^2) за допомогою комп'ютерної програми "STADIA". Вважається, що емпірична крива узгоджується з теоретичною, якщо ймовірність згоди більша ніж 0,05. Якщо вона менша, то дана гістограма відносилася до третього варіанта.

Таким чином, у кожного дослідженого нейрона визначали ступінь відмінності

гістограми розподілу відхилень ФІА і його ІА після стимуляції, а також порівнювали типи імпульсації нейронів за побудованими гістограмами відхилень.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всього проаналізували 138 нейронів преоптичної ділянки гіпоталамуса (Fr 13,5–15, за атласом Джаспера [12]). З аналізу було виключено записи від 31 нейрона (19 – через нестабільність відведення і 12 – частоти імпульсації, нижче ніж 0,2 імп/с). Аналізувалася ІА 107 нейронів преоптичної ділянки. Аналіз ФІА цих нейронів за допомогою описаного методу показав, що вся сукупність побудованих гістограм розподілу відхилень поділяється на три варіанти, що істотно відрізняються один від одного. За першим і другим варіантами гістограм ми побудували теоретичні функції. Третій варіант не мав будь-якої закономірності. Статистичний аналіз виявив, що в більшості нейронів варіант гістограми розподілу відхилень від середньої величини не змінювався після стимуляції, а в деяких нейронів він помітно перетворювався, що підтверджувалося статистично.

Перший варіант гістограм відхилень характеризувався групуванням величин відхилень у ділянці нульових значень і наявністю піка в діапазоні $0\% \pm 20\%$ (рис. 1), що вказувало на незначні відхилення частоти ФІА у кожному біні від медіани частот у даній епосі аналізу і відображало рівномірність нейронограм і монотонність гістограм середньої частоти, що важко визначити візуально. Було виділено 28 нейронів (26,2%) з цим типом ФІА, з них на температурний вплив реагували достовірним підвищенням чи зниженням середньої частоти імпульсації 7 нейронів (25%). Є літературні дані, що пояснюють такий тип ІА нейронів виключно їх релейними функціями [11]. Ми припускаємо, що цей тип ІА може бути пояснений або обмеженою кількістю активних синаптичних входів до

нейрона в даний момент, або несприйнятливостю нейрона до деяких входів у силу особливостей рівня його мембранного потенціалу. Оскільки відомо, що патерн фонової активності пов'язаний з рівнем спонтанної активності, котра, в свою чергу, зумовлена рівнем мембранного потенціалу [6].

Гістограми з другим варіантом відхилень відрізнялися від першого варіанта тим, що частота випадків відхилень від середньої була приблизно однакова у всіх аналізованих періодах, розташовувалася рівномірно в діапазоні $0 \pm 80-100\%$ і не мала виражених мод (рис. 2). Така гістограма розподілу відхилень, на наш погляд, свідчить про високу нерегулярність і нерів-

номірність ІА нейрона. Було виділено 14 нейронів (13,1%) із зазначеним типом ФІА, з них термосенситивних – 8 (57% від 14). Імовірно, подібний тип ІА може відображати велику кількість активних синаптичних входів до даного нейрона, на які він реагує в момент реєстрації. Можливо, це викликано тим, що аферентні імпульси надходять не одночасно, а «каскадом» [6]. Однак, якщо наприклад, кількість і сила аферентних сигналів, що підходять до нейронів з першим типом гістограм відхилень і з другим – однакова, можна припускати коливання рівня мембранного потенціалу нейрона. Описано істотну деполяризацію нейронів гіпоталамуса, яка поєдна-

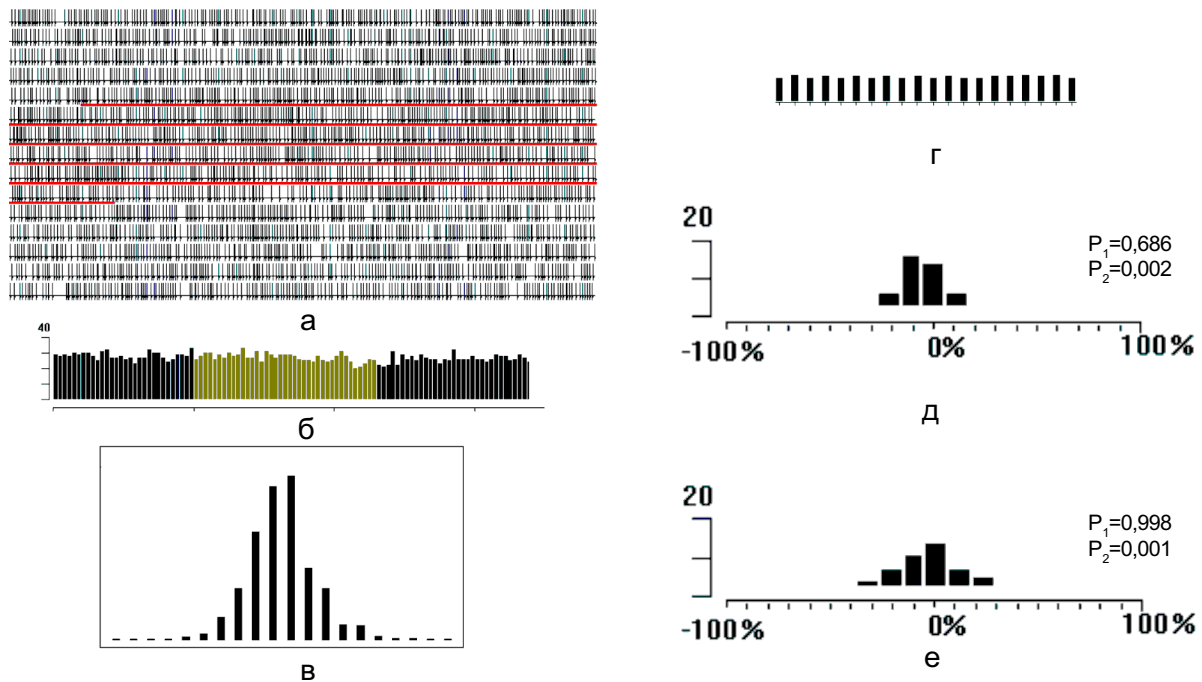


Рис. 1. Імпульсна активність нейрона перивентрикулярного ядра преоптичної ділянки гіпоталамуса кішки до, під час і після стимуляції (охолодження подушечки лапи на 7°C): а – запис імпульсної активності (ІА) нейрона, суцільна лінія під нейронограмою – час охолодження; б – гістограма середньої частоти ІА нейрона, бін 1000 мс; сірим кольором на гістограмі відзначено період стимуляції; в – теоретична функція розподілу, побудована шляхом усереднення гістограм відхилень першого варіанта; г – теоретична функція розподілу, побудована усередненням гістограм відхилень другого варіанта; д – гістограма розподілу числа відхилень (у %) від медіани частоти ІА в кожному біні (30 с до початку стимуляції); по осі абсцис відмічено відхилення від значення медіани; по осі ординат – частота зустрічальності даних відхилень. P_1 – ступінь вірогідності узгодження цієї гістограми з теоретичною функцією першого варіанта, P_2 – другого варіанта; е – гістограма розподілу числа відхилень (у %) від середньої частоти ІА у кожному біні (30 с після закінчення стимуляції). Позначення як на (д). Відмічено, що гістограми розподілу величини відхилень від середньої частоти ІА на (д) і (е) з високим ступенем вірогідності збігаються з зазначеною теоретичною функцією і є прикладом першого варіанта гістограм відхилень

на з високою активацією синаптичних входів від аферентних стимулів під час вираженого мотиваційного стану на стадії генералізації умовного рефлексу. Не можна проігнорувати і той факт, що максимальна кількість термосенситивних нейронів мала ФІА, що відображувалася другим типом гістограм відхилень, або спостерігалось перетворення ІА з одного типу в іншій.

Третій варіант гістограм розподілу відхилень від середньої величини був виявлений у 57 досліджуваних нейронів гіпоталамуса (53,2%), з них 20(37%) – виявляли термосенситивність. Як зазначалося вище, нам не вдалося визначити хоч би один характерний тип гістограм розподілу відхилень у даних нейронів. Як правило, вони мали кілька виражених мод. При цьому кількість мод відхилень могла зберігатися після нанесення подразнення, іноді змінюватися (рис. 3,а), у деяких випадках ставати протилежною (див. рис 3, б). Дослідження ФІА нейронів цього типу вимагає додаткового, більш глибокого аналізу, пошуку нових динамічних змін ІА, що відображають функціональний стан

нейронів. Відомо, що активність нейронів гіпоталамуса носить дуже складний характер. При подразненні будь-якого рецептивного поля на одній і тій же клітині завжди збуджується велика кількість входів, а та реакція, яку ми реєструємо – сумарна [6].

Особливий інтерес представляють нейрони, у яких після стимуляції відбувалося перетворення гістограм розподілу відхилень одного варіанта в іншій. Наприклад, охолодження подушечки лапи кішки викликало в нейронів латеральної преоптичної ділянки перехід з першого варіанта в другий (рис. 4,а) або ж, навпаки, з другого варіанта в перший (див. рис. 4,б). Також спостерігалися різні комбінації перетворення гістограм розподілу відхилень між усіма трьома варіантами. Зміна варіанта гістограм після стимуляції спостерігалася в 8 (7,5%) нейронів. При цьому 5 нейронів (62,5%) відповідали на температурний стимул збудженням чи гальмуванням ІА, а в 3-х нейронів (37,5%) не спостерігалось достовірної зміни частоти імпульсації під час стимуляції чи відразу після неї.

Наявність нейронів, у яких після температурної стимуляції відбувалося перетво-

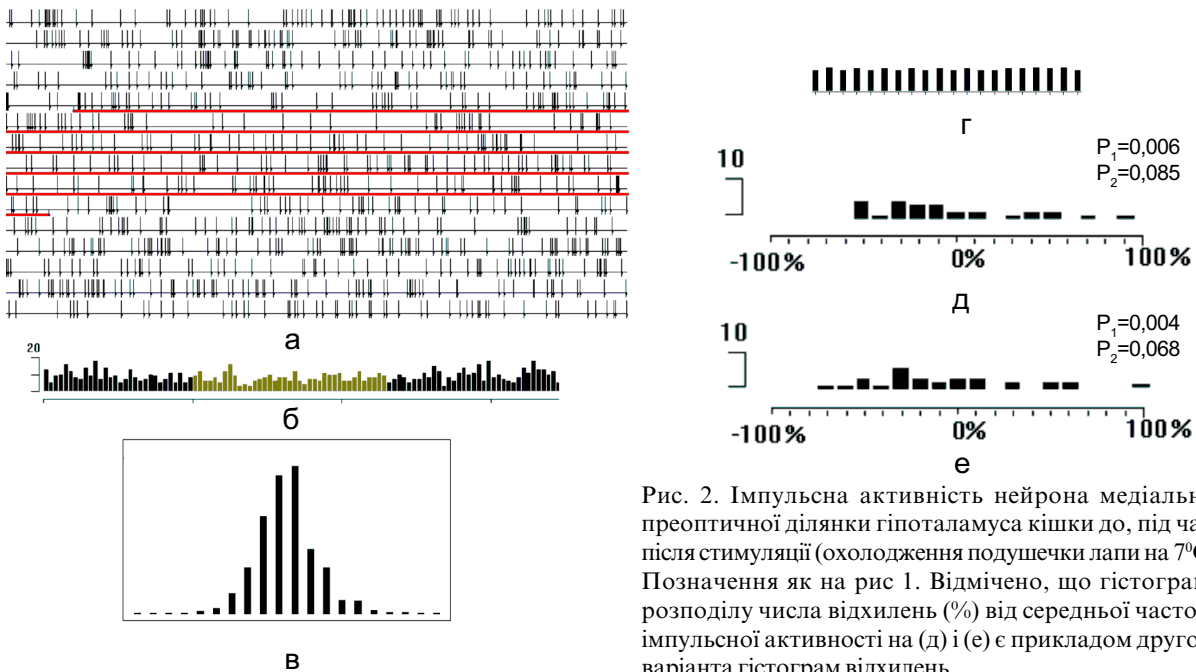


Рис. 2. Імпульсна активність нейрона медіальної преоптичної ділянки гіпоталамуса кішки до, під час і після стимуляції (охолодження подушечки лапи на 7⁰C). Позначення як на рис 1. Відмічено, що гістограми розподілу числа відхилень (%) від середньої частоти імпульсної активності на (д) і (е) є прикладом другого варіанта гістограм відхилень

рення ФІА, і при цьому не змінювалася її частота (тобто не спостерігалось достовірних реакцій збудження чи гальмування), свідчить про те, що статистичний аналіз характеру ФІА є дуже важливим для характеристики реакцій таких нейронів. Раніше термосенситивними нейронами вважали тільки ті, у яких у відповідь на температурну стимуляцію відбувалося підвищення чи зниження середньої частоти імпульсації на $\pm 40\%$. Разом з тим зміна характеру ІА у відповідь на стимуляцію без зміни її середньої частоти, ймовірно, є одним із важливих способів кодування інформації, що може бути більш терміновим і, можливо, енергетично більш вигідним. Це дозволяє запускати механізми терморегуляції практично миттєво, без затрат часу й енергії на структурні перебудови синапсів мозку. Показано, що при тривалому впливі температурного фактора відбувається зміна

кількості синапсів і їхньої структури [13]. При коливаннях температури в межах фізіологічної норми, або як у нашому дослідженні – локальній зміні температури ділянки тіла, подібні механізми негайного реагування дають змогу здійснювати терморегуляцію, втягуючи мінімальне число нейронів у процес активації чи гальмування. Можливо, що для запуску тих чи інших реакцій організму, на початковому етапі досить змінити патерн імпульсації, тоді як нейрони з ІА, що змінюється після нанесення впливу, діють на інші термосенситивні нейрони. Ми гадаємо, що така зміна ІА свідчить про залучення цих клітин у нейронні мережі, причетні до регуляції температурного гомеостазу, оскільки найбільшу кількість таких нейронів виявлено саме в тих місцях преоптичної ділянки гіпоталамуса, де були локалізовані термосенситивні нейрони.

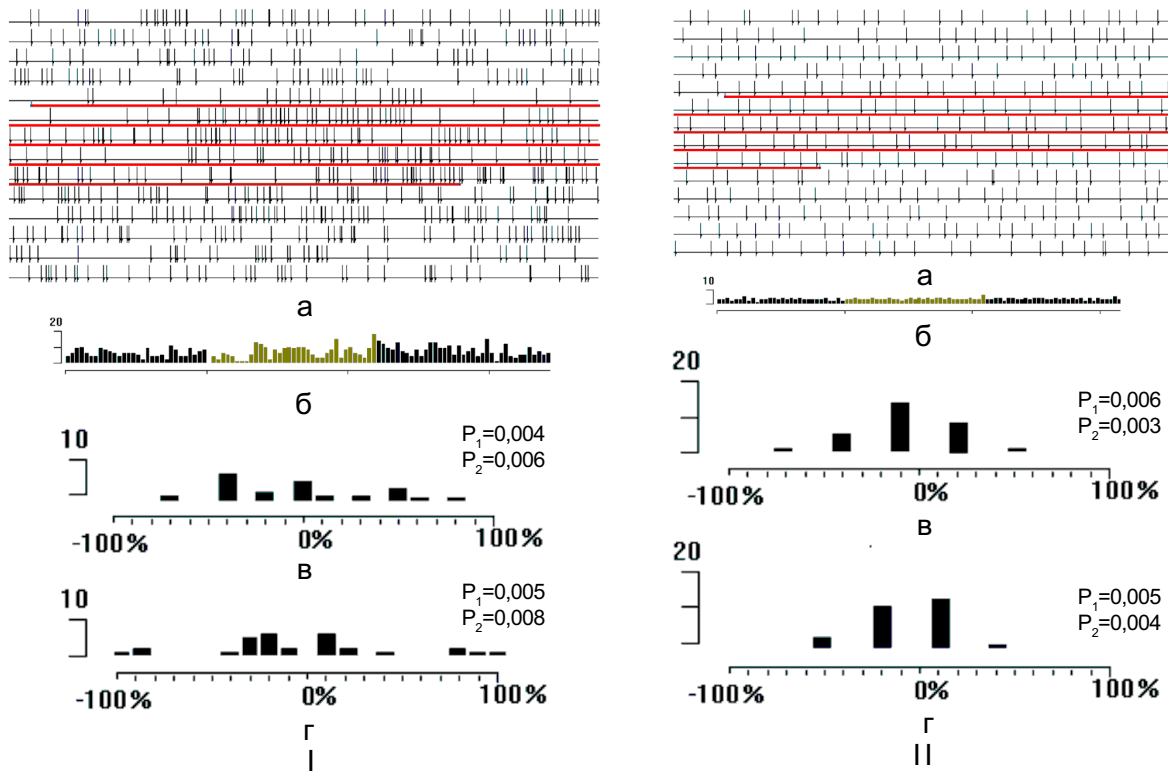


Рис. 3. Приклади різних типів імпульсної активності (ІА) нейронів переднього гіпоталамуса при нагріванні подушечки лапи: І – ІА нейрона латерального гіпоталамуса, ІІ – ІА нейрона ділянки перивентрикулярного ядра. Позначення як на рис. 1

При використанні цього методу аналізу ІА гіпоталамічних нейронів, було відзначено його істотні відмінності від відомих нам раніше. По-перше, ступінь відхилення кількості імпульсів у біні від медіани частот для кожного нейрона, виражена у відсотках, дозволяє порівнювати структуру ІА, не беручи до уваги частоту імпульсації нейрона. По-друге, отримана гістограма розподілу відхилень дає змогу статистично вірогідно визначити зміну структури ІА до та після стимуляції і порівняти тип фонові ритміки декількох нейронів, а також виявити ті з них, котрі селективно відповідають на вісцеральну стимуляцію.

Різноманітність ФІА нейронів гіпоталамуса, очевидно відображає не тільки складність нейронної організації цієї структури, але і безупинну динамічну взаємодію джерела аферентних потоків, центральних механізмів регуляції і ефекторної ланки, необхідних для підтримки гомеостазу в стані відносного спокою.

Не виключено, що виявлена нами властивість нейронів – у відповідь на подразнення змінювати характер ІА без зміни частоти імпульсації, є універсальною і використовується в процесах регуляції інших характеристик гомеостазу (осмотичний статус, глюкозний обмін, підтримка тиску тощо).

Однак клітинні та молекулярні механізми цього явища ще потрібно розкрити. Слід відповісти на питання, чи є такий характер перебудови ІА властивістю лише нейронів гіпоталамуса, чи ж, можливо, інших центральних нейронів? Чи буде спостерігатися це явище в нормі та за умов тривалих, інтенсивних або хронічних впливів?

Проведені дослідження вказують на необхідність пошуку подальших методів аналізу.

Отримані результати свідчать про те, що запропонований новий метод аналізу ІА нейронів, дозволяє розширити можливості дослідження особливостей функціональної

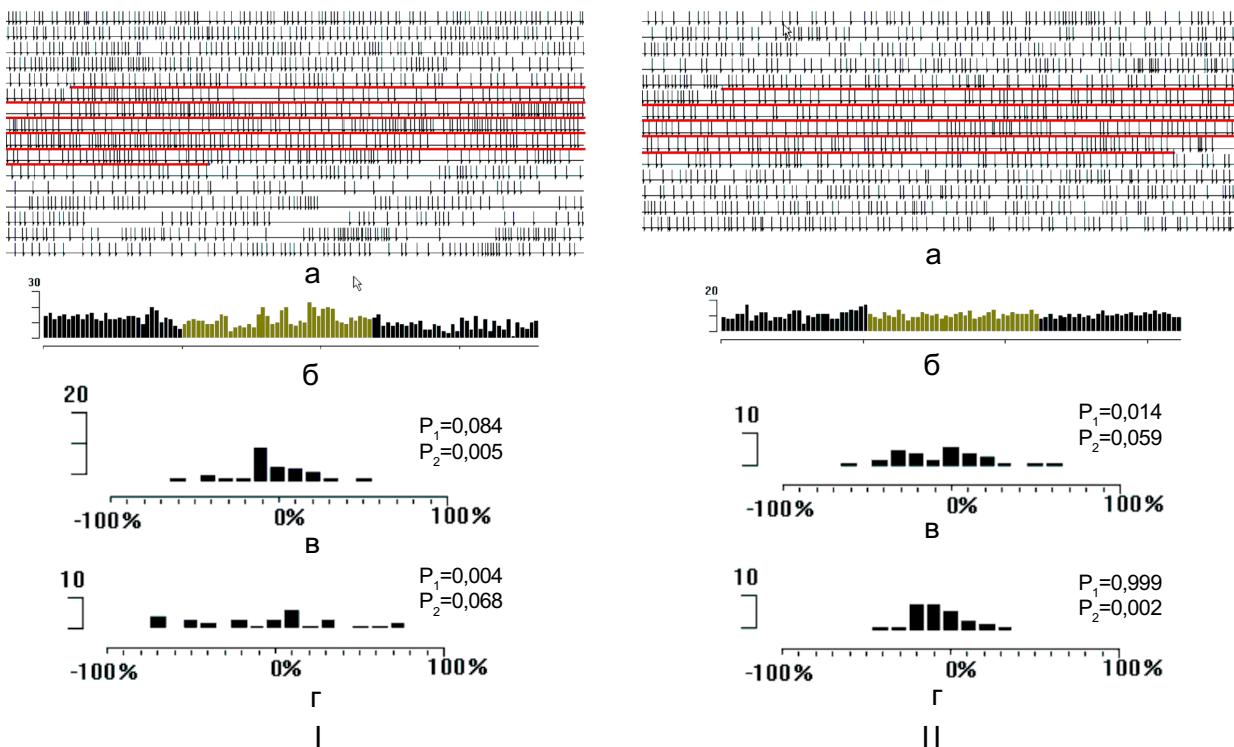


Рис. 4. Приклади (I, II) зміни структури імпульсної активності (ІА) нейронів латеральної преоптичної ділянки після охолодження подушечки лапи. Позначення як на рис. 1

діяльності нейронів мозку. Очевидно, що докладний аналіз фонові активності нейронів гіпоталамуса та характеру модуляції її у відповідь на вісцеральні та кортикальні сигнали, зіставлення виявлених закономірностей перебудови ІА з локалізацією нейронів, дозволить здійснити більш детальну функціональну ідентифікацію нейронів гіпоталамуса і інтерпретувати їхню роль у механізмах терморегуляції, однієї з важливих функцій організму.

**V.M. Kazakov, L.V. Tatus, O.V. Gaidarova,
O.V. Tereschenko, V.G. Guryanov, A.A. Vislyi**

A NEW METHOD OF ANALYSIS OF IMPULSE ACTIVITY OF BRAIN NEURONS

Investigation of impulse activity of hypothalamic neurons is of a great importance in attempt to connect the neuronal function with its activity. We have proposed an original method of analysis of background and temperature-induced impulse activity of thermosensitive neurons from frontal hypothalamus. In acute experiments on cats under ketamine anesthesia neuronal activity was measured by glass microelectrode. Measurements of background neuronal activity was performed during 30 s, and post-stimulus activity was measured during 60 s. Computer program calculated the mean value of background activity. These results were used to create bar graph in the range $\pm 100\%$ with time interval 10%. It is suggested that the results of analysis of background activity of thermosensitive hypothalamic neurons allow interpret the characteristics of functions of hypothalamic neurons.

Donetsk Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Асратян А.А., Худавердян Д.Н., Багдасарян К.Г., Саркисян З.Ш. Фоновая активность нейронов супраоптического ядра и влияние на нее паратиреоидного гормона // *Нейрофизиология*. – 1999. – 31, № 5. – С. 404–411.

2. Волошин М.Я. Электрофизиологические методы исследования головного мозга в эксперименте. – К.: Наук. думка, 1987. – 192 с.
3. Казаков В.Н., Кравцов П.Я., Кузнецов И.Э., Терещенко А.В. Метод изучения активности нейронов преоптической области в условиях их адекватной стимуляции // *Физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. – 1992. – 78, № 5. – С. 116–120.
4. Казаков В.Н., Кузнецов И.Э., Кравцов П.Я., Терещенко А.В. Функционально обусловленные изменения осмотической чувствительности нейронов переднего гипоталамуса // *Архив клин. и эксперим. медицины*. – 2001. – 10, № 1. – С. 3–12.
5. Клименко В.М., Каплуновский А.С. Статистическое исследование импульсной активности структур заднего гипоталамуса // *Физиол. журн. СССР им. И.М. Сеченова*. – 1972. – 58, № 10. – С. 1484–1493.
6. Костюк П.Г. Фоновая импульсная активность центральных нейронов и ее анализ. – В кн.: *Современные проблемы физиологии и патологии нервной системы*. – М.: Медицина, 1965. – С. 28–46.
7. Кравцов П.Я. Преоптическая область: Автореф. дис. ...д-ра мед.наук.: – Д., 1995. – 35 с.
8. Кузнецов И.Э., Натрус Л.В. Характеристика фонові активності нейронів рostrального гіпоталамуса та аналіз її зміни під впливом подразненя філогенетично гетерогенних відділів кори головного мозку // *Фізіол. журн.* – 1999. – 45, №5. – С. 23–30.
9. Кузнецов И.Э. Роль рostrальных отделов гипоталамуса в терморегуляции и контроле пищевого поведения // *Арх. клин. и эксперим. медицины*. – 1998. – 7, №1. – С. 106–116.
10. Худавердян Д.Н., Асратян А.А., Вардересян И.В. и др. Анализ фоновой импульсной активности нейронов голубого пятна крысы // *Нейрофизиология*. – 2000. – 32, № 4. – С. – 308–313.
11. Anderson D.J., Correia M.J. The detection and analysis of point processes in biological signals // *Proceedings IEEE*. – 1977. – 65, №5. – P. 773–780.
12. Jasper H., Ajmone-Marsan C. A Stereotaxic Atlas of the Diencephalon of the Cat. – Ottawa, 1954. – 324 p.
13. Kazakov V.N., Gaidarova E.V., Kravtsov P.Ya., Tereshchenko A.V., Natrus L.V. Morphofunctional changes of the neuroendocrinal system in hyperthermia // *Acta Physiol. (Hungarica)*. – 89, № 1–3, 2002. – P. 313.

Донец. мед. ун-т ім. М. Горького

*Матеріал надійшов до
редакції 25.05.2004*