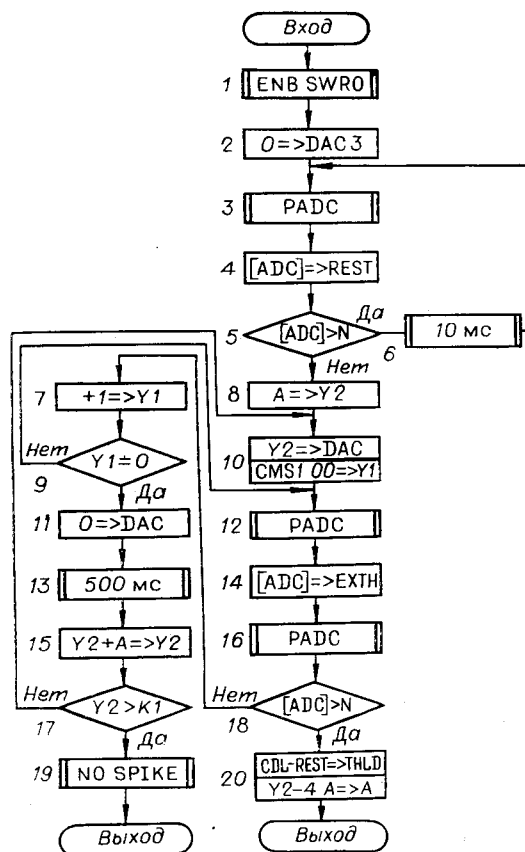


Рис. 12. Блок-схема подпрограммы измерения порога возбудимости нейрона.

ствия тестирующего импульса измеряется реакция нейрона с периодом квантования около 100 мкс, и если амплитуда в реакции превышает заданный порог (N), то программа идентифицирует наличие спайка в реакции. Если спайк во время действия импульса не обнаружен, то по истечении времени, необходимого для реактивации мембраны (блок 17), подается импульс, увеличенный на ΔA (блок 18), и цикл измерения повторяется. Значение МП, при котором нейрон генерирует спайк, определяется как критический уровень деполаризации (CDL, блок 13), а его разность с потенциалом покоя (REST) является порогом возбудимости (THLD). С целью защиты нейрона от излишних тестирующих воздействий начальная амплитуда тестирующего импульса (A) для последующих измерений выбирается близкой тому значению, которое было получено в текущем измерении ($Y2 - 4\Delta A$, блок 13). Если амплитуда тестирующего импульса превысила заданный порог (K , блок 19), а спайк не был обнаружен, то на экран «Videoton-340» выдается диагностическое сообщение NO SPIKE (блок 20). Блоки 3—6 подпрограммы организуют временную задержку на случай, если при входе в программу в канале регистрации обнаружен спайк.



Поступила в редакцию 23 апреля 1979 г.

УДК 612.822 : 61.007 : 61

Б. Н. ДЕРИЙ, Е. Г. ЛИТВИНОВ, В. П. ТРЕТЬЯКОВ,
М. Б. ШТАРК
(Москва — Новосибирск)

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТЫХ НЕЙРОННЫХ СТРУКТУР НА ЛИНИИ С ЭВМ. Ч. 2. КЛЕТочный АНАЛОГ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА

Система автоматизации, аппаратно-программные средства которой описаны в [1], использовалась при реализации электрофизиологического аналога условного рефлекса (УР) у моллюсков (*H. Pomatia*) [2]. Выбор такого объекта обусловлен особенностями строения центральной нерв-

ной системы (ЦНС) моллюсков, позволяющей исследовать внутринейронные механизмы обучения [3, 4], по-видимому, качественно одинаковые у всех животных. Исследованный нами аналог представляет собой изолированную ЦНС, в которой с целью упрощения адекватные для интактного животного стимулы заменены на электрическое раздражение нервов, а измерение эффекторной реакции — на внутриклеточную регистрацию электрической активности нейронов. Для правильной физиологической интерпретации такой активности замена должна обеспечивать изоморфность аналога рефлексу интактного животного. В данной модели это достигалось выбором соответствующих нервов и командных нейронов [2, 5, 6]. Использование аналога исключает неконтролируемое влияние периферической нервной системы. Кроме того, изоляция ЦНС существенно упрощает длительное поддержание ее жизнедеятельности и внутриклеточную регистрацию электрической активности.

На рис. 1 показана структура автоматизированной системы для микроэлектродных исследований, которая включает в себя биологический объект, расположенный в экспериментальной установке; устройства связи объекта с ЭВМ, выполненные в стандарте КАМАК; ЭВМ «Саратов-2» с оперативной памятью 32К; графический дисплей «Дельта» и двухкоординатный самописец «Endim 620.02».

Экспериментальная установка позволяет проводить одновременную внутриклеточную регистрацию мембранного потенциала (МП) и внутриклеточную поляризацию нейронов, электрическую стимуляцию десяти нервов, непрерывную перфузию изолированной ЦНС, смену и контроль температуры перфузионных растворов. Препарат изолированной ЦНС расположен в перфузируемой ванночке, закрепленной на магнитном столе в экранированной камере, где также находятся микроэлектродные манипуляторы, 4 предварительных усилителя и изолирующие блоки для стимуляции нервов. Для удобства работы перфузионный насос и сосуды со сменными растворами расположены вне экранированной камеры. Предотвращение проникания электрических наводок в камеру по трубкам с раствором достигается разрывом электрической цепи с помощью двух капельниц.

Регистрация МП и поляризация нейронов осуществляются через стеклянные микроэлектроды, заполненные 2 М цитратом калия. В непосредственной близости от микроэлектродов расположены предварительные усилители с входным сопротивлением около 2 ГОм и коэффициентом усиления 32. Усиленный сигнал передается по линии связи длиной около 7 м к устройствам регистрации, расположенным в кейте КАМАК. Внутриклеточная поляризация проводится через второй микроэлектрод. Последовательно с ним включено сопротивление $R = 1$ ГОм, предназначенное для стабилизации поляризующего тока. Стимуляция нервов осуществляется через 10 биполярных хлорсеребряных электродов, встроенных в ванночку. Конструкция одного из них показана на рис. 2. На рис. 3 представлена схема распределения токов при стимуляции нерва через такой электрод. Часть тока (I_0) протекает через среду, окружающую аксон; другая часть (I_i) — через мембрану аксона, аксоплазму и опять через мембрану аксона наружу. Падение напряжения на мембране, вызванное этим током, сдвигает МП в месте входа тока в аксон в сторону гиперполяризации, а в месте выхода — в сторону деполяризации (ДП). Ток I_s и уровень ДП зависят от многих факторов (проводимости среды, мембраны, аксоплазмы, положения нерва относительно электродов и др.). Однако наиболее нестабильными из них являются контактная разность потенциалов и сопротивление на границе электрод — раствор, которые значительно изменяют ток через электроды (I_s) и, следовательно, уровень ДП мембраны аксона. Для уменьшения их влияния иногда применяют хлорсеребряные электроды и биполярные стимулирующие импульсы, что, однако, не позволяет до-

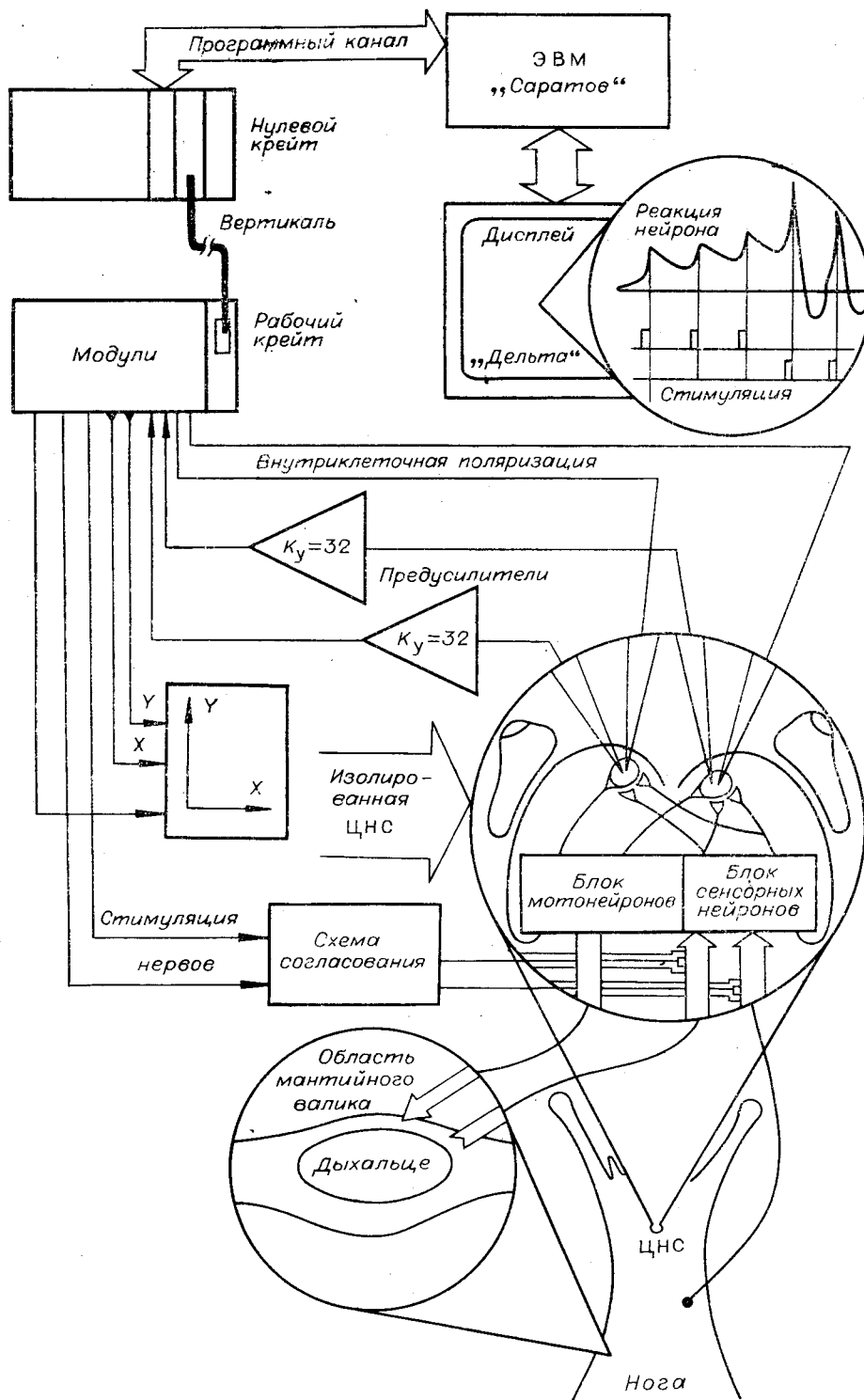


Рис. 1. Общая схема эксперимента.

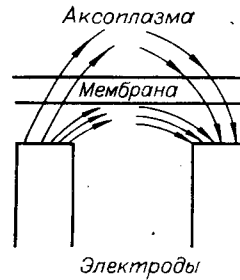
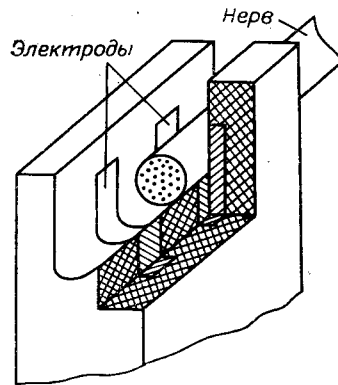


Рис. 3. Схема распределения токов при стимуляции нервов.

← Рис. 2. Конфигурация электродов для раздражения нервов.

биться стабильности силы раздражения. В описываемой установке, кроме того, использована электронная схема преобразователя «напряжение — ток», стабилизирующая ток в пределах 10—500 мкА при нагрузке 20 кОм (рис. 4). Для уменьшения паразитных разветвлений тока и артефактов стимуляции в преобразователе использован незаземленный батарейный источник питания. Управление током стимуляции проводится через оптоизолирующую схему от программируемого стимулятора.

Ранее нами была получена выработка условной нейрональной реакции в виде появления синаптических ПД в результате увеличения ВПСП на условный стимул (УС) после ряда сочетаний его с безусловным (БС) [2]. Дальнейшие исследования показали, что это — не единственная форма ассоциативной пластической перестройки в ЦНС моллюсков.

В данной статье описывается эксперимент, в котором наблюдалась другая форма ассоциативной перестройки, в основе которой лежит принципиально иной механизм. На рис. 5 приведен фрагмент протокола этого эксперимента. Каждая строка протокола печатается на ЭПМ после завершения цикла стимуляции и формирования массива, описывающего ответную электрическую реакцию нейрона.

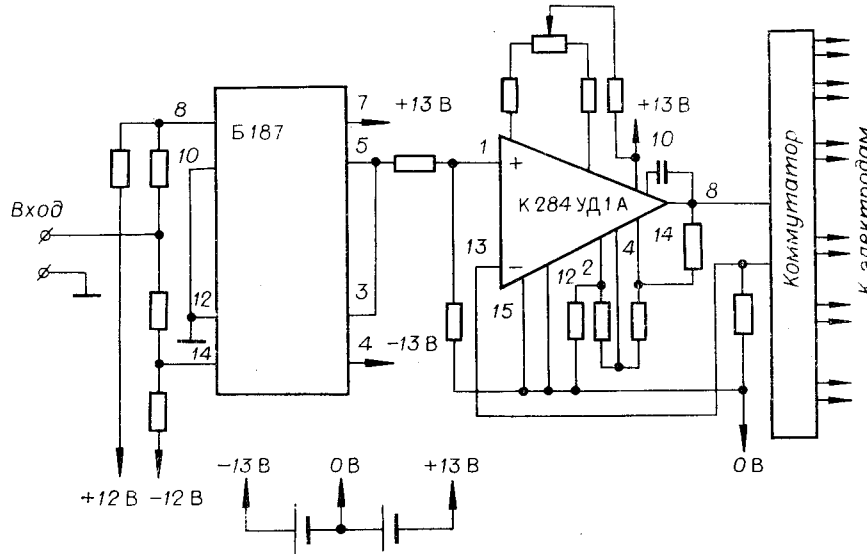


Рис. 4. Согласующая схема для стимуляции нервов.

23 ЯНВАРЯ 1979Г.

НЕЙРОН: ДЦА3, ТЕМПЕРАТУРА 15°C, НЕРВЫ: 1 - ЛЕВЫЙ МАНТИЙНЫЙ, 2, 3, 4, 6 - ПЕДАЛЬНЫЕ,
5 - ПРАВЫЙ МАНТИЙНЫЙ, 8 - ЛЕВЫЙ МАНТИЙНЫЙ, 9 - ВНУТРЕННИЙ ПРАВЫЙ МАНТИЙНЫЙ, 10 - НАРУЖНЫЙ ПРАВЫЙ МАНТИЙНЫЙ.

N	T	AS1	AS2	N1	N2	TA1	TA2	TST	TK	REST	MAXC	MAXU	НЕРВЫ
64	04.21	+240	+260	6	1	64	1802	316	1024	- 63 0307	- 60 4637	+ 27	NC=3 NU=9
65	04.25	+230	+260	6	1	64	1802	316	1024	- 61 1645	- 57 5254	+ 30	NC=3 NU=9
66	04.30	+240	+260	6	1	64	1802	316	1024	- 61 0275	- 58 4545	+ 28	NC=3 NU=9
67	04.43	+240	+260	6	1	64	1802	316	1024	- 60 0334	- 57 5515	+ 33	NC=3 NU=9

Рис. 5. Фрагмент протокола.

Приведем условные обозначения, принятые в протоколе: N — порядковый номер цикла стимуляции; T — текущее время эксперимента (в ч и мин); AS1, AS2 — амплитуда импульсов по 1-му и 2-му каналам стимуляции соответственно; N1, N2 — количество импульсов по 1-му и 2-му каналам стимуляции соответственно; TA1, TA2 — задержка стимулов по 1-му и 2-му каналам от начала цикла стимуляции (в мс); TST — период между импульсами в стимуле (в мс); TK — период квантования при измерении реакции на стимуляцию (в мкс); REST — исходный мембранный потенциал нейрона, т. е. измеренный перед нанесением раздражения на нервы (в мВ); MAXC — мембранный потенциал, измеренный в момент максимального отклонения от исходного (REST) во время действия УС. Параметр состоит из двух чисел: второе число — это амплитуда МП (в мВ), первое число — задержка этого максимума от начала измерения реакции (выражается количеством квантов измерения); MAXU — то же, что и MAXC, но для периода, когда включен БС; NC — номер нерва, подлежащего условной стимуляции; NU — номер нерва, подлежащего безусловной стимуляции.

Как видно из фрагмента, условным стимулом служило раздражение левого медиального педального нерва шестью биполярными электрическими импульсами с периодом следования 316 мс. Время от начала УС до начала БС составляло 1,8 с. В качестве БС применялось раздражение правого внутреннего мантийного нерва одним электрическим импульсом. Амплитуда стимулов выбрана в начале эксперимента такой, чтобы УС вызывал в исследуемом нейроне подпороговый ВПСП с максимальной амплитудой 5—7 мВ, а БС — 2-3 потенциала действия (ПД) (рис. 6). После подбора параметры стимулов не менялись.

Так как межимпульсный интервал между циклами стимуляции должен быть не менее 2 мин (для предотвращения развития привыкания в препарате), то после вывода строки протокола экспериментатор располагает временем, достаточным для отображения с помощью графопостроителя реакции клетки на стимулирующее воздействие. Примеры, иллюстрирующие выработку и угашение условной реакции, приведены на рис. 4. Стрелками на графиках отмечены значения, которые отражаются в протоколе эксперимента (значение МП перед сочетанием, максимальные значения МП за время действия УС и БС).

Динамика изменений реакции нейрона в ходе эксперимента отображается графически. На рис. 7 показан один из вариантов такого ото-

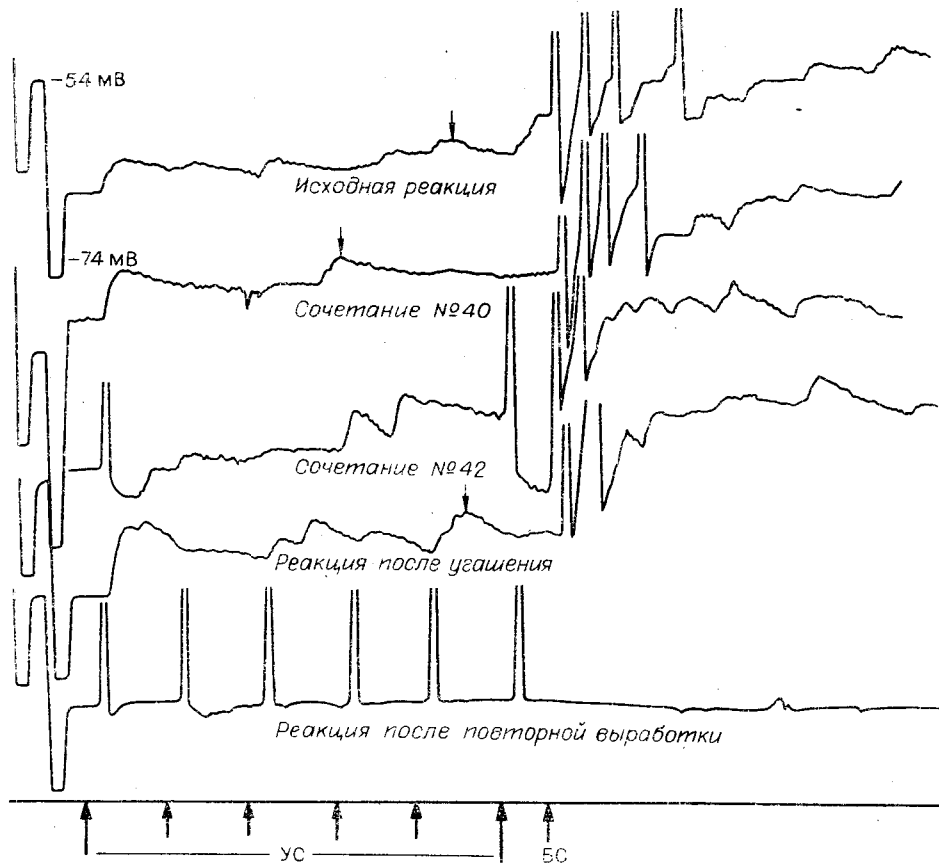


Рис. 6. Реакции командного нейрона Лпа3, иллюстрирующие выработку и угашение условной реакции.

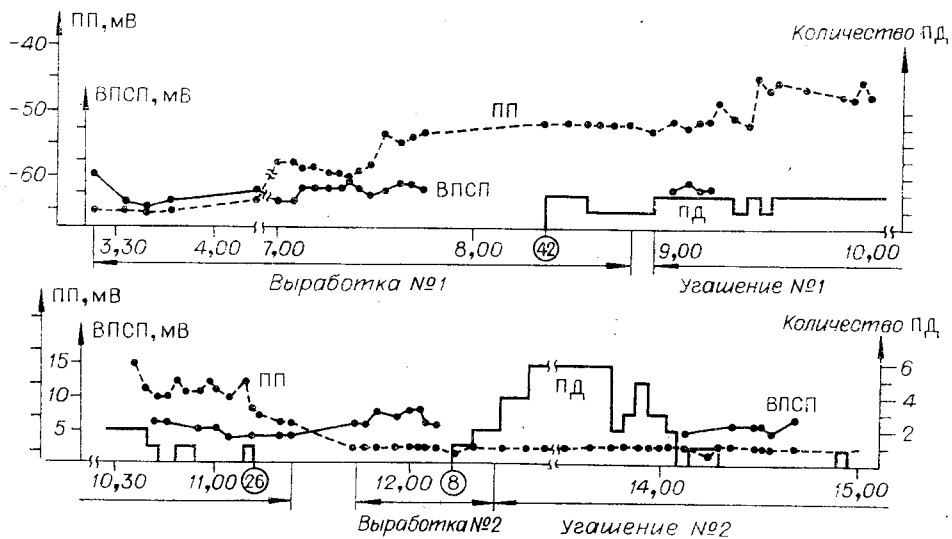


Рис. 7. Динамика отдельных параметров (МАХС, REST, количество ПД в ответ на УС) при выработке и угашении условной реакции (по оси абсцисс — текущее время эксперимента):

сплошная линия — максимальная амплитуда ВПСР; пунктирная — потенциал покоя; прямоугольники — количество ПД в ответ на УС; цифры в кружках — номер сочетания для выработки и номер изолированного предъявления УС для угашения.

бражения, на котором иллюстрируется динамика трех параметров: потенциала покоя, измеренного перед циклом стимуляции; максимальной амплитуды ВПСП и количества потенциалов действия за время применения УС. На рисунке обозначены процедуры выработки и угашения УР. Угашением называются изолированные, не подкрепляемые безусловным стимулом предъявления УС. Как видно из рисунка, ПД в ответ на УС исчезли после 26 изолированных предъявлений, однако повторная выработка УР потребовала только 8 сочетаний вместо 42 при первоначальной процедуре обучения. Такой феномен является одним из критериев истинно условных реакций [7].

Заслуживает внимания и тот факт, что ПД в условной реакции появляются при выработке и исчезают при угашении независимо от соответствующего увеличения или уменьшения амплитуды ВПСП. На синаптическую природу генерации условных ПД указывают также отсутствие у них препотенциалов и короткий высокостабильный латентный период.

Технические и программные средства описанной структуры КАМАК-системы автоматизации исследований нейронных структур отвечают самым жестким современным требованиям нейрофизиологического эксперимента с использованием внутриклеточных микроэлектродов. Развитие ее в сторону увеличения числа анализируемых «on line» источников электрических характеристик, усложнение внутренней логической структуры эксперимента, гибкой реконструкции режимов изменением входных воздействий на нейроны, а также формирования обратной связи по любой из текущих характеристик целиком и полностью обеспечиваются переменной структурой системы. Эти обстоятельства позволяют рассматривать описанную в сообщениях конфигурацию в качестве типового проблемно-ориентированного варианта КАМАК, позволяющего экспериментатору получить в ходе опыта количественные сведения о динамике нейронной активности в режиме «on line», использовать корректирующие процедуры, резко сократить время на обработку результатов и перейти к постановке управляемого эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерий Б. Н. Исследование простых нейронных структур на линии с ЭВМ. Ч. I. Аппаратно-программное обеспечение.— «Автометрия», 1979, № 6.
2. Третьяков В. П., Дерий Б. Н. Моделирование «условной» реакции командных нейронов на изолированной ЦНС виноградной улитки.— ДАН СССР, 1979, т. 246, № 3.
3. Kendel E. R. Cellular Basis of Behaviour. San Francisco, 1976.
4. Willows A. O. D. Gastropod nervous system as a model experimental system in neurobiological research.— "Federation Proc.", 1976, vol. 32, p. 2215—2223.
5. Литвинов Е. Г., Максимова О. А., Балабан П. М., Максимовский Б. П. Условная оборонительная реакция виноградной улитки.— «Журн. высш. нервн. деят.», 1976, т. 26, № 1, с. 203—206.
6. Балабан П. М., Литвинов Е. Г. Командные нейроны в дуге безусловного рефлекса виноградной улитки.— «Журн. высш. нервн. деят.», 1977, т. 27, № 3, с. 538—544.
7. Рабинович М. Я. Нейрофизиологические механизмы условного рефлекса.— В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных. Т. 16. М., «Наука», 1975, с. 5—58.

Поступила в редакцию 23 апреля 1979 г.