

М-ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ МОЗГА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ ХОЛОДНОКРОВНЫХ И ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2025 г. С.Н. Калабушев*, **, #, Д.Н. Воронков***, ##, Ю.С. Медникова****, ###

*Институт функциональной геномики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Мичуринский проспект, 1, Москва, 119991, Россия

#E-mail: sergey.kalabushev@gmail.com

**НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии
и реабилитологии, ул. Петровка, 25/2, Москва, 107031, Россия

***Научный центр неврологии, Волоколамское шоссе, 80, Москва, 125367, Россия

##E-mail: voronkov@neurology.ru

****Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ул. Бутле
рова, 5А/1, Москва, 117485, Россия

###E-mail: mednikova.yu.s@ihna.ru

Поступила в редакцию 23.10.2024 г.

После доработки 16.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

При искусственном инкубировании срезов сенсомоторной коры морских свинок и конечного мозга черепах микроионофоретическое подведение ацетилхолина к нейронам выявило достоверно меньшую частоту ответной импульсации у нервных клеток черепах по сравнению с клетками морских свинок. Это различие связано с разной скоростью М-холинергической реакции в температурных диапазонах 27–29°C и 34–36°C, что было обнаружено ранее в гипотермических экспериментах. Несмотря на то что эксперименты на нейронах морских свинок и черепах были проведены в одном и том же температурном диапазоне (32–34°C), генетически обусловленное строение нейрональных мембран отражает естественную температурную зависимость обоих видов: у мембран морских свинок с постоянной температурой обитания 38°C плотность K^+ -каналов выше, чем у черепах с предпочитаемой температурой 28–32°C. Различие в представленности K^+ -каналов было определено по достоверно более длительному активационному последствию у нейронов черепах в ответах на вызываемую глутаматом импульсную активацию. Низкая плотность K^+ -каналов на мембранах и низкая скорость М-холинергической реакции, которая их закрывает при наступлении любого приспособительного акта, не позволяют нейронам формировать высокочастотные и продолжительные импульсные последовательности для регулирования поведения в широком диапазоне у черепах с предпочитаемой температурой 28–32°C.

Ключевые слова: черепахи, морские свинки, ацетилхолин, глутамат, импульсная активность нейронов, температура, скорость реакции.

DOI: 10.31857/S0006302925020102, EDN: KZAPXX

В середине прошлого века после внедрения метода микроионофоретической аппликации медиаторов к отдельным нейронам стало возможным определить ионные и структурные механизмы возбуждения в нервной системе. На рис. 1 представлены два типа импульсного реагирования у нейронов сенсомоторной коры морской свинки в ответ на 2 разных активационных медиатора — глутамат и ацетилхолин. Формирование

спайкового процесса происходит в обоих случаях, но имеет разное происхождение, разное временное течение и разные ионные механизмы. В ответ на глутамат при его непосредственном воздействии на глутаматный рецептор [1] возникает импульсная активность, имеющая короткое начало и быстрое завершение после прекращения действия медиатора (рис. 1а). Это воздействие формирует токи по модели Ходжкина–Хаксли [2], идущие по градиенту концентраций: ионы Na^+ устремляются из внешней среды по открывающимся

Сокращение: ВПСР — возбуждающий постсинаптический потенциал.

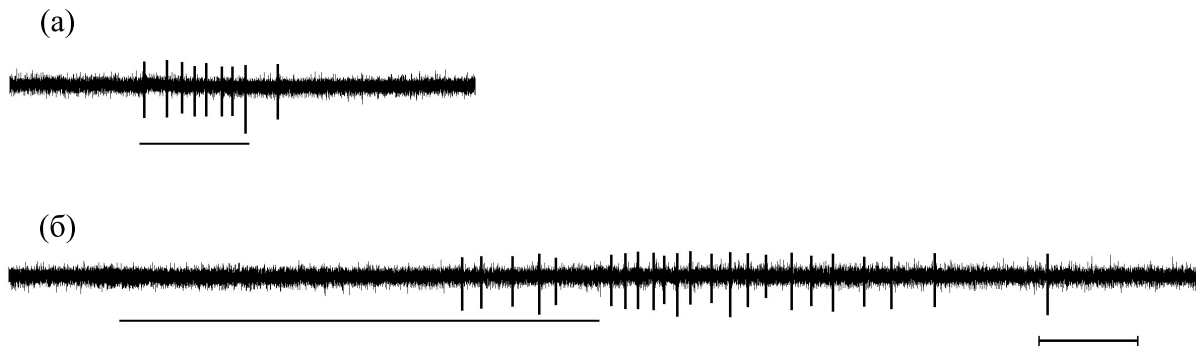


Рис. 1. Два типа импульсного возбуждения нейрона коры мозга. Эксперименты проведены на срезах сенсомоторной коры морской свинки. Микроионофоретическое подведение медиаторов осуществляли на нейроне V слоя. Регистрацию импульсной активности и подведение глутамата и ацетилхолина проводили с помощью 3-канальных стеклянных микроэлектродов. Глутамат апплицировали к нейрону из 1 М раствора глутамата натрия; ацетилхолин — из 2 М раствора ацетилхолин хлорида. Оба медиатора подводили к одному и тому же нейрону. Время действия медиаторов отмечено чертой под записью активности нейрона. (а) — Активационная реакция на действие глутамата (ток электрофореза 70 нА, отрицательный полюс внутри электрода). (б) — Активационная реакция на действие ацетилхолина (ток электрофореза 80 нА, положительный полюс внутри электрода).

Na^+ -каналам, а возникающая деполяризация активирует K^+ -каналы, по которым происходит выброс калия из нервной клетки. Такой же тип активации характерен для стимуляции нейронов электрическим током [3, 4] и для действия других дикарбоновых аминокислот. То же самое происходит при взаимодействии ацетилхолина с Н-холинорецепторами нейронов ганглиев вегетативной нервной системы [5], а также при активации фотонами чувствительных к свету рецепторов, внедренных в мембраны нейронов по оптогенетической технологии [6]. Поскольку деполяризация происходит при последовательном раскрытии ионных Na^+ - и K^+ -каналов, возникающая импульсация сопровождается падением мембранного сопротивления.

Отличительной чертой активации, изображенной на рис. 1а, является ее высокая устойчивость. Пока мембранный потенциал остается неизменным, импульсное возбуждение во всех перечисленных случаях реализуется при широком наборе температурных значений и не требует энергетических затрат [7–9].

Иначе выглядит возбуждение при тестировании нейронов другим возбуждающим медиатором — ацетилхолином (рис. 1б). Вызываемый ацетилхолином импульсный ответ при его воздействии на М-холинергический рецептор характеризуется длительным началом и протяженным течением, превышающим время действия медиатора на секунды и десятки секунд.

Исходя из общих соображений [3, 5] и используя внутриклеточную регистрацию нейронов [10, 11], удалось уверенно отличить ионный механизм М-холинергического возбуждения от глутаматергического — действие ацетилхолина сопровожда-

ется снижением стационарного и потенциал-зависимого K^+ -токов и ростом мембранного сопротивления. Этот механизм навел исследователей на мысль об усиливающем влиянии ацетилхолина на амплитуду сопряженных с ним деполяризующих воздействий [1, 5, 11, 12]. Несмотря на разные данные о величине роста мембранного сопротивления (от нескольких % до 26% [11]), было установлено, что аппликация ацетилхолина может увеличить нейрональный ответ на локальное подведение глутамата к дендритным локусам в несколько раз (рис. 2а) [13]. Значительное увеличение ответа связано с тем обстоятельством, что ацетилхолин создает на мембране условия, позволяющие каждому возбуждающему постсинаптическому потенциалу (ВПСП) возрасти многократно по пути его следования к коме от любой точки на дендритах при относительно небольшом увеличении мембранного сопротивления (рис. 2б). За счет формирования реакции на ацетилхолин по мускариновому типу синаптический дендритный поток при достижении клеточных тел трансформируется в длительную спайковую последовательность (рис. 1б). Чтобы на мембране не возникли участки шунтирования с низким сопротивлением, ацетилхолин блокирует K^+ -каналы не только в месте его контакта с М-холинорецепторами, но и уменьшает трансмембранный K^+ -ток практически по всей мембранной поверхности [5]. В этом можно убедиться по идентичности роста потока импульсации при подведении ацетилхолина как к коме, так и к дендриту одного и того же нейрона [14]. Распространение эффекта ацетилхолина осуществляется с помощью внутриклеточной метаболической реакции с привлечением вторичных посредников [15, 16]. Начало этого процесса после взаимодей-

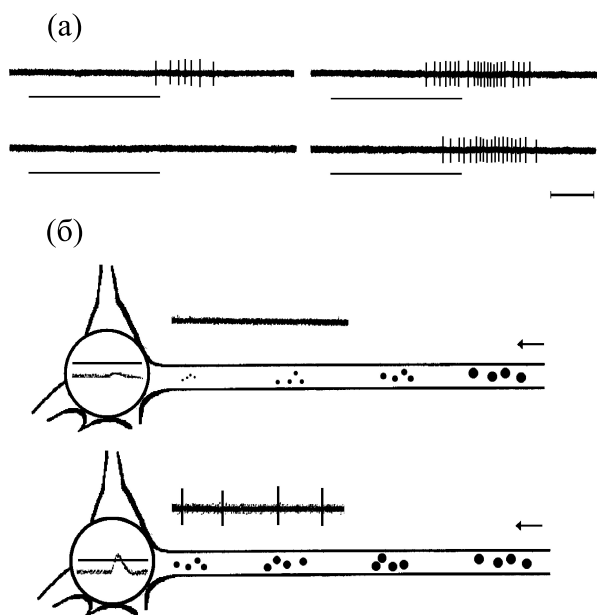


Рис. 2. Формирование импульсной реакции на ацетилхолин у нейрона сенсомоторной коры. (а) — Влияние ацетилхолина, подводимого к соме, на импульсный ответ, вызванный аппликацией глутамата к апикальному дендриту. Импульсную активность регистрировали в срезе сенсомоторной коры морской свинки от сомы нервной клетки слоя V. Аппликацию глутамата осуществляли из трехканального микроэлектрода, подводимого к дендриту (130 мкм от сомы). Аппликацию ацетилхолина проводили из канала, спаянного с регистрирующим электродом, к телу нейрона. Глутамат, длительность аппликации которого отмечена чертой под записью, подводили к дендриту до действия ацетилхолина и в 30-секундном интервале после его соматической (в течение 4.5 с) аппликации. Влияние ацетилхолина на активацию, вызванную стимуляцией дендрита, тестировали дважды с интервалом 10 мин; каждый раз стимуляция приводила к многократному усилению ответа на глутамат [13]. (б) — Схема появления спонтанной активности при проведении по дендритам стандартных ВПСП, амплитуда которых изображена черными кружками, после аппликации ацетилхолина, который увеличивает мембранное сопротивление (R_m) за счет блокирования мембранных K^+ -каналов, как было установлено в работе [11].

ствия ацетилхолина с М-холинорецепторами на мембране происходит посредством регуляторных G-белков, а завершается повсеместной блокадой K^+ -каналов разных типов [15, 16]. Сложность метаболической реакции, вызванной ацетилхолином, объясняет ее медленное развитие с минимальным латентным периодом порядка 250 мс [11], зависимость от температуры [15, 17] и связь с энергетическим метаболизмом [8, 18].

Следовательно, импульсное возбуждение, представленное на рис. 1, возникает либо при взаимодействии медиатора с рецептором для производства деполяризации, либо при контакте с ре-

цептором медиатор меняет мембранные свойства нейронов, позволяя ВПСП, формирующим хаотическую составляющую активации, более эффективно продвигаться к пункту генерации и создавать протяженную спайковую последовательность. Возможно, что именно продление возбуждательного процесса, вызываемое М-холинэргической реакцией, является основой приспособительного реагирования [19].

Любой вид адаптивной деятельности мозга обязательно сопровождается длительным процессом активации, которая запускается центрально детерминированным выбросом ацетилхолина и формированием адекватного уровня спонтанной активности: в процессе восприятия внешних сигналов [14, 20], при подготовительном поведении [14], при двигательных реакциях, в том числе запускаемых условным стимулом [21, 22], при условнорефлекторном росте подкрепляемого уровня спонтанной активности [23] и для поддержания сознания [19, 24, 25]. Связь М-холинэргической реакции с энергетическим обеспечением и температурой предполагает зависимость приспособительного реагирования и от этих факторов.

На срезах сенсомоторной коры морских свинок в термобиологических экспериментах было обнаружено, что характерная для ацетилхолина длительная импульсная реакция при понижении температуры среды от 34°C остается практически неизменной до температурной отметки 28°C, а далее резко снижается в диапазоне 27–29°C. Нагрев выше 34°C приводит к резкому подъему импульсации нейронов в ответ на аппликацию ацетилхолина, что с индивидуальными вариациями может наблюдаться при дальнейшем повышении температуры в диапазоне 34–36°C [17]. Уровень спонтанной активности нейронов в тех же температурных пределах повторяет изменения, характерные для реакции на ацетилхолин [9, 17, 26]. При наличии климатических условий, удовлетворяющих требованиям для осуществления этих двух температурных переходов [27–29], и при существенной роли М-холинэргической реакции в организации адаптивного поведения появились предпосылки для возникновения рептилий с предпочитаемой температурой 28–32°C [30] и млекопитающих с фиксированной температурой выше 34°C в отдаленные периоды геологической истории. Эволюционный рост скорости холинэргического процесса неизбежно сопряжен с изменением структурных и мембранных свойств нейронов, в пределах которых разворачивается возросшая реакция. В представленной работе изучались особенности импульсной активности нейронов морских свинок и черепах, которые могут свидетельствовать о разных температурных условиях их появления и обитания.

МЕТОДЫ

Подготовительные процедуры. Экспериментальные животные: красноухих черепах (*Pseudemys scripta*) и морских свинок (*Cavia porcellus*) содержали в виварии МГУ имени М.В. Ломоносова. Морских свинок содержали в стандартных клетках при ежедневном кормлении и постоянном присутствии поилок. Для черепах были оборудованы акватеррариумы, позволявшие животным свободно плавать или находиться под дополнительным обогревом с помощью ламп накаливания, которые на специальной платформе создавали температурные условия для обогрева до предпочитаемых температур или выше. Раз в несколько дней дополнительно включались лампы ультрафиолетового свечения. Питание осуществлялось ежедневно.

Сравнительные эксперименты по изучению импульсной активности нейронов теплокровных и холоднокровных позвоночных были проведены на срезах слоя V сенсомоторной коры морских свинок и в области дорзолатеральной ямки больших полушарий красноухих черепах. Дорзолатеральная ямка приобретает значение общего корреляционного центра у рептилий в связи с началом формирования корковых структур [31]. Обе изучаемые зоны можно считать гомологичными, поскольку их электрическая стимуляция у обоих классов животных вызывала двигательные реакции конечностей [32]. В экспериментах были использованы 14 черепах разного пола и массы и 10 морских свинок разного пола массой 200–250 г. Исследования в разных экспериментальных сериях проведены в весенне-летний период.

После быстрой (с помощью гильотины) декапитации животных и вскрытия черепа у морских свинок выделяли поперечный блок сенсомоторной коры и у черепах — поперечный блок в области дорзолатеральной ямки. Корковые срезы морских свинок толщиной 500 мкм изготавливали на вибротоме VSL (World Precision Instruments, США). В отличие от шестислойного строения коры морских свинок, конечный мозг черепах имеет всего 2 слоя, поэтому поперечный блок вырезанной нервной ткани их мозга уже представляет собой срез, но в вертикальной ориентации. Его можно разделить сагиттальными надрезами на две-три части и перенести в резервную или рабочую ячейки экспериментальной установки с независимым протоком раствора Рингера–Кребса. Приготовленные таким образом двухслойные срезы мозга черепах полностью погружаются в инкубационный раствор, наполняющий экспериментальные ячейки, на ту же глубину, что и срезы коры морских свинок толщиной 500 мкм.

Инкубационный раствор, насыщенный карбогеном (95%O₂ + 5%CO₂), для срезов морских свинок состоял из следующих компонентов

(в mM): 124 — NaCl, 5.0 — KCl, 1.24 — KH₂PO₄, 1.3 — MgSO₄, 2.4 — CaCl₂, 26 — NaHCO₃ и 10 — глюкоза (рН среды 7.4). Для срезов черепах инкубационный раствор по составу несколько отличался, формируя так называемый рептилийный раствор, который в mM имел составляющие в следующих концентрациях: 96.5 — NaCl, 2.6 — KCl, 2.5 — CaCl₂, 2.0 — MgCl₂, 2.0 — NaH₂PO₄, 26.5 — NaHCO₃ и 10 — глюкоза [33]. Раствор также насыщали карбогеном, он имел то же значение рН среды — 7.4. Скорость потока составляла 1.5–3.0 мл/мин.

Температурные условия инкубирования. Во время экспериментов все срезы инкубировали при температуре 32–34°C. Для срезов черепах эта температура была практически равной предпочитаемым значениям. Нормальная температура для морских свинок составляет 38°C. Однако выше значений 34°C при искусственном инкубировании для срезов теплокровных возникает гипоксическое состояние из-за недостаточного обеспечения нейронов энергетическим субстратом вследствие роста скорости энергоемкой М-холинергической реакции (см. введение). Поэтому нормальные температурные условия для срезов морских свинок создавались в редких случаях.

Нагрев до температуры 32–34°C осуществляли с помощью термостата U1 (VEB, Германия). Тонкую температурную коррекцию проводили либо с помощью регулирования скорости потока, либо термостатирующим устройством на основе элемента Пельтье (НПО «Биоприбор», Россия). Температуру среды постоянно измеряли электронным термометром (НТЦ «НИКАС», Россия). Установленную температуру поддерживали в течение всего эксперимента.

Регистрация и тестирование нервных клеток. Импульсную активность нейронов регистрировали у всех экспериментальных животных (14 черепах и 10 морских свинок). Число зарегистрированных нейронов у каждого животного варьировало от 1 до 5–6. Все нейроны черепах, как и нейроны морских свинок, были объединены в одну выборку. Объединение было возможным, поскольку регистрацию активности нейронов проводили для каждой группы животных от одной и той же мозговой структуры. В среднем от каждой черепахи в выборке зарегистрирована активность 2–3 нейронов, от каждой морской свинки — активность 3–4 нейронов.

Экстраклеточную регистрацию и тестирование нервных клеток глутаматом и ацетилхолином осуществляли с помощью трехканальных стеклянных микроэлектродов с общим диаметром кончика 7.4–8.0 мкм. Регистрирующий канал заполняли 3 М раствором NaCl. Второй и третий каналы использовали для электрофореза медиаторов к нейронам, они содержали соответственно

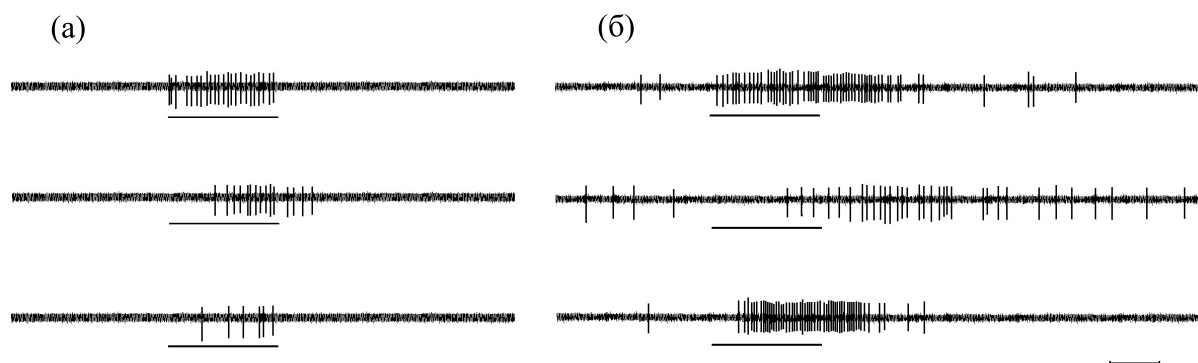


Рис. 3. Импульсные реакции на микроионофоретическое подведение глутамата к нейронам морских свинок и черепах. (а) — Примеры реакций нейронов морских свинок на микроионофоретическое подведение глутамата, представлены реакции трех разных нейронов. (б) — Примеры реакций нейронов черепах на микроионофоретическое подведение глутамата, представлены реакции трех разных нейронов. Отметки раздражения и интенсивность тока электрофореза, как на рис. 1 и 2.

1 М раствор глутамата натрия (pH 7.5, Sigma Chemical Co., США) и 2 М раствор ацетилхолин хлорида (pH 4.0, Sigma Chemical Co., США). Иногда один из каналов для электрофореза заполняли 3 М раствором NaCl для тестирования токового эффекта аппликации медиаторов.

Импульсную активность нейронов в срезах морских свинок отводили в слое V сенсомоторной коры (1.5–1.6 мм от пиальной поверхности) и по всей глубине в срезах дорзолатеральной области черепах. После обнаружения спайковой активности отдельного нейрона одновременно с регистрацией спонтанной импульсации осуществляли подведение к клетке глутамата, что особенно важно в случае неактивного в фоне нейрона с целью идентификации его присутствия. Глутамат подводили к нейрону током 60–80 нА (отрицательный полюс внутри электрода) длительностью 0.5–1.5 с, ацетилхолин апплицировали током 80 нА (положительный полюс внутри электрода) длительностью 4.5 с. Удерживающий ток величиной 3–5 нА противоположного направления устанавливали в обоих форезных каналах в течение всего интервала между ионофоретическими инъекциями медиаторов.

Проведение экспериментов и анализ импульсной активности нейронов. Экспериментальная процедура, осуществляемая на срезах морских свинок и черепах, протекала одинаково: после обнаружения импульсной активности нейрона спонтанную активность регистрировали в течение 5–15 мин, после чего проводили 2–3 аппликации глутамата с интервалами 12 с и однократную аппликацию ацетилхолина. Если позволяли условия регистрации, тестовую процедуру повторяли несколько раз с интервалами не менее 10 мин. Нейрональную импульсную активность после усиления (DAM 80, World Precision Instruments, США) вводили в компьютер Intel (R)Core(TM)

2DuoCPU для хранения, воспроизведения и обработки сигналов. Параметры импульсной активности анализировали с помощью компьютерной программы Power-Graph 3.3 (Россия). Исследовали частоту спонтанной активности и ее регулярность, а также частотные характеристики импульсных ответов на предъявление глутамата и ацетилхолина. Анализировали динамику реакций — латентный период, длительность ответа (для реакций на ацетилхолин), длительность активационного последствия (для реакций на глутамат). Для определения интенсивности реакций на медиаторы вычисляли максимальную текущую среднюю по трем последовательным 200 мс бинам (для глутамата) или трем 1-секундным бинам (для ацетилхолина) в период ответа и сравнивали с аналогичным показателем, вычисленным в фоне. Достоверность различий данных, полученных на нейронах морских свинок и черепах, определяли методами непараметрической статистики [34, 35].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Импульсные реакции на глутамат нейронов морских свинок и черепах. При микроионофоретической аппликации глутамата была зарегистрирована активность 38 нейронов морских свинок и 20 нейронов черепах. Все зарегистрированные нейроны отвечали импульсными реакциями на аппликацию глутамата непосредственно в зону регистрации. На рис. 3 представлены примеры ответов нейронов обоих видов. Средняя интенсивность реакций нейронов морских свинок, вычисленная методом максимальной текущей средней, составила 4.7 имп/200 мс, тот же показатель у нервных клеток черепах имел величину 4.2 имп/200 мс, что свидетельствует об отсутствии различий по параметру интенсивности импульсных ответов на глутамат у нейронов двух

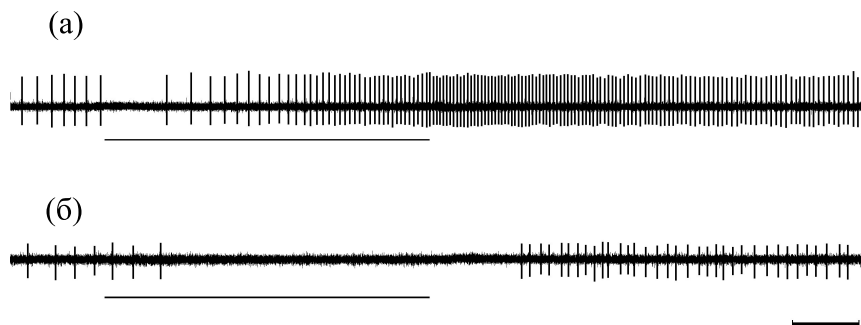


Рис. 4. Импульсные реакции нейронов морской свинки и черепахи на микроионофоретическое подведение ацетилхолина. (а) — Один из примеров импульсного ответа на микроионофоретическое подведение ацетилхолина к нейрону V слоя сенсомоторной коры морской свинки — превышение частоты импульсации над фоном 14 имп/с. (б) — Пример слабой импульсной реакции на микроионофоретическое подведение ацетилхолина к нейрону конечного мозга черепахи — превышение частоты импульсации над фоном 4 имп/с. Отметки раздражения и интенсивность тока электрофореза, как на рис. 1.

видов (U -критерий Уилкоксона—Манна—Уитни). Не были обнаружены также различия по средней величине латентного периода импульсных реакций на глутамат у нейронов морских свинок и черепах (205.9 мс и 216.8 мс соответственно, U -критерий). Только импульсное активационное последствие в ответах на глутамат у нейронов черепах было достоверно длиннее, чем у нейронов морских свинок (885 мс и 521 мс соответственно, U -критерий, $\alpha < 0.05$). Спонтанно неактивные нейроны морских свинок в 6 из 20 случаев не имели активационного последствия в ответ на глутамат, тогда как у черепах ответ на аппликацию глутамата всегда длился дольше действия медиатора (рис. 3б). Суммируя данные по реагированию нейронов на глутамат следует заключить, что глутаматергическое возбуждение у нейронов морских свинок и черепах характеризуется практически одинаковыми импульсными параметрами за исключением более длительного активационного последствия, следующего в нейронах черепах за импульсацией, вызванной глутаматом. Это демонстрирует стабильность ответа на глутамат у нейронов, принадлежащих конечному мозгу двух эволюционно разных групп позвоночных.

Импульсные реакции на ацетилхолин у нейронов морских свинок и черепах. Микроионофоретическое тестирование нейронов подведением ацетилхолина, также как аппликацией глутамата, проводили на тех же нервных клетках у животных обоих видов: на 39 нейронах морских свинок и на 27 нейронах черепах. Аппликацию ацетилхолина проводили после воздействия глутамата в область регистрируемых нейронов. В отличие от глутамата, ацетилхолин вызывал активационную реакцию не у всех нейронов: она отсутствовала у 33.3% нейронов морских свинок и у 62.9% нейронов черепах. Средняя интенсивность ответов на ацетилхолин, определяемых методом максимальной текущей средней, составила 4.1 имп/с для

всех тестируемых нейронов морских свинок, а для нейронов черепах — 1.6 имп/с. Следовательно, реакции на ацетилхолин у нейронов морских свинок превышают по интенсивности тот же показатель у черепах (U -критерий Уилкоксона—Манна—Уитни, $\alpha < 0.01$). Нейроны морских свинок характеризовались более коротколатентными реакциями на ацетилхолин (в среднем 5.5 с), чем нейроны черепах (6.9 с, U -критерий, $\alpha < 0.05$) и более протяженными (11.7 с), но не достоверно (10 с), по длительности от реакций у нейронов черепах (U -критерий). На рис. 4 представлена импульсная реакция на ацетилхолин у нейрона морской свинки (рис. 4а) по сравнению с одной из немногочисленных холиночувствительных реакций у черепах (рис. 4б). В обоих случаях на рисунке продемонстрированы типичные ответы М-холинергического типа [3, 11, 12] с длительными латентными периодами и долгим течением, превышавшим время аппликации медиатора. Следовательно, восприятие ацетилхолина осуществляется посредством одинаковых рецепторов в нейронах обоих видов животных. Однако реакция на ацетилхолин у нейрона черепахи менее выражена по сравнению с тем, что демонстрирует нейрон морской свинки, несмотря на то что подведение медиатора к нейронам черепах проводилось в условиях предпочитаемых для них температурных значений. Параметры ответов, представленных на рис. 4, находятся в полном соответствии с данными статистического анализа, которые свидетельствуют о слабом реагировании на аппликацию ацетилхолина у нейронов черепах по сравнению с нервными клетками морских свинок.

Спонтанная активность: частотные и структурные характеристики у нейронов морских свинок и черепах. В эксперименте зарегистрирована спонтанная активность 38 нейронов в срезах сенсомоторной коры морских свинок и 36 нейронов в срезах

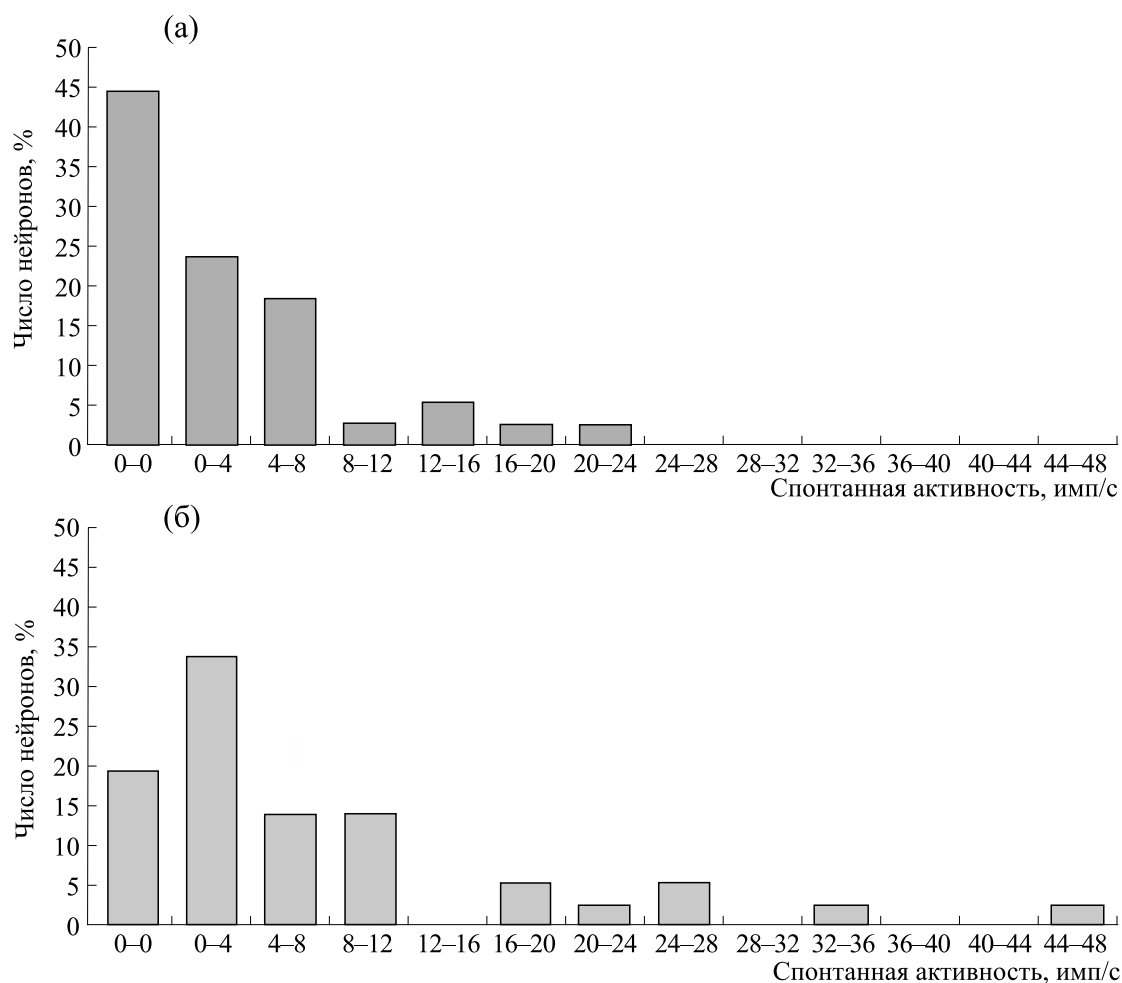


Рис. 5. Распределения нейронов морских свинок и черепах по уровню спонтанной активности. (а) — Распределение частоты спонтанной активности у нейронов морских свинок. (б) — Распределение частоты спонтанной активности у нейронов черепах. По оси абсцисс — уровень спонтанной активности (имп/с), по оси ординат — число нейронов с данной частотой импульсации (в %).

конечного мозга черепах. Нейроны морских свинок имели уровень спонтанной активности от 0 до 24 имп/с, у нервных клеток черепах частота импульсации варьировала в более широком диапазоне — от 0 до 48 имп/с. Таким образом, наибольшее разнообразие по частоте спонтанной активности было обнаружено у нейронов черепах, чем они существенно отличались от нейронов морских свинок. Проверку гипотезы об однородности (совпадении) распределений частоты спонтанной активности морских свинок и черепах проводили с помощью критерия χ -квадрат (при этом данные были объединены в $m = 5$ групп: 0, 0–4, 4–8, 8–24 и 24–48 — с суммарной частотой исходов не менее 5 в каждой группе) [35]. При справедливости гипотезы об однородности статистика этого критерия имеет распределение, близкое к распределению χ -квадрат с $m - 1 = 4$ степенями свободы, средним значением 4 и среднеквадратическим отклонением $(2m)^{1/2} \approx 2.82$. В нашем случае статистика критерия

χ -квадрат оказалась равной 9.57, что соответствует уровню доверия ≈ 0.05 , поэтому различие между выборочными распределениями частоты спонтанной активности является значимым, т. е. нейроны морских свинок по этому показателю отличаются от нейронов черепах.

В срезах коры морских свинок явно преобладали нейроны, не имевшие спонтанной активности. Их относительное число составило 44.7% от зарегистрированных нервных клеток. Число нейронов, имевших спонтанную активность, довольно быстро снижалось: нейроны с импульсацией до 4 имп/с составили 23.7%, клетки с более высоким уровнем импульсации (от 4 до 24 имп/с) в сумме составили 31.6% популяции (рис. 5а).

У черепах максимально выраженным был диапазон спонтанной импульсации до 4 имп/с (3.33 имп/с), тогда как спонтанно неактивные нейроны составили, в отличие от нейронов морских свинок, 19.4%, т.е. встречались в два раза

реже (рис. 5б). Вторым отличием было появление высокочастотных (более 24 имп/с) клеток в мозге черепах, которые ни разу не встречались среди нейронов морских свинок. Следовательно, черепахи имеют мозг, в котором доля нейронов с высоким уровнем спонтанной активности представлена лучше, чем у морских свинок, для мозга которых определяющим признаком является отсутствие спонтанной импульсации у значительного числа нервных клеток.

Проблемы энергетического характера не позволяют регистрировать в срезах морских свинок активность нейронов при типичной для них температуре 38°C. Но быстрое кратковременное повышение температуры инкубационного раствора может продемонстрировать, какое преимущество имеют теплокровные в связи с доминированием в их новой коре спонтанно неактивных нейронов при температуре 32–34°C. Так, кратковременное повышение температуры выше 34°C у 6 из 15 спонтанно неактивных нейронов морских свинок привело к появлению импульсации, причем в ряде случаев значительному – до 12 имп/с, что сопровождалось мощной реакцией на ионофоретическое подведение ацетилхолина. Следовательно, спонтанно неактивные нейроны теплокровных обладают высокой реактивностью к ацетилхолину, что связано как с высокой температурой, так и с высокой плотностью K^+ -каналов на нейрональных мембранах.

Спонтанная активность нейронов характеризуется не только частотой, но и структурной организацией. У черепах на пяти нейронах было зарегистрировано группирование импульсной активности, что среди нервных клеток морских свинок обнаружено только у одного нейрона. Пачкообразование было эпизодическим и сменялось регулярной активностью в пределах одного нейрона. Пачки формировались с частотой от 1 до 4 в секунду – стандартной для каждой нервной клетки. Интервалы между импульсами в пачке составляли 8–10 или 20–40 мс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Черепахи появились на Земле 240–220 млн лет назад [36, 37], когда завершился длительный период постоянно повторяющихся покровных оледенений [38, 39]. Последним из этой череды было карбон-пермское (или раннепермское) оледенение – 290 млн лет назад [39]. Довольно прохладный климат той эпохи, называемый гумидным, отличался большим содержанием влаги и господством представителей папоротниковидных гигантов. В их жизненный цикл входил фрагмент прорастания спор, которое происходило только при их попадании на влажную болотистую почву, где в развившихся заростках формировались

мужские и женские гаметы, а последующее оплодотворение приводило к повсеместному распространению папоротников, хвощей и плаунов по поверхности Земли. Каменноугольный период стал рубежом для смены климатических условий, поскольку в ранней перми после отступления карбон-пермского оледенения климат стал быстро теплеть [27], папоротниковидные из-за недостатка влаги, необходимой для продолжения рода, уступили место голосеменным, температура на суше все чаще превышала диапазон 27–29°C. Только при наземном обитании в этих условиях могли появиться черепахи [37] с предпочитаемой температурой 28–32°C, так как эта температура на длительный период могла установиться только на суше, а ее совпадение с температурой перехода М-холинергического процесса мозга на более высокий уровень [17] гарантировало адаптивный прогресс. Таким образом, появление черепах было связано с приспособительным преимуществом, которое обеспечивалось температурным диапазоном 28–32°C. Именно этот диапазон становится предпочитаемым, а панцирь позволяет поддерживать эту температуру, долго сохраняя тепло в необходимых пределах при неустойчивых температурных условиях ранней перми [40].

Дальнейшее потепление в мезозойскую эру привело к установлению очень жаркого (аридного) климата с температурой на 6–9°C выше современного [28]. Вода в твердой фазе практически исчезла на Земле, пропали ледниковые полярные шапки, уровень мирового океана поднялся на 100 м по сравнению с существующим сегодня, содержание углекислого газа в атмосфере превысило в 4 раза его присутствие в наше время [28]. Температурные условия, таким образом, способствовали преодолению еще одного барьера для М-холинергической реакции – 34–36°C [17], что привело к повсеместному (включая Антарктиду) распространению динозавров (прозавроподов) [29], а затем и теплокровных в позднем триасе – ранней юре [29, 41]. Следовательно, установленная экспериментально в наше время зависимость М-холинергической реакции мозга от температуры [15, 17, 26] сотни миллионов лет назад была использована природой для совершенствования адаптивного поведения у счастливых обитателей той эпохи.

Ацетилхолин, являющийся основным медиатором восходящей активирующей системы мозга [19, 24, 42, 43], выделяется из специальных холинергических ядер [19, 44, 45, 46] или из холинергических интернейронов разных отделов в нервной системе [47, 48] в разнообразных физиологических условиях [49]. Выделение ацетилхолина может носить глобальный характер или концентрироваться на конкретном объекте или конкретном движении [19, 49, 50]. В любом случае в нейронах происходит развитие длительной

неспецифической импульсной последовательности (рис. 1б и рис. 4), направленной на поддержание специфического возбуждения (рис. 1а) для формирования внимания, восприятия, двигательной активности, обучения, памяти, сознания — всех тех состояний, за которые отвечает ацетилхолин [19, 24, 43, 45]. Несмотря на то что направляющий механизм для выброса ацетилхолина активирующей системой мозга точно еще не установлен [43, 46], развитие неспецифической импульсации, сопровождающей появление внешнего раздражителя, является не ответом на раздражитель, а ответом на выброшенный им ацетилхолин. Индикаторами выброса ацетилхолина в коре мозга являются реакция десинхронизации и компонент Р300 электроэнцефалограммы [51, 52], появление которого означает, что в нервной системе произошло восприятие раздражителя [52], а не только доставка возбуждения по специфическим путям. Аналогичные результаты получены по условнорефлекторной методике, свидетельствующей, что ответ на условный сигнал формируется как длительный рост спонтанной активности [21] и приводит к формированию условнорефлекторного двигательного ответа с латентным периодом 300 мс. Развитие наркотического состояния, вызванного тиопенталом натрия, приводит одновременно к падению уровня нейрональной спонтанной активности, исчезновению неспецифического компонента ответа на электрокожное раздражение и реакции на ацетилхолин мус-каринового типа, что вызывает блокаду адаптивного электромиографического ответа на электрокожное раздражение. Вместе с тем ответ на глутамат, медиатор специфического компонента, не страдает от наркоза [8, 18]. Следовательно, приспособительные реакции формируются в мозге по неспецифическому механизму М-холинергической системой. Скорость этого процесса при температуре 28–32°C ниже, чем при 34–36°C [17]. Поэтому у черепах вместе со снижением импульсной реакции на ацетилхолин (рис. 4) разнообразие приспособительных возможностей также снижается, значительно уступая возможностям теплокровных [53].

Специфическое возбуждение в соответствии с пассивным механизмом его происхождения зависит только от интенсивности раздражителя. В неспецифическом возбуждении заложена изменчивость реагирования, зависящая от количества и функционального разнообразия клеточного состава, на который обращено действие ацетилхолина, от центрально детерминированного количества выброшенного медиатора [50, 54], от скорости М-холинергического процесса. В связи с этим температура мозга у теплокровных не только фиксирована на высоких значениях, но она поддерживается на установленном уровне с точностью до 0.1°C [55]. Холоднокровные лишены

такой возможности, следовательно, забота о температуре мозга в предпочитаемом диапазоне (где скорость холинергической реакции постоянна) становится для них первой потребностью [39].

Слабая выраженность М-холинергической реакции у черепах (рис. 4) влечет за собой целый ряд структурных и функциональных различий в их нейронах по сравнению с нейронами морских свинок. Обеспечение ацетилхолином блокирования K^+ -каналов нейрональных мембран [3, 11, 12] предполагает, что с падением скорости М-холинергического процесса плотность K^+ -каналов на мембранах нервных клеток у черепах окажется пропорционально ниже, чем на мембранах морских свинок. Свидетельством низкой плотности K^+ -каналов является более протяженное активационное последствие в реакциях на локальное подведение глутамата (рис. 3). У морских свинок активация, вызванная глутаматом, за счет высокой плотности K^+ -каналов быстро обрывается после завершения деполяризации (рис. 3а) и развития постактивационной гиперполяризации, характерной для реполяризационных процессов у млекопитающих [56, 57]. У черепах постактивационная гиперполяризация выражена, по-видимому, очень слабо, что и приводит к увеличению длительности активационного последствия (885 мс), достоверно превышающего его протяженность у морских свинок (521 мс, U -критерий, $\alpha < 0.05$). О низкой плотности K^+ -каналов у нейронов черепах свидетельствует также группирование спайков в спонтанной активности, замеченное у пяти нервных клеток, тогда как у морских свинок обнаружен только один нейрон с групповой активностью. Экспериментальное уменьшение трансмембранных K^+ -токов у нейронов млекопитающих также приводило к пачкообразованию [57], у нейронов черепах тот же эффект возникает по естественной причине из-за низкой представленности K^+ -каналов на мембранах.

Переходный процесс на новый эволюционный уровень удастся обнаружить при онтогенетическом формировании неокортикальных пирамидных нейронов крыс. С помощью метода patch-clamp было обнаружено резкое увеличение плотности $K^+(BK)$ -каналов на нейрональных мембранах начиная с 7-х суток после рождения и последующее их встраивание в нейроны при дальнейшем развитии [58]. Одновременно со встраиванием K^+ -каналов происходит падение входного сопротивления нейронов и сокращение длительности спайка, также начиная с 7-х суток жизни [59]. Таким образом, рост числа K^+ -каналов у нейронов теплокровных становится индикатором перехода на новый уровень М-холинергического

процесса, характерного для температурного диапазона 34–36°C.

Обнаруженные у черепах низкая скорость М-холинергической реакции и низкая плотность мембранных калиевых каналов их нейронов являются, по-видимому, основными причинами устойчивости мозга холоднокровных животных к гипоксии. Именно у черепах эта особенность была наиболее тщательно изучена [33, 60–62]. В аноксических условиях нейроны черепах могут сохранять жизнеспособность 6–9 ч [60], тогда как у млекопитающих выживаемость нейронов в тех же условиях возможна не более нескольких минут [61]. Анализируя причины, приводящие теплокровных к гибели от гипоксии, П.В. Хочачка сформулировал гипотезу о высокой «текучести» их мембран, т.е. о значительной проницаемости к ионам, наличие которых требует энергетических затрат на восстановление гомеостаза [62]. Высокая ионная проницаемость нейрональных мембран облигатных теплокровных является также причиной их гибели при гипотермии, тогда как черепахи и гибернирующие млекопитающие способны выдерживать температуру 3–5°C в период зимнего оцепенения. [62]. Представление о том, что черепахи снабжены специальным протекторным механизмом, который в случае кислородной недостаточности и низких температур закрывает ионные каналы на мембранах нейронов [61, 62], снижает уровень глутамата и его рецепторов [61, 63] и переводит дыхательную цепь митохондрий на нитратное дыхание вместо кислородного [64], не всегда подтверждается [33]. Самым надежным защитником черепах и других рептилий от гипоксии следует считать естественную для температуры их обитания (28–32°C) низкую скорость М-холинергической реакции (рис. 4). Поскольку холинергический процесс, блокирующий K^+ -каналы, является очень энергоемким [8, 18], при нормоксии утилизация глюкозы в мозге черепах снижается и оборот АТФ падает в 12 раз по сравнению с мозгом крыс [65]. Следовательно, мозгу черепах, во-первых, нужно значительно меньше энергии. Во-вторых, низкая плотность K^+ -каналов на нейрональных мембранах черепах (рис. 3б) препятствует выделению калиевых ионов при наступлении гипоксических состояний [61, 62, 66], что предохраняет от развития гипоксической патологии, как это и было предсказано [62]. В связи с этим в недавно проведенных экспериментах не был обнаружен тесный контакт нейронов черепах с клетками глии, которая постоянно удаляет избыточное содержание ионов K^+ из среды, окружающей нейроны с «текущими» мембранами, особенно среди нейронов гетеротермов, и снабжает их субстратом для цикла Кребса [14]. Поэтому глия в мозге теплокровных животных обеспечивает стабилизацию окружающей среды для

нейронов и удовлетворяет их высокие энергетические потребности при температуре, превышающей отметку 34°C. Мозг холоднокровных животных (28–32°C) в такой опеке почти не нуждается, поэтому он легче переносит гипоксические и гипотермические состояния.

Спонтанная активность является самым изменчивым из электрофизиологических показателей нервных клеток. Она формируется в дендритах за счет разной степени ослабления стандартных ВПСП по мере их продвижения к соме [67] и, следовательно, зависит от электротонических параметров дендритов — их морфологического строения и протяженности, мембранных свойств, степени соматического шунтирования [68]. Геометрическое строение дендритов очень разнообразно, что предполагает разный уровень импульсации у разных нервных клеток.

Представленное на рис. 5а распределение нейронов сенсорной коры морских свинок демонстрирует, что в коре доминируют нейроны, лишенные спонтанной активности, а максимальный уровень импульсации не превышает 24 имп/с. Подобное распределение является отличительной особенностью, обнаруженной в других экспериментах, проведенных на нейронах коры [14, 67, 69]. Это свидетельствует о преобладании в коре морских свинок нейронов, мембраны которых имеют высокую плотность K^+ -каналов, что создает эффект «просачивания» для возбуждающих токов по пути следования из дендритов в сому [70, 71] (рис. 2б). На пирамидах дорзального кохлеарного ядра было обнаружено, что большое содержание мембранных K^+ -каналов характерно именно для спонтанно неактивных нейронов, тогда как устойчивый уровень спонтанной активности зарегистрирован у нервных клеток с низкой плотностью калиевых каналов [70]. Чем выше уровень спонтанной активности, тем меньше приращение импульсации нейронов в ответ на действие ацетилхолина [67]. У спонтанно неактивных нейронов, напротив, не только существует большое разнообразие в импульсных реакциях на ацетилхолин, но самые мощные ответы (40 имп/с) демонстрируют именно молчащие нервные клетки [67]. Именно у спонтанно неактивных нейронов прецентральной корковой области возникают высокочастотные спайковые последовательности (более 100 имп/с) при формировании условнорефлекторных реакций на раздражитель, которые завершаются двигательным условным ответом [21]. Следовательно, высокая температура, присущая мозгу теплокровных, создает условия, при которых импульсная активность нейронов может регулироваться в очень широком диапазоне.

Распределение нейронов черепах по частоте спонтанной активности растягивается от нулевых

значений до 48 имп/с (рис. 5б). Спонтанно неактивных нейронов вдвое меньше, чем у морских свинок, что еще раз демонстрирует низкую представленность K^+ -каналов на мембранах нервных клеток черепах. При температуре, которая составляет диапазон их предпочтений (28–32°C), скорость М-холинергической реакции значительно ниже, чем у морских свинок (рис. 4) [17]. Поэтому спонтанная активность нейронов черепах имеет высокие значения, доступные только для небольшого регулирования [67] слабой М-холинергической реакцией. Следовательно, возможности формирования многообразных приспособительных реакций у черепах существенно ограничены [53].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность А.М. Зубкову за консультации по статистической обработке результатов и А.А. Зубкову за помощь в компьютерном представлении иллюстраций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российской академии наук.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики. Экспериментальных животных содержали в виварии МГУ имени М.В. Ломоносова в условиях, соответствовавших рекомендациям, описанным в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента по охране животных, используемых в научных целях. Соблюдение стандартов проведения исследований на животных определялось ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными — правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 33219-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными — правила содержания и ухода за рыбами, амфибиями, рептилиями». Проводимые исследования были одобрены комиссией по этике Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН на заседании 27 ноября 2024 года (протокол № 9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hasselmo M. E. Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav. Brain Res.*, **67** (1), 1–27 (1995). DOI: 10.1016/0166-4328(94)00113-t
2. Hodgkin A. L. and Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, **117** (4), 500–544 (1952). DOI: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764
3. Krnjević K., Pumain R., and Renaud L. The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J. Physiol.*, **215** (1), 247–268 (1971). DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009467
4. Barkai E. and Hasselmo M. E. Modulation of the input/output function of rat piriform cortex pyramidal cells. *J. Neurophysiol.*, **72** (2), 644–658 (1994). DOI: 10.1152/jn.1994.72.2.644
5. Weight F. F., Schulman J. A., Smith P. A., and Busis N. A. Long-lasting synaptic potentials and the modulation of synaptic transmission. *Federation Proceedings*, **38** (7), 2084–2094 (1979). PMID: 221268
6. Suzuki M. and Larkum M. E. General anesthesia decouples cortical pyramidal neurons. *Cell*, **180**, 666–676 (2020). DOI: 10.1016/j.cell.2020.01.024
7. Krnjević K. and Phillis J. W. Acetylcholine-sensitive sells in the cerebral cortex. *J. Physiol.*, **166** (2), 296–327 (1963). DOI: 10.1113/jphysiol.1963.sp007106
8. Godfraind J. M., Kawamura H., Krnjević K., and Pumain R. Actions of dinitrophenol and some other metabolic inhibitors on cortical neurons. *J. Physiol.*, **215** (1), 199–222 (1971). DOI: 10.1113/jphysiol.1971.sp009465
9. Медникова Ю. С., Пасикова Н. В. и Копытова Ф. В. Влияние температуры на импульсную активность корковых нейронов у морских свинок. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **88** (11), 1492–1500 (2002).
10. Adams P. R., Brown D. A., and Constanti A. Pharmacological inhibition of the M-current. *J. Physiol.*, **332**, 223–262 (1982). DOI: 10.1113/jphysiol.1982.sp014357
11. McCormick D. A. and Prince D. A. Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *J. Physiol.*, **375**, 169–194 (1986). DOI: 10.1113/jphysiol.1986.sp016112
12. Krnjević K. Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. *Physiol. Rev.*, **54**, 418–540 (1974). DOI: 10.1152/physrev.1974.54.2.418
13. Медникова Ю. С., Карнуп С. В. и Жадин М. Н. Холинергическая модуляция импульсных реакций нейронов на дендритное и соматическое подведение возбуждающих аминокислот. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*, **52** (4), 479–488 (2002).
14. Медникова Ю. С., Воронков Д. Н., Худоевков Р. М., Пасикова Н. В. и Захарова Н. М. Активная и пассивная составляющие нейронального возбуждения и его глиальное сопровождение. *Биофизика*, **66** (4), 756–773 (2021).

15. Зеймаль Э. В. и Шелковников С. А. *Мускариновые холинорецепторы* (Наука, Л., 1989).
16. Brown D. A., Abogadie F. C., Allen T. G. J., Buckley N. J., Caulfield M. P., Delmas P., Haley J. E., Lamas J. A., and Selyanko A. A. Muscarinic mechanisms in nerve cells. *Life Sci.*, **60** (13/14), 1137–1144 (1997). DOI: 10.1016/S0024-3205(97)00058-1
17. Медникова Ю. С. и Пасикова Н. В. Температурная чувствительность холинергической реакции нейронов коры мозга морских свинок. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **90** (2), 193–201 (2004).
18. Mednikova Y. S., Kozlov M. K., and Makarenko A. N. Energy aspects of sodium thiopental action on nervous activity. *J. Behav. Brain Sci.*, **9**, 33–53 (2019). DOI: 10.4236/jbbs.2019.92004
19. Bentley P., Driver J., and Dolan R. Cholinergic modulation of cognition: insights from human pharmacological functional neuroimaging. *Progr. Neurobiol.*, **94**, 360–388 (2011). DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.06.002
20. Inglis F. M. and Figiber H. C. Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. *Neuroscience*, **66** (1), 81–86 (1995).
21. Evarts E. V. Pyramidal tract activity associated with a conditioned hand movement in the monkey. *J. Neurophysiol.*, **29**, 1011–1027 (1966). DOI: 10.1152/jn.1966.29.6.1011
22. Чернышев Б. В., Панасюк Я. А., Семикопная И. И. и Тимофеева Н. О. Активность нейронов базального крупноклеточного ядра при реализации инструментального условного рефлекса. *Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова*, **53** (5), 633–645 (2003).
23. Wyler A. R., Burchiel K. J., and Robbins C. A. Operant control of precentral neurons: comparison of fast and slow pyramidal tract neurons. *Exp. Neurol.*, **69** (2), 430–433 (1980). DOI: 10.1016/0014-4886(80)90019-9
24. Szerb J. C. Cortical acetylcholine release and electroencephalographic arousal. *J. Physiol.*, **192** (2), 329–343 (1967). DOI: 10.1113/jphysiol.1967.sp008303
25. Sarter M. and Bruno J. P. Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience*, **95** (4), 933–952 (2000). DOI: 10.1016/S0306-4522(99)00487-X
26. Пасикова Н. В., Медникова Ю. С. и Аверина И. В. Температурное регулирование частоты спонтанной активности и сопутствующее изменение амплитуды спайков корковых нейронов. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **96** (3), 315–324 (2010).
27. Чумаков Н. М. и Жарков М. А. Климат во время пермо-триасовых биосферных перестроек. 1. Климат ранней перми. *Стратиграфия. Геологическая корреляция*, **10** (6), 62–81 (2002).
28. Sellwood B. W. and Valdes P. J. Mesozoic climates: General circulation models and the rock record. *Sediment. Geol.*, **190**, 269–287 (2006). DOI: 10.1016/j.sedgeo.2006.05.013
29. Аверьянов А. О. и Лопатин А. В. Динозавры России: завроподы (*Sauropodomorpha*). *Вестн. РАН*, **93** (5), 439–444 (2023). DOI: 10.31857/S0869587323040023
30. Исабекова С. Б. *Термобиология рептилий* (Гылым, Алма-Ата, 1990).
31. Курепина М. М. *Мозг животных* (Наука, М., 1981).
32. Филимонов И. Н. *Сравнительная анатомия большого мозга рептилий* (Изд-во АН СССР, М., 1963).
33. Doll Ch. J., Hochachka P. W., and Reiner P. B. Channel arrest: implications from membrane resistance in turtle neurons. *Am. J. Physiol.*, **261** (5, Pt2), R1321–R1324 (1991). DOI: 10.1152/ajpregu.1991.260.4.R747
34. Закс Л. *Статистическое оценивание* (Статистика, М., 1976).
35. Крамер Г. *Математические методы статистики* (Мир, М., 1975).
36. Обручева О. П. *Палеонтология позвоночных* (Изд-во МГУ, М., 1987).
37. Reisz R. R. and Head J. J. Palaeontology: turtler origins out to sea. *Nature*, **456**, 450–451 (2008). DOI: 10.1038/456450a
38. Ершов Э. Д. *Общая геоэкология* (Изд-во МГУ, М., 2002).
39. Галимов Э. М. Оледенения в истории Земли, биосфера и низкая светимость Солнца. *Природа*, № 6, 44–52 (2019).
40. Mednikova Y. S. and Kalabushev S. N. Thermally dependent behaviour of cold-blooded animals: overcoming two temperature barriers on the way to warm-blooded. *J. Behav. Brain Sci.*, **13**, 95–112 (2023). DOI: 10.4236/jbbs.2023.135007
41. Araújo R., David R., Benoit J., Lungmus J. K., Stoessel A., Barrett P. M., Maisano J. A., Ekdale E., Orliac M., Luo Z.-Xi., Martinelli A. G., Hoffman E. A., Sidor C. A., Martins R. M. S., Spoor F., and Angielczyk K. D. Inner ear biomechanics reveals the Late Triassic origin of mammalian endothermy. *Nature*, **607**, 726–731 (2022). DOI: 10.1038/s41586-022-04963-z
42. Мэгун Г. *Бодрствующий мозг* (Изд-во ИЛ, М., 1961).
43. Ma Sh., Hangya B., Leonard Ch. S., Wisden W., and Gundlach A. L. Dual-transmitter systems regulating arousal, attention, learning and memory. *Neurosci. Biobeh. Rev.*, **85**, 21–33 (2018). DOI: 10.1016/j.neubiorev.2017.07.009
44. Mesulam M.-M., Mufson E. J., Wainer B. H., and Levey A. I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). *Neuroscience*, **10** (4), 1185–1201 (1983). DOI: 10.1016/0306-4522(83)90108-2
45. Fibiger H. C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci.*, **14** (6), 220–223 (1991). DOI: 10.1016/0166-2236(91)90117-D
46. Villano I., Messina A., Valenzano A., Moscatelli F., Esposito T., Monda V., Esposito M., Precenzano F., Carotenuto M., Viggiano A., Chieffi S., Cibelli G., Monda M.,

- and Messina G. Basal forebrain cholinergic system and orexin neurons: effects on attention. *Front. Behav. Neurosci.*, **11**, Art. 10 (2017). DOI: 10.3389/fnben.2017.00010
47. Houser C. R., Crawford G. D., Salvaterra P. M., and Vaughn J. E. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase in rat cerebral cortex: a study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.*, **234** (1), 17–34 (1985). DOI: 10.1002/cne.902340103
 48. Arakawa I., Muramatsu I., Uwada J., Sada K., Matsukawa N., and Masuoka T. Acetylcholine release from striatal cholinergic interneurons is controlled differently depending on the firing pattern. *J. Neurochem.*, **167**, 38–51 (2023). DOI: 10.1111/jnc.15950
 49. Mineur Y. S. and Picciotto M. R. How can I measure brain acetylcholine levels in vivo? Advantages and caveates of commonly used approaches. *J. Neurochem.*, **167**, 3–15 (2023). DOI: 10.1111/jnc.15943
 50. Decker A. L. and Duncan K. Acetylcholine and the complex interdependence of memory and attention. *Curr. Opin. Behav. Sci.*, **32**, 1–8 (2020). DOI: 10.1016/j.cobeha.2020.01.013
 51. Wang Y. P., Kawai Y., and Nakashima K. Rabbit P300-like potential depends on cortical muscarinic receptor activation. *Neuroscience*, **89** (2), 423–427 (1999). DOI: 10.1016/S0306-4522(98)00299-1
 52. Perry E., Walker M., Grace J., and Perry R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.*, **22** (6), 273–280 (1999). DOI: 10.1016/S0166-2236(98)01361-7
 53. Воронин Л. Г. *Эволюция высшей нервной деятельности (очерки)* (Наука, М., 1977).
 54. Butt A. E., Testylier G., and Dykes R. W. Acetylcholine release in rat frontal and somatosensory cortex is enhanced during tactile discrimination learning. *Psychobiology*, **25** (1), 18 (1997). DOI: 10.3758/BF03327024
 55. Иванов К. П. Изменения физиологических функций, механизмы их восстановления и температурные границы жизни при гипотермии. *Успехи физиол. наук*, **27** (3), 84–105 (1996).
 56. Haj-Dahmane S. and Andrade R. Ionic mechanism of the slow afterdepolarization induced by muscarinic receptor activation in rat prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.*, **80** (3), 1197–1210 (1998). DOI: 10.1152/jn.1998.80.3.1197
 57. Schwandt P. C., Spain W. J., Foehring R. C., Stafstrom C. E., Chubb M. C., and Crill W. E. Multiple potassium conductances and their function in neurons from cat sensorimotor cortex *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, **59** (2), 424–449 (1988). DOI: 10.1152/jn.1988.59.2.424
 58. Kang J., Huguenard J. R., and Prince D. A. Development of BK channels in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **76**, 188–198 (1996). DOI: 10.1152/jn.1996.76.6.4194
 59. Franceschetti S., Sancini G., Panzica F., Radici C., and Avanzini G. Postnatal differentiation of firing properties and morphological characteristics in layer V pyramidal neurons of the sensorimotor cortex. *Neuroscience*, **83** (4), 1013–1024 (1998). DOI: 10.1016/S0306-4522(97)00463-6
 60. Pamenter M. E. and Buck L. T. Neuronal membrane potential is mildly depolarized in the anoxic turtle cortex. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, **150**, 410–414 (2008). DOI: 10.1016/j.cbpa.2008.04.605
 61. Rodgers-Garlick C. I., Hogg D. W., and Buck L. T. Oxygen-sensitive reduction in Ca^{++} -activated K^{+} channel open probability in turtle cerebrocortex. *Neuroscience*, **237**, 243–254 (2013). DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.046
 62. Hochachka P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, **231**, 234–241 (1986). DOI: 10.1126/science.2417316
 63. Hussan M. T., Sakai A., and Matsui H. Glutamatergic pathways in the brain of turtles: a comparative perspective among reptiles, birds and mammals. *Front. Neuroanatomy*, **16**, Art. 937504 (2022). DOI: 10.3389/fnana.2022.937504
 64. Реутов В. П., Пасикова Н. В. и Сорокина Е. Г. Типовой патологический процесс при глутаматной нейротоксичности: роль активных форм азота и кислорода. *Биофизика*, **69** (5), 1044–1077 (2024).
 65. Suarez R. K., Doll C. J., Buie A. E., West T. G., Funk G. D., and Hochachka P. W. Turtles and rat: a biochemical comparison of anoxia-tolerant and anoxia-sensitive brains. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **257** (5), R1083–R1088 (1989). DOI: 10.1152/ajpregu.1989.257.5.R1083
 66. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, **79** (4), 1431–1568 (1999). DOI: 10.1152/physrev.1999.79.4.1431
 67. Медникова Ю. С., Копытова Ф. В. и Жадин М. Н. Спонтанная активность корковых нейронов *in vitro* и ее регулирование под воздействием ацетилхолина. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **95** (8), 820–829 (2009).
 68. Rall W., Burke R. E., Holmes W. R., Jack J. J. B., Redman S. J., and Segev I. Matching dendritic neuron models to experimental data. *Physiol. Rev.*, **72** (Suppl.), S159–S186 (1992). DOI: 10.1152/physrev.1992.72.suppl_4.S159
 69. Mednikova Y. S. and Rogal A. V. Heterogeneity of the neural composition of cortical regions as a condition for a wide range regulating spontaneous activity. *J. Behav. Brain Sci.*, **10**, 220–236 (2020). DOI: 10.4236/jbbs.2020.105014
 70. Leao R. M., Li Sh., Doiron B., and Tzounopoulos T. Diverse levels of an inwardly rectifying potassium conductance generate heterogeneous neuronal behavior in a population of dorsal cochlear nucleus pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, **107**, 3008–3019 (2012). DOI: 10.1152/jn.00660.2011
 71. Kim K.-R., Lee S. Y., Yoon S. H., Kim Y., Jeong H.-Yu, Lee S., Suh Y. H., Kang J.-S. Cho H., Lee S.-H., Kim M.-H., and Ho W.-K. Kv 4.1, a key ion channel for low frequency firing of dentate granule cells, is crucial for pattern separation. *J. Neurosci.*, **40** (11), 2200–2214 (2020).

M-Cholinergic Brain Reaction in Dependence on the Environmental Temperature for Cold-Blooded and Warm-Blooded Animals

S.N. Kalabushev*, **, D.N. Voronkov***, and Yu.S. Mednikova****

**Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Michurinsky prosp. 1, Moscow, 119991 Russia*

***V.A. Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, ul. Petrovka 25/2, Moscow, 107031 Russia*

****Research Center of Neurology, Volokolamskoe shosse 80, Moscow, 125367 Russia*

*****Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5A/1, Moscow, 117485 Russia*

During artificial incubation of slices of the sensorimotor cortex of guinea pigs and the telencephalon of turtles, microionophoretic application of acetylcholine to neurons revealed a significantly lower frequency of spike responses in the nerve cells of turtles compared with guinea pig cells. This difference was attributed to the different rate of M-cholinergic response in the temperature ranges of 27–29°C and 34–36°C, as found previously in hypothermic experiments. Although experiments on guinea pig and turtle neurons were performed in the same temperature range (32–34°C), the genetically determined structure of neuronal membranes reflects the natural temperature dependence of both species: guinea pig membranes with a constant habitat temperature of 38°C have a higher density of K⁺ channels than turtles with a preferred temperature of 28–32°C. The difference in K⁺ channel representation was determined by a significantly longer activation aftereffect in turtle neurons in response to glutamate-induced spike activation. The low density of K⁺ channels on membranes and the low rate of the M-cholinergic response, which closes them at the onset of any adaptive act, prevent neurons from forming high-frequency and long-lasting impulse sequences to regulate behavior over a wide range in turtles with a preferred temperature of 28–32°C.

Keywords: turtles, guinea pigs, acetylcholine, glutamate, neuronal spike activity, temperature, reaction speed