

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. А.А.БОГОМОЛЫЦА

На правах рукописи

АЛО Олушегун Джозеф

УДК 612. 826. 3 + 612. 28 + 612. 82. 10

ВЛИЯНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА, ГЛУТАМАТА И ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ
КИСЛОТЫ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПЕРИОДИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ДЫХАТЕЛЬНОГО ГЕНЕРАТОРА IN VITRO

03.00.13 - Физиология человека и животных

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



31.1
 Работа выполнена в Институте
 Украины.

Научные руководители:

- доктор биологических наук, профессор Науменко В.В.
- доктор биологических наук Преображенский Н.Н.

Официальные оппоненты:

- доктор биологических наук, профессор Сторожук В.М.
- кандидат медицинских наук Шаловалов А.М.

Ведущая организация: Киевский университет им. Т.Г. Шевченко.

Защита состоится " 1 " декабря 1993 г. в 14⁰⁰ часов
 на заседании специализированного совета Д-01.13.01 при Институте
 физиологии им. А.А.Богомольца АН Украины по адресу: 252024, г.
 Киев, ул. Богомольца, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
 физиологии им. А.А.Богомольца АН Украины.

Автореферат разослан " 28 " октября 1993 г.

Ученый секретарь

специализированного совета,

доктор биологических наук

З.А. СОРОКИНА-МАРИНА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время ритмическое дыхание связывают с фазной активностью бульбарного дыхательного генератора (БДГ), являющегося основой дыхательного центра (ДЦ) продолговатого мозга (ПМ). Однако сведений о внутренней организации дыхательного генератора, синаптических механизмах взаимодействия его нейрональных элементов, механизмах инициации и автоматии деятельности БДГ, роли хеморецепторных структур мозга в этих механизмах и, собственно, механизмах центральной хеморецепции явно недостаточно для понимания центральных механизмов регуляции дыхания (Cohen, 1981; Eldridge, Millhorn, 1981; Бреслав, 1990).

Решение этих вопросов в опытах *in vivo* оказалось практически тупиковым ввиду отсутствия приемов аналитической оценки деятельности структурных элементов БДГ, объединенных в общую нейрональную сеть ДЦ с ее многочисленными периферическими и центральными входами.

В последние годы для преодоления этих трудностей был предложен препарат изолированных продолговатого и спинного мозга (ПСМ) новорожденных крыс (Suzue et al., 1983, Suzue, 1984; Onimaru et al., 1987; Onimaru, Номма, 1987). Результаты нейрофармакологических исследований генераторных систем мозга выявили методическую адекватность и перспективность этого препарата для изучения нейрональных и медиаторных механизмов формирования периодической деятельности БДГ в составе ДЦ ПМ (Suzue, 1984; Harada et al., 1985). Уже первые исследования, касающиеся медиаторных механизмов центральной хеморецепции показали перспективность использования такой модели (Suzue, 1984; Murakoshi et al., 1985).

Целью работы явилось изучение влияния ацетилхолина (АХ), глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) на формирование спонтанной периодической активности (СПА) БДГ препарата изолированных продолговатого и спинного мозга (ПСМ) новорожденных крыс в условиях его контролируемой суперфузии искусственной спинно-мозговой жидкостью (ИСЖ).

В соответствии с намеченной целью были поставлены следующие задачи исследования:

1. Изучить пространственную локализацию нейронных структур ПМ, участвующих в инициации и генерации "первичного дыхательного

ритма";

2. Выяснить влияние температуры и суперфузии препарата растворами с различным напряжением кислорода (pO_2), двуокиси углерода (pCO_2) и концентрации водородных ионов (H^+) на СПА БДГ и определить внутритканевые изменения этих факторов в процессе применяемых воздействий;

3. Изучить влияние АХ, его агониста карбохолина, антагонистов - атропина и бензогексония, а также блокатора ацетилхолинэстеразы (АХЭ) - физостигмина - на СПА БДГ;

4. Выяснить роль глутамата и ГАМК в механизмах формирования СПА БДГ и определить характер их влияния на периодическую деятельность БДГ;

5. Изучить совместное влияние различных концентраций H^+ и АХ на количественные показатели СПА БДГ;

6. Изучить количественные характеристики СПА БДГ при суперфузии препарата растворами, содержащими различные концентрации АХ, глутамата и ГАМК;

7. На основании анализа изменений характеристик СПА БДГ при различных условиях воздействия (физических и химических) оценить специфичность этих воздействий на хеморецепторную и генераторную системы БДГ.

Научная новизна. В настоящей работе впервые показано, что бульбарный генератор первичного дыхательного ритма локализован в каудальной части ПМ на уровне конечной области (area postrema), включающей нейронные структуры задней части дорсальной и вентральной групп нейронов дыхательных ядер.

Морфологически - это нейрональная сеть, объединяющая, главным образом, ядра солитарного комплекса, обводное и позаобводное ядра, а также нейронные структуры вентральной поверхности продолговатого мозга (ВПМ), соответствующие зоне L в области выхода XII пары черепно-мозговых нервов.

Изменение концентрации H^+ в суперфузирующем растворе (СР) при целостности этой зоны позволяет направленно управлять ритмогенезом БДГ изолированных ПСМ: "кислые" растворы усиливают СПА БДГ, а "щелочные" - ее угнетают.

Добавление АХ к ИСЖ усиливает генез периодической деятельности БДГ. Низкие ("пороговые") концентрации АХ вызывают "быстродесенситизирующееся" учащение СПА генератора, а высокие -

длительную реакцию, осложняющуюся развитием тонического компонента, маскирующего фазную активность БДГ.

Карбохолин - агонист АХ - вызывает продолжительное учащение СПА БДГ с преобладанием тонического компонента импульсной активности.

Блокатор мускариновых рецепторов атропин ослабляет генез периодической активности БДГ и устраняет чувствительность препарата к ацетилхолину и карбохолину.

Блокатор АХЭ физостигмин усиливает эффективность действия эндогенного АХ, а последующее добавление в ИСЖ экзогенного АХ даже в низких концентрациях вызывает интенсивное и длительное усиление деятельности БДГ, сравнимое с действием высоких концентраций экзогенно приложенного АХ.

Впервые показано, что увеличение концентрации H^+ в СР (рН - 7,0) аллостерически усиливает эффект действия низких концентраций экзогенного АХ.

Впервые показано, что возбуждающая аминокислота глутамат и тормозящая аминокислота ГАМК оказывают реципрокное действие на механизмы формирования СПА БДГ. Добавление глутамата в ИСЖ облегчает фазную активность генератора. Временное течение такого облегчения значительно отличается от ацетилхолиновых реакций и указывает на возможность действия вещества непосредственно на систему генераторных нейронов БДГ. Однако, в отличие от совместного действия H^+ и АХ, при совместном воздействии АХ и глутамата отмечается временная суммация их эффектов.

Добавление в ИСЖ ГАМК в нарастающей концентрации угнетает фазную активность БДГ препарата изолированных ПСМ.

На основании полученных данных нами выдвинуто предположение о функциональной структуре и механизмах медиаторной активации "хемочувствительных" и "генераторных" структур БДГ. Первичная периодическая активность БДГ формируется нейронной генераторной сетью каудальной порции дыхательных ядер ПМ под влиянием тонической активности хеморецепторной системы ВППМ, соответствующей зоне L, активируемой H^+ при участии холинергической рецепторной системы. В медиаторных механизмах активации центральных хеморецепторов (ЦХР) предполагается кооперативное взаимодействие АХ и водородных ионов. Адекватными раздражителями ЦХР являются H^+ , активирующее влияние которых

облегчается экзогенным АХ.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные результаты позволяют глубже понять центральные механизмы регуляции дыхания и, в частности, деятельности БДГ ПМ; а также представить роль нейрональных сетей, локализованных в каудальной области ВППМ и ЦХР зоны L в инициации дыхательной периодики. Результаты работы могут быть использованы для целенаправленного изучения нейрональной организации БДГ, а также ионных и медиаторных механизмов его деятельности. Сведения об избирательной чувствительности ЦХР зоны L ВППМ к АХ, глутамату и ГАМК могут быть использованы при чтении теоретического курса по физиологии ЦНС, а в практике - для доклинических испытаний нейрофармакологических препаратов и при исследовании центральных механизмов нарушения дыхательного ритмогенеза.

Апробация работы. Результаты, полученные в процессе выполнения диссертации доложены на заседаниях сектора "Нейрофизиология" Института физиологии им. А.А.Богомольца АН Украины (Киев, 1992, 1993), на кафедре физиологии сельскохозяйственных животных Украинского государственного аграрного университета (Киев, 1993), на семинаре лаборатории физиологии продолговатого мозга при Институте физиологии им. А.А.Богомольца АН Украины (Киев, 1992, 1993) и на международном конгрессе по нейронаукам в Кении (Найроби, 1993).

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 31 рисунком и 4 таблицами. Список литературы насчитывает 240 источников, из них - 59 отечественных и 181 зарубежных.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на препаратах изолированных ПСМ, полученных от новорожденных крыс возрастом 1-3 суток. Приготовление препарата ПСМ осуществляли у животных, наркотизированных эфиром. После дорсальной кранио- и ламинэктомии, ствол мозга пересекали на межколликкулярном уровне (межколликкулярная дещеребрация), а спинной мозг - в нижних шейных сегментах. Препарат ПСМ высвобождали из твердых мозговых оболочек, препарировали XII пару черепномозговых нервов и вентральные корешки 4-5 шейных сегментов спинного мозга

(C₄₋₅). Во время препаровки, операционное поле непрерывно орошали охлажденной до 10 °С ИСЖ, насыщенной карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Состав ИСЖ был следующим (в ммоль/л): NaCl-124; KCl-5,0; CaCl₂-2,4; MgSO₄-1,3; NaHCO₃-26; KH₂PO₄-1,2; глюкоза-30; pH 7,4 (Murakoshi et al., 1985; Monteau et al., 1990b). Аналогичную ИСЖ использовали и для приготовления суперфузирующих растворов. Препарат изолированных ПСМ переносили в проточную термостатированную рабочую камеру объемом 1 мл, где фиксировали на профильном дне камеры вентральной поверхностью вверх.

Модификацию pH суперфузирующего раствора до 7,0 осуществляли путем уменьшения концентрации бикарбоната натрия до 10 ммоль/л, а до pH 7,7 - путем увеличения концентрации бикарбоната до 50 ммоль/л. При этом нарушение ионного состава раствора компенсировали соответственно увеличением или уменьшением содержания хлорида натрия в растворе. Скорость суперфузии препарата составляла 2,5 мл/мин. К проведению экспериментов приступали через 30-45 мин после достижения температуры CP в камере 25±0,3°C.

Измерение pH суперфузирующих растворов над мозгом и в ткани мозга производили сурьмяным микроэлектродом (Курелла, Попов, 1960) в нашей модификации заточки и полировки кончика до 10 мкм. Численные значения pH суперфузирующих растворов получали с использованием микроанализатора pH/Blood Gas Analyzer, Type OP-215 ("Radelkis", Венгрия). О кислородном обеспечении мозговой ткани препарата ПСМ судили по величине pO₂, измеряемого полярографическим методом посредством платиновых микроэлектродов с диаметром кончика 10 мкм (Сушко, 1972).

О функциональном состоянии БДГ судили по суммарным разрядам мотонейронов диафрагмы, отводимых от вентральных корешков C₄-C₅ или от диафрагмального нерва. Отведение электрической активности нерва осуществляли при помощи проволочных (диаметр проволоки 0,08 мм) биполярных хлорсеребряных электродов либо униполярным всасывающим электродом с внутренним диаметром 100-200 мкм. Фазные электрические сигналы спинальных мотонейронов усиливали с помощью усилителей переменного тока с полосой пропускания от 30 Гц до 5 КГц, дискриминировали, интегрировали (постоянная времени 100 мс), записывали в памяти персональной ЭВМ (Искра 1030-М) и анализировали. При анализе обращали внимание на амплитудные и

временные характеристики СПА БДГ до и после тестирующих воздействий, а также на периоды восстановления СПА.

Растворы физиологически активных веществ и контрольный раствор готовили непосредственно перед опытом, растворяя эти вещества в ИСЖ в следующих концентрациях (мкмоль/л): АХ - 1-5, 10, 20, 50 и 100; карбохолин - 1, 2, 10 и 50; физостигмин - 1, 5, 10, 20, 30 и 50; бензогексоний - 100; атропин - 50, 100 и 200; глутамат - 5, 10, 20, 30, 50 и 100; ГАМК - 20, 50, 60, 100 и 150.

Использовали моонатрий L-глутамат и ГАМК производства фирмы "Serva" (Германия), а все остальные фармакологические вещества - "Минмедпрома СССР".

Локализацию нейронных структур, иннервирующих СПА БДГ, устанавливали на основании перерезок ПМ в фронтальной плоскости роstralнее и каудальнее уровня задвижки тонким лезвием с интервалом 0,5-1,0 мм и последующего гистологического анализа. Качество перерезок, структурный состав и локализацию ядер оценивали на гистологических препаратах, изготовленных на замораживающем микротоме после фиксации препаратов 2% раствором глutarальдегида и окраски срезов (толщиной 50-90 мкм) нейтральным красным.

Статистическую обработку данных производили с использованием t-критерия Стьюдента. Данные выражались в средней величине \pm арифметическая ошибка среднего ($M \pm m$), n - количество препаратов ПСМ. За уровень значимости принимали значение $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние условий эксперимента на функциональное состояние препарата изолированных продолговатого и спинного мозга.

Перед изучением влияния АХ, глутамата и ГАМК на формирование СПА БДГ мы поставили перед собой задачу оценить характер деятельности БДГ препарата изолированных ПСМ при различной скорости протока и температуре СР, а также при изменении концентрации H^+ , pO_2 и pCO_2 в СР.

Повышение температуры СР вызывало увеличение частоты СПА БДГ препарата. Такое же влияние на нее оказывало увеличение концентрации H^+ в СР.

Как показали результаты измерения pH в ткани ПМ с помощью сурьмяных микроэлектродов, внутритканевое pH препарата достоверно

коррелирует с рН СР ($r = 0,99$; $P < 0,001$) и, следовательно, почти полностью определяется рН СР. Однако, изменение рН ткани мозга запаздывало по отношению к изменению рН СР на некоторое время, зависящее от глубины погружения измерительного электрода. Измеренные таким образом латентные периоды для активации поверхностных слоев препарата и его глубоких слоев (150 мкм от ВППМ) составляли около 10 с и 105 с, соответственно. Следует заметить, что латентный период активации поверхностных слоев определяется временем замены в камере контрольного раствора на тестирующий, в то время как при активации глубинных структур латентный период является суммой времен, необходимых для замены раствора в камере и для диффузии ионов в ткани мозга.

Измерение напряжения O_2 в ткани препарата изолированных ПСМ, показало, что его значение в значительной степени зависит от скорости протока СР и быстро убывает по мере погружения полярографического электрода вглубь мозга.

Полученные в настоящем разделе работы данные показали, что суперфузия препарата изолированных ПСМ при температуре 25 °С и скорости 2-2,5 мл/мин обеспечивает оптимальные физические и химические условия для продолжительного переживания препарата изолированных ПСМ и адекватного его реагирования на различные воздействия.

2. Локализация первичного дыхательного генератора у новорожденных крыс.

После межколликулярной децеребрации, произведенной в процессе приготовления препарата, в его диафрагмальном нерве (или вентральных корешках C_{4-5}) регистрировалась СПА в виде регулярных фазных разрядов длительностью $1,06 \pm 0,05$ с, следующих с частотой $9,10 \pm 0,5$ мин⁻¹ ($n=12$). Частота импульсации в этих разрядах достигала около 100 имп/с.

После перерезки ПМ, произведенной по переднему краю зоны М (позади моста ствола мозга), нарушалась регулярность возникновения фазных разрядов, что выражалось в чередовании "коротких" ($T = 4,92 \pm 0,03$ с) и "длинных" ($T = 11 \pm 0,12$ с) пауз между отдельными разрядами, а средняя частота их следования снижалась до $6,70 \pm 0,23$ мин⁻¹. При этом наиболее продолжительные разряды в диафрагмальном нерве возникали после длинных пауз. При пересечении ПМ на уровне 0,5 мм роstralнее задвижки (между корешками X и XII пар

черепномозговых нервов), что соответствует передней границе зоны I и каудальной границе зоны S, регулярная СПА БДГ восстанавливалась, а частота фазных разрядов возрастала до $9,45 \pm 0,35$ мин⁻¹. Длительность фазных разрядов при этом приближалась к исходной, а частота импульсации в диафрагмальных мотонейронах превышала исходный уровень на $33,10 \pm 1,20$ %.

Наконец, после пересечения ПМ на уровне задвижки, т.е. 0,5-0,6 мм каудальнее выхода XII пары черепномозговых нервов, импульсная активность в диафрагмальном нерве полностью исчезала и не восстанавливалась после химических (рН - 7,0) и фармакологических (50 мкмоль/л АХ в СР) воздействий. Гистологический контроль, произведенный на основании анализа серийных срезов ПМ в границах между двумя последними перерезками, свидетельствует о том, что исследованная область ПМ объединяет каудальную часть дорсальных и вентральных дыхательных ядер, а также хемочувствительную зону L ВППМ. Дыхательные ядра этой области ПМ представлены: в дорсальном его квадранте - каудальной порцией солитарного тракта с его ядрами, а в вентральном квадранте (в его вентролатеральной части) - каудальной порцией обводного и ростральной порцией позаобводного ядер. В значительной степени здесь также сохраняются латеральное и вентральное ретикулярные ядра.

Таким образом, в формировании первичного дыхательного ритма участвуют нейронные структуры каудальных отделов дорсального и вентрального дыхательных ядер, а также нейроны хемочувствительной зоны L ВППМ.

3. Влияние ацетилхолина и карбохолина на спонтанную периодическую активность бульбарного дыхательного генератора.

При добавлении в контрольный СР (рН - 7,4) 20 мкмоль/л АХ и его экспозиции в течение двух минут в вентральных корешках С₄₋₅ через 15-20 с ($16,50 \pm 0,43$ с; n=35) отмечалось выраженное учащение СПА БДГ на $55 \pm 1,3$ % (P<0,001) относительно исходного уровня. Через 1,5-2,5 мин после начала отмывки препарата, учащение активности БДГ сменялось ее урежением на $15 \pm 0,9$ % относительно первоначального уровня. Снижение частоты СПА ниже исходного уровня рассматривалось нами, как "постактивационное" угнетение. Минимальная действующая концентрация АХ в СР, которая вызывала учащение СПА БДГ составляла около 5 мкмоль/л ("пороговая"

концентрация). Ниже этой концентрации, действие АХ было ослабленным ($P > 0,05$).

С увеличением концентрации АХ в СР наблюдалось отчетливое усиление эффекта его действия. При концентрации АХ в СР 10 мкмоль/л (время экспозиции - 1 мин) начало реакции отмечалось через $20 \pm 2,4$ с, а частота фазной активности увеличивалась на $48 \pm 1,7$ % ($n=15$; $P < 0,001$). Длительность реакции была около 1,5-2,0 мин. Спустя $2,0 \pm 0,15$ мин после начала суперфузии препарата тестирующим раствором, учащение СПА БДГ сменялось ее постактивационным угнетением длительностью около 2-3 мин у разных препаратов. После $5,5 \pm 1,5$ мин отмывки препарата, частота СПА БДГ приближалась к исходному уровню, но, как правило, превышала его значение после каждого последующего воздействия АХ на $10,0 \pm 2,44$ %.

При концентрации АХ в СР 20 мкмоль/л (время экспозиции - 1 мин), развитие реакции наступало раньше (через $17,0 \pm 0,33$ с; $n=15$). Одновременно возрастала ее интенсивность и длительность (до 2-2,5 мин). Интенсивность постактивационного угнетения коррелировала с концентрацией АХ в тестирующем растворе и временем его экспозиции.

Дальнейшее увеличение концентрации АХ в СР (50 мкмоль/л и более) сопровождалось существенными нарушениями СПА БДГ. Интенсивное начальное учащение фазных разрядов сменялось исключительно тонической активностью, на фоне которой хаотично возникали abortивные фазные разряды. Такие нарушения СПА БДГ продолжались длительное время (свыше 10 мин) уже в процессе отмывки препарата контрольным раствором.

Карбохолин - сильнодействующий агонист АХ и M_2 -холиномиметик - вызывал учащение СПА БДГ ($n=5$). Однако, действие карбохолина проявлялось уже при его низких концентрациях (1 и 2 мкмоль/л). С увеличением концентрации карбохолина в СР, эффективность его действия на СПА БДГ увеличивалась. При этом, фазный компонент реакции был слабовыраженным, а тонический компонент на много превосходил таковой при действии таких же концентраций АХ.

4. Влияние физостигмина на спонтанную периодическую активность бульбарного дыхательного генератора.

Физостигмин - блокатор АХЭ - вызывал СПА генератора, а также увеличивал эффект действия экзогенного АХ. При низких концентрациях физостигмина (1 мкмоль/л и 5 мкмоль/л) в СР (рН - 7,4) и его экспозиции в течение двух минут не было отмечено

каких-либо существенных изменений частоты следования фазных разрядов БДГ. Однако, добавление к тестирующему раствору, содержащему 5 мкмоль/л физостигмина (рН - 7,4), 5 мкмоль/л АХ вызывало типичную ацетилхолиновую реакцию и изменение СПА БДГ ($n=5$) уже при его одномоментной экспозиции. Увеличение концентрации физостигмина в СР до 50 мкмоль/л при двухминутной его экспозиции вызывало увеличение частоты СПА БДГ на 25% ($n=5$), а по истечении 4-6 мин (среднее - $4,0 \pm 0,85$ мин; $n=5$) после переключения на контрольный раствор, фазная СПА БДГ осложнялась развитием тонической активности. В этом случае АХ, добавленный в тестирующий раствор в концентрации 5 или 10 мкмоль/л, вызывал интенсивную фазно-тоническую или тоническую реакции. После окончания этой реакции частота СПА БДГ медленно восстанавливалась: частотные и временные характеристики отдельных фазных разрядов длительное время (1,5-2,0 часа) отличались от исходных. Повторное приложение 10 мкмоль/л АХ через 1-1,5 часа после восстановления генерации СПА БДГ приводило к развитию типичного учащения фазной активности, а сочетанное воздействие АХ (10 мкмоль/л) и физостигмина (10 мкмоль/л) вызывало развитие исключительно тонического возбуждения в спинальных мотонейронах.

Предварительная суперфузия препарата ПСМ растворами, содержащими физостигмин в любой из тестирующих концентраций, повышала эффективность влияния не только экзогенного АХ на СПА БДГ, но и увеличивала чувствительность препарата к изменению концентрации водородных ионов в СР.

5. Влияние атропина и бензогексония на спонтанную периодическую активность бульбарного дыхательного генератора.

Добавление в СР блокатора М-холинергической передачи атропина в концентрациях 50, 100, 200 мкмоль/л вызывало снижение СПА БДГ, выраженность которого зависела от концентрации блокатора. Высокая концентрация атропина (200 мкмоль/л) вызывала необратимое нарушение генеза СПА БДГ и длительная отмывка препарата контрольным раствором не приводила к нормализации генеза.

При этом происходило блокирование ацетилхолиновой реакции на добавление 20 мкмоль/л АХ, также зависящее от концентрации атропина в СР. Период возникновения фазных разрядов БДГ на приложение 20 мкмоль/л АХ после обработки препарата изолированных ПСМ 50 мкмоль/л атропина составлял $8,57 \pm 0,48$ с, против исходного -

$8,62 \pm 0,63$ с ($n=7$, $P > 0,05$), а после обработки препарата 100 мкмоль/л АХ - $7,67 \pm 0,65$ с, против исходного - $6,62 \pm 0,55$ с ($n=13$, $P > 0,05$).

Бензогексоний - блокатор Н-холинергической передачи - добавленный в СР в концентрации 100 мкмоль/л и приложенный в течение 2-4 мин, не вызывал достоверного изменения частоты СПА БДГ ($F = 4,20 \pm 0,7$ мин⁻¹, против исходного - $4,00 \pm 0,35$ мин⁻¹; $n=8$, $P > 0,05$). Последующая суперфузия препарата раствором, содержащим АХ в концентрации 20 мкмоль/л, вызвала интенсивную реакцию СПА БДГ. Однако, в ряде случаев ($n=4$), предварительная обработка препарата бензогексонием вызвала развитие реакции, отсроченной по сравнению с реакцией только на АХ.

Аналогичная реакция БДГ отмечалась и при совместном приложении АХ и бензогексония в той же концентрации. Однако, интенсивность последней была меньше ($15 \pm 3,5$ %), чем у реакций, вызванных последовательным приложением бензогексония и АХ. Предварительная обработка изолированного препарата бензогексонием (100 мкмоль/л) вызвала также отсроченную реакцию разной интенсивности ($n=3$) или отсутствие реакции БДГ ($n=5$) на увеличение концентрации водородных ионов в СР ($pH = 7,0$). Прекращение действия обоих факторов и суперфузия препарата контрольным раствором вызывало развитие отсроченной "нетипичной" реакции, свойственной ответам БДГ, развивавшимся при суперфузии препарата кислыми растворами.

6. Особенности влияния ацетилхолина на спонтанную периодическую активность бульбарного дыхательного генератора при изменении концентрации водородных ионов в суперфузирующем растворе.

При суперфузии препарата кислым раствором ($pH = 7,0$) добавление 5 мкмоль/л АХ вызывало начальное учащение СПА, которое осложнялось сильной тонической реакцией БДГ, наступающее через $18,42 \pm 0,94$ с, против исходного - $77,0 \pm 7,5$ с при приложении только кислого раствора ($n=6$, $P < 0,001$).

При суперфузии препарата щелочным раствором ($pH = 7,7$) наблюдалась обратная картина. В этих условиях, реакция БДГ на АХ в "пороговой" (5 мкмоль/л) и "сверхпороговой" (20 мкмоль/л) концентрациях была меньше на $35 \pm 1,6$ %, по сравнению с таковой при pH СР, равном 7,4.

Таким образом, увеличение концентрации H^+ в СР облегчает эффект действия АХ на БДГ, что сопровождается учащением его фазной активности, а также появлением тонической активности БДГ, которая обычно наблюдается при действии высоких концентраций АХ (20 и 50 мкмоль/л) в СР при рН 7,4. Снижение концентрации водородных ионов в СР ослабляет эффект действия экзогенного АХ на СПА БДГ.

7. Влияние глутамата и его совместного действия с ацетилхолином на спонтанную периодическую активность бульбарного дыхательного генератора.

Глутамат в концентрациях 20 и 30 мкмоль/л в СР вызывал "позднее" (через $3,50 \pm 1,0$ мин; $n=12$), медленно нарастающее учащение фазной активности БДГ, которое удерживалось длительное время после двухминутной экспозиции тестирующего раствора. Аналогичное учащение отмечалось и при увеличении концентрации глутамата в СР до 50 и 100 мкмоль/л, которое при высокой концентрации вещества (100 мкмоль/л), сменялось нарушениями периодичности следования разрядов, уменьшением их амплитуды и длительности вплоть до исчезновения СПА БДГ. При последующей отмывке контрольным раствором редко отмечалось восстановление исходной фазной активности БДГ. В случае возобновления этой активности в спинальных мотонейронах развивались аperiodические фазные разряды или тонические разряды различной длительности.

При совместном действии АХ и глутамата, как и при действии одного АХ, развивалось устойчивое учащение спонтанной активности, продолжительность которого была сравнима с учащением, вызванным собственно АХ. Однако, абсолютное значение частоты фазной активности на совместное приложение АХ и глутамата было несколько ниже (на $10,0 \pm 1,20\%$; $n=12$), чем таковое при собственно ацетилхолиновой реакции, а динамика этой реакции характеризовалась значительной флуктуацией частоты СПА по сравнению с ацетилхолиновой реакцией.

8. Влияние гамма-аминомасляной кислоты на спонтанную периодическую активность бульбарного дыхательного генератора.

Добавление в СР ГАМК в концентрации 20 мкмоль/л не вызывало видимого изменения СПА БДГ. Ее присутствие в тестирующем растворе в концентрации 50 мкмоль/л вызывало выраженное урежение частоты СПА БДГ, в процессе которого период между отдельными фазными разрядами увеличивался до $18,75 \pm 1,79$ с, против исходного -

$9,1 \pm 0,55$ с ($n=8$, $P<0,001$), что отмечалось уже через $17,0 \pm 0,50$ с после начала подачи тестирующего раствора.

При последующем увеличении концентрации ГАМК в СР (100 мкмоль/л) отмечалось усиление ее эффекта - величина межзальных интервалов возрастала в 2-5 раз ($T=13,0 \pm 1,27$ с, против исходного - $5,20 \pm 0,83$ с; $n=8$, $P<0,001$).

После действия повышенной концентрации ГАМК (50, 60 мкмоль/л) и отмывке препарата контрольным раствором, новый уровень частоты СПА БДГ значительно превышал (на $40 \pm 1,5\%$) исходный. Такое "облегчение" периодической активности БДГ после действия ГАМК также зависело от ее концентрации в СР (в пределах 40-100 мкмоль/л).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что препарат изолированных ПСМ новорожденных крыс является удобной и адекватной моделью для изучения механизмов генеза и регуляции фазной дыхательной активности у млекопитающих. Он позволяет непосредственно подойти к решению вопросов инициации и формирования периодической деятельности генераторной системы ПМ, как основной составной части дыхательного центра. Поэтому высказанные Suzue (1984) и Murakoshi et al. (1985) рекомендации по использованию препарата ПСМ новорожденных животных для изучения нейронных механизмов деятельности генераторных систем головного и спинного мозга можно считать оправданными, а углубление и совершенствование методических подходов в этом направлении принесет несомненные успехи в понимании центральных механизмов регуляции дыхания.

Учитывая морфо-функциональную организацию ДЦ млекопитающих *in vivo* (Сергиевский, 1950; Темин, 1978; Widdicombe, Davies, 1983; Long, Duffin, 1984), мы осуществляли приготовление препарата путем перерезок ствола мозга между буграми четверохолмия (межколликкулярная децеребрация), а спинного мозга - позади ядер диафрагмального нерва (C_{5-6}). Соблюдение этих условий обеспечивало получение препаратов ПСМ, обладающих сходными функциональными характеристиками. В качестве основного критерия функциональной полноценности препарата ПСМ нами был избран характер реакции СПА БДГ на изменение концентрации водородных ионов в СР. В настоящее время считается экспериментально доказанным, что "кислые" растворы

вызывают усиление периодической дыхательной активности *in vivo* и *in vitro*, а "щелочные", напротив, ее угнетение (Loeschcke, 1982; Eldridge et al., 1984; Monteau et al., 1990b).

Этот же тест служил гарантированным основанием для суждения о наличии в системе управления дыханием генератора первичного дыхательного ритма, поиск которого сопровождался серийными перерезками ПМ.

Вопрос о наличии первичного генератора дыхательного ритма важен не только для понимания иерархической организации ДЦ, но и для установления приоритета одной из существующих гипотез инициации и формирования дыхательного ритма: гипотезы нейрональной сети или пейсмекерной гипотезы (Long, Duffin, 1984; Suzue, 1984).

Результаты наших исследований склоняют нас в этом вопросе в пользу гипотезы нейрональной сети. В такой сети есть "постоянный" источник тонической активности - ЦХР, реагирующий на адекватные раздражители и нейрональная сеть БДГ, формирующая на выходе периодическую инспираторную активность к эффекторным нейронам.

В фазно-активном препарате ПСМ, полученном после перерезки ПМ роstralнее 0,5 мм задвижки, содержится сенсорный источник тонической импульсации - зона L ВППМ (область локализации ЦХР) (Loeschcke, 1982) и каудальные отделы нейронных структур дорсального и вентрального респираторных групп, формирующие нейрональную сеть ДЦ (Long, Duffin, 1984). Эта область локализации первичного дыхательного генератора является наименее изученной в исследованиях функциональной организации нейрональной сети ДЦ, проводимых различными авторами *in vivo* (Сергиевский, 1950; Hukuhara, 1973; Темин, 1978; Cohen, 1981; Widdicombe, Davies, 1983; Long, Duffin, 1984). Их внимание было сосредоточено на более роstralные отделы ПМ, содержащие наибольший объем дыхательных ядер, и на выяснение механизмов интрабульбарного взаимодействия нейронных структур этих ядер в процессе формирования фаз дыхательного цикла под влиянием стимуляции различных афферентных источников (Cohen, 1979, 1981; Richter, 1982; Euler, 1983; Long, Duffin, 1984).

В опытах с последовательными перерезками ПМ у новорожденных крыс нам не удалось подтвердить данные Onimaru et al. (1987, 1990) и Onimaru, Nomma (1987), обнаруживших в роstralной части ПМ, соответствующей локализации ретрофациального ядра, пейсмекерные

нейроны - водители респираторного ритма. В наших опытах, при последовательных перерезках ПМ зона локализации пейсмекерных нейронов (Onimaru et al., 1987, 1988) оставалась за пределами области локализации первичного дыхательного генератора, ростральная граница которого составляла 0,5 мм ростральнее задвижки. Результаты этих экспериментов показали также, что в функциональной организации бульбарного ДЦ новорожденных крыс сохраняется уровневый принцип формирования периодической дыхательной активности, доказанный в опытах на взрослых животных *in vivo* (Hukuhara, 1973; Темин, 1978; Widdicombe, Davies, 1983).

Как показали результаты наших исследований, АХ усиливает СПА БДГ, причем эффект увеличивается с повышением его концентрации в СР. Учитывая латентный период реакции (не более 25 с), развивающейся на действие АХ, можно думать, что он непосредственно оказывает влияние на ЦХР ВППМ (Schlaefke et al., 1970; Loeschcke, 1982). В этом отношении полученные нами данные согласуются с результатами исследований, проведенных также на изолированных препаратах (Murakoshi et al., 1985; Monteau et al., 1990b).

Механизмы повышенной хемочувствительности нейронных структур ВППМ, исследованные у новорожденных крыс *in vitro* (Suzue, 1984; Monteau et al., 1990b) отражают в целом аналогичные у взрослого животного (Mitra et al., 1989). Однако, наши данные и данные Monteau et al. (1990b) свидетельствуют о том, что в механизмах хеморецепции принимает участие преимущественно каудальная часть ВППМ, соответствующая зоне L. Чувствительность нейронных структур более ростральных участков ВППМ (зона S и M) к АХ оказывается пониженной (Monteau et al., 1990b).

В то же время, в оценке эффекта влияния АХ на хемочувствительность и механизмы формирования СПА БДГ наши данные расходятся с данными Monteau et al. (1990b). Изменение характеристик СПА БДГ мы отмечали уже при его концентрациях в СР 5 мкмоль/л, в то время как Monteau et al. (1990b) применяли более высокие концентрации АХ в СР (30-50 мкмоль/л). В наших опытах аналогичные концентрации АХ вызвали осложнение фазной активности развитием тонических реакций, на фоне которых отмечалось учащение фазной активности.

Развитие тонического компонента реакции БДГ на большие концентрации АХ Widdicombe, Davies (1983) рассматривают, как

возможную активацию "молчащих", а также ретикулярных нейронов, участвующих в регуляции локомоции (Brimblescombe, 1974), так как вентральные корешки C_{4-5} помимо аксонов диафрагмальных мотонейронов, содержат аксоны локомоторных нейронов. Однако, при отведении нами активности БДГ в диафрагмальном нерве, содержащем исключительно дыхательные мотонейроны, было также отмечено развитие тонического компонента реакции на высокие концентрации АХ в СР.

Карбохолин - M_2 -холиномиметик (Bhattacharya, Sen, 1991; Кузнецов и др., 1992) - оказывает выраженное активирующее действие на ЦХР БДГ уже при низкой концентрации (1 и 2 мкмоль/л), так как он долго удерживается в синаптических окончаниях (McGeer et al., 1987) и длительно активирует ЦХР. Поэтому, в отличие от АХ, карбохолин уже в концентрации 10 мкмоль/л вызывает появление интенсивного тонического компонента реакции и нарушение периодичности фазной активности БДГ. Полученные нами данные об облегчающем влиянии карбохолина на формирование СПА БДГ находятся в согласии с результатами, полученными Monteau et al. (1990b).

Короткий скрытый период реакции БДГ на карбохолин (как и аналогичные реакции на АХ) свидетельствует о том, что его мишенью являются M_2 -холинорецепторы ВППМ.

Как показали результаты наших исследований физостигмин усиливает эффективность действия эндогенного (содержащегося в терминалях) и экзогенного (в СР) АХ. После предварительной обработки препарата изолированных ПСМ физостигмином, АХ даже в небольших концентрациях (5 и 10 мкмоль/л) вызывал развитие тонического компонента ацетилхолиновых реакций.

Физостигмин, как обратимый ингибитор АХЭ резко продлевает время действия АХ в синаптических окончаниях ЦХР, также как и в других отделах ЦНС (Wathey et al., 1979; Аничков, 1982), способствует дальнейшему выделению медиатора, что вызывает длительное поступление интенсивной тонической импульсации к нейрональной сети БДГ и, тем самым, длительное учащение СПА БДГ вплоть до нарушения механизмов генерации фазной активности. Таким образом, физостигмин является мощным активатором действия эндогенного и экзогенного АХ в механизмах активации ЦХР. Аналогичные данные о модуляции дыхательной активности физостигмином были получены у взрослых животных (Foutz et al.,

1989).

Предварительная обработка препарата СР, содержащего 100, 200 мкмоль/л атропина (блокатор М-холинергической передачи) угнетала СЛА БДГ и генез ацетилхолиновой реакции в ответ на приложение высокой концентрации АХ (20 мкмоль/л). Поэтому мы склонны считать, что АХ может принимать частичное участие в качестве медиатора в механизмах активации ЦХР ВППМ. Тем не менее, окончательное решение в пользу АХ, как основного медиатора в синаптической активации ЦХР требует дальнейшего изучения.

Отрицание Monteau et al. (1990b) участия Н-холинергической системы в механизмах синаптической активации ЦХР не нашло подтверждения в наших опытах с совместным приложением бензогексония, АХ и H^+ . Напротив, мы склонны считать, что влияние и эндогенного (рН - 7,0), и экзогенного (АХ в СР) АХ опосредуется также с участием Н-холинорецепторов. Безусловно, бензогексоний, являясь эффективным блокатором Н-холинергической передачи в вегетативных ганглиях (Скок и др., 1987; Jung, Kotona, 1990), может иметь иную схему блокирования Н-холинорецепторов в ЦХР, чем d-тубокурарин, использованный Monteau et al. (1990b). Так, например, на срезах коры мозга и гиппокампа показано, что при синаптической передаче, осуществляющейся с участием холинорецепторов, на пресинаптической мембране существует взаимодействие между мускариновыми и никотиновыми холинорецепторами. При этом активация мускариновых рецепторов M_2 -подтипа угнетает выделение АХ, а никотиновых - напротив, стимулирует (Quirion, 1991).

Одновременное снижение рН СР и добавление АХ сопровождалось развитием интенсивной реакции, которая по своим параметрам изменения периодической активности во много раз превосходила реакции, вызванные отдельным влиянием H^+ и АХ. Как правило, учащение фазной активности при этом осложнялось развитием тонической активности. Следовательно, можно думать, что при совместном действии H^+ и экзогенного АХ происходит не простая суммация их эффектов, а аллостерическое усиление эффекта действия АХ. В пользу этого говорит также тот факт, что при совместном действии пониженной концентрации H^+ (рН - 7,7) и экзогенного АХ такого облегчающего действия АХ на спонтанную активность БДГ не обнаруживается. Полученные данные согласуются с результатами,

полученными в исследованиях *in vivo* (Dev, Loeschcke, 1979) и *in vitro* (Fukuda, Loeschcke, 1979).

Мы не склонны считать, что в результате совместного действия повышенной концентрации H^+ и АХ в СР на уровне ЦХР осуществляется простая суммация эффектов их действия. Учитывая сложность взаимодействия мускариновых и никотиновых рецепторов уже на пресинаптическом уровне (Quirion, 1991), следует думать, что в естественных условиях механизм синаптической передачи с участием АХ гораздо сложнее.

Как и в опытах Murakoshi et al. (1985), нами показано, что глутамат усиливает деятельность БДГ. Однако, в отличие от данных этих авторов, эффективное действие глутамата нами было отмечено уже при концентрации 20 мкмоль/л (против 30-60 мкмоль/л по Murakoshi et al., 1985). При высоких его концентрациях (100 мкмоль/л и более) отчетливо проявлялось угнетающее влияние глутамата, что приводило к расстройству генеза периодической активности БДГ, появлению тонической активности и снижению амплитуды фазных разрядов. Очевидно, такие расстройства связаны с нейротоксическим действием глутамата, выявленным в культуре гиппокампальных клеток (Mattson, 1989) и в культивируемых нейронах коры (Rosenberg et al., 1992).

В отличие от активирующего влияния АХ на БДГ, реакция на приложение глутамата развивалась значительно позднее. Учитывая также длительность латентного периода реакции БДГ на глутамат (около 2 мин), можно думать, что мишенью его действия, являются не ЦХР, а более глубоко расположенные нейронные структуры ПМ. Возможно, такие структуры представлены клетками ободного ядра, локализованные на глубине 500-700 мкм от ВППМ (Foutz et al., 1987). Не исключено также, что аналогичной мишенью могут быть и нейроны дорсальной респираторной группы.

При совместном действии глутамата и АХ происходит алгебраическая суммация эффектов, вызываемых этими веществами раздельно: начального угнетения, вызванного глутаматом, начального облегчения, вызванного АХ, и позднего облегчения СПА БДГ, вызванного глутаматом. Происхождение последнего очевидно связано с активностью глутаматергической передачи в глубинных нейронных структурах. Однако, этот вопрос нами не выяснялся и требует самостоятельного изучения.

Зарегистрированное нами угнетение СПА БДГ при суперфузии ПСМ растворами, содержащими ГАМК, отмечено в аналогичных методических условиях Murakoshi et al. (1985). Ослабление респираторной активности при перфузии изолированного мозга взрослых крыс растворами, содержащими ГАМК, обнаружили также Hayashi, Lipski (1992).

Место действия ГАМК этими авторами не выявлено. Однако, на основании короткого латентного периода реакции БДГ (меньше 20 с), сравнимого с латентным периодом ацетилхолиновой реакции того же препарата, можно согласиться с мнением Пескова и др. (1987), что местом связывания ГАМК является ГАМК-ергические ЦХР ВПМ. Тем не менее конкретное представление о тормозящих механизмах ГАМК-ергической передачи, включая ионные механизмы, и причине учащения спонтанной активности БДГ, развивающейся после угнетающего действия ГАМК на СПА БДГ, до настоящего времени не выяснены. Аналогичное облегчение фоновой активности БДГ после действия ГАМК констатированы у миног (Rovainen, 1983), у БДГ новорожденных крыс (Murakoshi et al., 1985) и бульбарного ДЦ у взрослых кошек (Нерсисян, 1987).

Пятин и Измакова (1985) полагают, что в основе двухфазного действия ГАМК лежит баланс между эффектами холинергической и ГАМК-ергической систем ДЦ, которые регулируют реципрокные взаимоотношения между дыхательными нейронами.

В В О Д Н

1. Препарат изолированных продолговатого и спинного мозга новорожденных крыс содержит первичный дыхательный генератор, периодическая деятельность которого отражает изменения рН искусственной спинно-мозговой жидкости.

2. Показано, что первичный дыхательный генератор локализован в каудальной части продолговатого мозга на уровне его конечной области (area postrema). Морфологически - это клеточная сеть, образованная ядрами солитарного комплекса, ободным и позаободным ядрами, вентральным и мелкоклеточным ретикулярными ядрами, а также нейронными структурами хемочувствительной зоны L вентральной поверхности продолговатого мозга.

3. Выявлено, что ацетилхолин усиливает периодическую деятельность бульбарного дыхательного генератора, а карбохолин

вызывает более эффективное и продолжительное учащение его спонтанной периодической активности, по сравнению с ацетилхолином.

4. Атропин ослабляет периодическую активность бульбарного дыхательного генератора и угнетает чувствительность препарата продолговатого и спинного мозга к ацетилхолину и карбохолину.

5. Физостигмин усиливает эффективность действия повышенной концентрации водородных ионов и экзогенного ацетилхолина.

6. Выявлено, что увеличение концентрации водородных ионов в суперфузирующих растворах аллостерически усиливает эффект действия экзогенного ацетилхолина.

7. Бензогексоний облегчает влияние ацетилхолина и повышенной концентрации водородных ионов на центральные хеморецепторы бульбарного дыхательного генератора.

8. Глутамат активизирует нейрональную сеть бульбарного дыхательного генератора.

9. Показано, что гамма-аминомасляная кислота угнетает синаптическую передачу в центральных хеморецепторах и может быть функциональным антагонистом ацетилхолина:

10. Генез периодической деятельности бульбарного дыхательного генератора обеспечивается нейрональной сетью генераторных нейронов каудальной порции дыхательных ядер продолговатого мозга, активируемых центральными хеморецепторами (зона L вентральной поверхности продолговатого мозга), адекватным раздражителем которых является pH окружающей среды, а синаптическая передача осуществляется с участием эндогенных ацетилхолина и гамма-аминомасляной кислоты.

Материалы диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Аю J. O., Preobrazhensky N. N., Fenik V. B. Localisation of primary respiratory rhythm generator in the newborn rat // Afr. J. Neurosci. - 1993. - Vol. 1, N 1. - P. 36.

2. Аю J. O., Preobrazhensky N. N., Sushko B. S. Effects of acetylcholine and pH on bulbar respiratory rhythm generator in neonatal rats in vitro // Afr. J. Neurosci. - 1993. - Vol. 1, N 1. - P. 38.

3. Аю О. Дж., Преображенский Н. Н. Центральные механизмы дыхательного ритмогенеза // Нейрофизиология (в печати).

AB 28.354

AB 28.354