

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

МАРЧЕНКО Віталій Анатолійович

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕДУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ
ФОРМУВАННЯ ДИХАЛЬНОГО РИТМУ

14.03.03. - нормальна фізіологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

КИЇВ - 1997



00751669 (Y)

AB 37.089

Робота виконана в Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця
Національної Академії Наук України

Наукові керівники: доктор біологічних наук,
професор Микола Миколайович Преображенський ;
доктор медичних наук,
професор Михайло Михайлович Середенко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Людмила Миколаївна Шаповал;
кандидат медичних наук
Олександр Володимирович Шаповалов

Провідна установа: Інститут фізіології
Державного університету ім. Т.Г.Шевченка

Захист відбудеться "25" березня 1997 р. о 14 годині
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-01.13.01
при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України
за адресою: 252024, м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту
фізіології ім.О.О.Богомольця.

Автореферат розісланий "25" лютого 1997 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук

З.О.Сорокіна-Маріна

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Головна функція системи зовнішнього дихання визначається у підтриманні оптимального газового складу артеріальної крові і рН. Будучи однією з головних систем життя забезпечення організму, система дихання функціонує у тісній взаємодії з серцевосудинною системою. Основним механізмом, який керує діяльністю вентиляторного апарату, є система центральних нейронів понтомедулярного рівню, що забезпечує зміну фаз дихального циклу і має назву дихального центру.

Незважаючи на прогрес техніки експерименту, що пов'язано з використанням штучно суперфузованих медулоспинальних препаратів і медулярних зрізів тварин перших днів життя (Suzu, 1985; Smith et al. 1990), досі ряд важливих аспектів даної проблеми залишається невирішеним. Зокрема, залишається неясною природа первинних механізмів респіраторного ритмогенезу. Однією з гіпотез, що пояснюють природу організації центральних механізмів генерації респіраторного ритму, є гіпотеза респіраторної мережі (Salmoirhai, Baumgarten, 1961; Cohen, 1979). Між тим існує думка, що дихальний ритм формується за рахунок функціонування особливих пейсмеркерних нейронів (Onimaru et al. 1987, 1989; Smith et al. 1990, 1991). Проте, як показують роботи останніх років (Richter et al. 1992; Di Pasquale et al. 1994; Johnson et al. 1994), пейсмеркерні механізми мають більш важливе значення для респіраторного ритмогенезу у тварин перших днів життя, ніж у дорослих. Такий підхід обумовив появу компромісної точки зору (Di Pasquale et al. 1994), згідно якій у тварин першого дня життя основною ритмогенеруючою системою є преінспіраторні пейсмеркерні нейрони рострального вентродорального Свіддіву довгастого

мозку (ВЛЕДМ), у той час як у більш старших тварин респіраторний ритм генерується за рахунок функціонування мережових механізмів, розташованих на рівні каудального ВЛЕДМ. Проте у даній роботі досліджувались щурята тільки першого дня життя, у той час як ефективне функціонування реципрокних міжнейронних зв'язків респіраторної мережі починається у цих тварин з 4-5-го дня життя (Szohweitzer et al. 1992).

Останні роки (Koos et al. 1994; Schmidt et al. 1995) характеризуються підвищенням інтересу до центральних механізмів респіраторних реакцій в умовах гіпоксії. Особливу актуальність ця проблема набуває у зв'язку з необхідністю розробки методів запобігання різним форм порушення дихання, пов'язаних з гіпоксією у новонароджених і дітей перших днів життя (Rodrigues-Alarcon et al. 1994). Увагу дослідників залучає також роль амінергічної і опіоїдергічної систем у центральних механізмах регуляції дихання (Moss et al. 1986; Arista, Oshiiishi, 1991). Відомо, що опіоїдергічні і серотонінергічні нейромедіаторні механізми безпосередньо відповідають за сполучені реакції дихальної і серцевосудинної систем на дію таких факторів, як больове подразнення (Lovick, Li, 1989) і гіпоксії (Huang et al. 1994), а також до порушення дихання (тривалі апное) у дітей перших днів життя (Prechtl, 1978). Це може лежати в основі розвитку синдрому раптової смерті новонароджених (Morin et al. 1992; Storm et al. 1994; Caroff et al. 1994).

З'ясування цих питань, необхідних для розуміння становлення медулярних механізмів генерації і регуляції дихального ритму у перші дні новонародженості, визначило мети і задачі цього дослідження.

МЕТА РОБОТИ: дослідження медулярних механізмів формування дихального ритму у штучно суперфузованих (in situ) частково ізольованих медулоспинальних препаратів (ЧІМСП) щурят перших днів життя.

ЗАДАЧІ ДОСЛІДЖЕННЯ:

1. Провести дослідження електричної активності n.phrenicus частково ізольованих медулоспинальних препаратів при послідовних поперечних перерізах вентролатеральних відділів довгастого мозку.

2. Провести дослідження впливу блокаторів опіоїдних і серотонінових рецепторів на респіраторну активність n.phrenicus частково ізольованих медулоспинальних препаратів.

3. Провести дослідження впливу гіпоксії на електричну активність n.phrenicus частково ізольованих медулоспинальних препаратів.

4. Провести дослідження частотних характеристик респіраторних нейронів вентролатеральних відділів довгастого мозку частково ізольованих медулоспинальних препаратів.

5. Дослідити пейсмейкерні властивості медулярних респіраторних нейронів вентролатеральних відділів довгастого мозку частково ізольованих медулоспинальних препаратів.

НАУКОВА НОВИЗНА. Вперше показано, що в ідентичних умовах експерименту у новонароджених щурят частота інспіраторних розрядів у n.phrenicus і їх інтегральна інтенсивність, що відображає об'ємно-часові характеристики інспірації, є значно нижчою аналогічних показників у 4-5-денних тварин.

Виявлено, що у препаратів новонароджених щурят активність системи опіоїдєргічного контролю механізмів респіраторного ритмогенезу перевищує таку у 4-5-денних, у той час

як серотонінергічні впливи, що відповідають за підтримання стабільного рівня збудженості респіраторної мережі більш виражені у останніх. Вперше доведено, що респіраторна активність, яка генерується ЧМСП шурят перших днів життя, є ейпноподібною, у той час як розвиток гаспінгподібною активності спостерігається тільки в умовах тривалої гіпоксії.

При дослідженні частотних характеристик преінспіраторних нейронів виявлена тенденція трансформації їх патернів з біфазного, що має два частотних максимуми - преінспіраторний і постінспіраторний, у новонароджених тварин, на монофазний, що має один преінспіраторний частотний максимум, у 4-5-денних шурят. Дослідження пейсмеркерних властивостей респіраторних нейронів на основі їх стійкості до дії розчину зі зниженим вмістом Ca^{2+} , який надійно блокує синаптичну передачу, показало, що найбільш стійкими з них є преінспіраторні і експіраторні нейрони шурят 1-го дня життя. Менш стійкими виявились аналогічні нейрони 4-5-денних шурят, у той час як інспіраторні нейрони тварин обох груп такої стійкості не мали. Це може вказувати на важливу роль пейсмеркерних механізмів у генерації респіраторного ритму у новонароджених тварин. У результаті відділення шляхом поперечних перерізів і ефектів електрокоагуляції зон ВЛВДМ, що містять преінспіраторні нейрони, показано, що ці ділянки мають важливе значення у підтриманні механізмів генерації респіраторного ритму у шурят 1-го дня життя у порівнянні з 4-5-денними.

ТЕОРЕТИЧНЕ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ. Проведені дослідження стану центральних механізмів респіраторного ритмогенезу дозволяють розширити і доповнити відомості про природу генерації дихального ритму у тварин перших днів життя.

Дані про роль різних відділів вентролатеральної області довгастого мозку у механізмах генерації і регуляції респіраторного ритму можуть стати внеском у розвиток уявлень про організацію медулярної респіраторної мережі. Аналіз частотних характеристик респіраторних нейронів, а також їх пейсмеркерних властивостей дозволяють більш конкретно судити про становлення і основні принципи функціонування респіраторної мережі у тварин перших днів життя.

Дані відносно принципів організації центральних механізмів генерації і регуляції респіраторного ритму у тварин перших днів життя можуть слугувати основою для дослідження таких форм порушення дихання як тривалі апное у новонароджених дітей і розвиток синдрому раптової смерті новонароджених.

ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ, ЩО ВІНОСЯТЬСЯ НА ЗАХИСТ:

1. Медулярні механізми формування дихального ритму у новонароджених тварин характеризуються визначеною нестабільністю їх функціонування, що вказує на істотну розбіжність у ступені зрілості респіраторної мережі у тварин різного віку.

2. Ростральні і проміжні відділи ВЛЕДМ надають різнонаправлені впливи на медулярні механізми респіраторного ритмогенезу, що в значній мірі зумовлено існуванням систем опіоїдергічного і серотонінергічного контролю над діяльністю респіраторної мережі.

3. У новонароджених тварин активність системи опіоїдергічного контролю механізмів респіраторного ритмогенезу перевищує таку у 4-5-денних, у той час як серотонінергічні впливи, що відповідають за підтримання стабільного рівню збудженості респіраторної мережі, у тварин першого дня життя ще недостатньо сформовані.

4. Проміжні відділи ВЛВДМ, що містять преінспіраторні нейрони, грають важливу роль у підтриманні стабільного функціонування респіраторної мережі у тварин першого дня життя, що, можливо, зумовлено пейсмеркерними властивостями преінспіраторних нейронів. Для більш старших тварин дані структур не є необхідними для генерації дихального ритму.

АПРОВАЦІЯ РОБОТИ. Основні матеріали дисертації демонструвались, доповідались і обговорювались на міжнародній конференції "Rhythmogenesis, Plasticity: Advantages and limits of new experimental approaches in Neurobiology" (Marseille, 1994), II конгресі патофізіологів України (Київ, 1996), а також на сумісному засіданні секторів нейрофізіології і фізіології вісцеральних систем Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України (Київ, 1997 р.).

ПУБЛІКАЦІЇ. За матеріалами дисертації опубліковано 6 наукових праць.

ДЕКЛАРАЦІЯ ОСОБИСТОГО ВНЕСКУ. Автором самостійно проведено експериментальне дослідження, обробку, аналіз і викладення результатів.

ОБСЯГ І СТРУКТУРА РОБОТИ. Дисертація викладена на 136 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 4 таблицями і 27 малюнками, складається із вступу, 4 розділів, висновків і списку цитованої літератури, який вміщує 9 вітчизняних і 176 зарубіжних джерел.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Для приготування частково ізольованих медулоспинальних препаратів (ЧІМСП), що знаходяться *in situ* (Suzu, 1984, 1985), були використані новонароджені і 4-5-денні щуренята

лінії Вістар (49 і 47 тварин відповідно). Під глибоким ефірним наркозом здійснювалась задня ламінектомія і білатерально пересікалися всі дорсальні корінці. Потім розкривалась основа мозку, який пересікався по виходу корінців п. abducens (рівень "а"). Препарувався та перерізувався правий п. phrenicus. У ряді серій виконувались поперечні перерізи вентролатеральних відділів довгастого мозку (ВЛЕДМ) між хемочутливими зонами "М" і "S" (рівень "b"), "S" і "L" (рівень "c"), що відповідає верхній межі жмутка філаментів корінця п. hypoglossus, і по середині корінця п. hypoglossus (рівень "d").

Суперфузуючий розчин являв собою насичений карбогеном (95 % O₂ + 5 % CO₂ на протяві 10 хв при 25-26 °С) модифікований розчин Кребса слідуючого складу (у мілімолях на 1л): NaCl - 124.0; KCl - 5.0; KH₂PO₄ - 1.2; CaCl₂ - 2.4; MgSO₄ - 1.3; NaHCO₃ - 26.0; глюкоза - 30.0 (рН 7.4). Швидкість течії розчину складала 4.0 мл /хв. Для моделювання умов гіпоксії застосовувався тестучий ізокапнічний розчин, насичений сумішшю зі зниженим вмістом O₂ (20 % O₂ + 75 % N₂ + 5 % CO₂).

Інспіраторні розряди (IP) у вигляді електричних сигналів, що відводяться від п. phrenicus біполярно, подавались на підсилювач змінного струму, дискримінувались, подавались на амплітудно-частотний інтегратор (постійна часу 30.0 мс), а потім на 12-розрядний аналого-цифровий перетворювач (АЦП), з'єднаний з персональним комп'ютером. Реєстрація позаклітинної активності респіраторних нейронів здійснювалась шляхом скляних мікроелектродів. Позаклітинні сигнали, що заадагідь посилювались, дискримінувались і потім подавались на один з каналів АЦП. У зонах відведення здійснювалась електрокоагуляційна позначка (100 мкА - 10 с), після чого довгас-

тий мозок вирізався блоком і фіксувався у 10 % розчині формаліну протягом 48 год. З цих блоків на заморожувачому мікроскопі готувалися арізи товщиною 30 - 50 мкм.

З метою дослідження пейсмеркерних властивостей респіраторних нейронів застосовувалася методика (Onimaru et al. 1987) суперфузії препарату тестуючим розчином з низьким вмістом іонів Ca^{2+} (0.2 ммоль CaCl_2) і високим - іонів Mg^{2+} (0.5 ммоль MgCl_2). Аналіз імпульсної активності стійких до дефіциту іонів Ca^{2+} нейронів виконувався протягом 1 год після припинення IP у n.phrenicus. Визначався час стійкості кожного з досліджених респіраторних нейронів до дії тестуючого розчину.

У ряді випадків, згідно з програмою експериментальної частини тонким (діаметр - 10 - 25 мкм) електродом, заповненим сплавом Вуда, здійснювалася монополярна електростимуляція зон розташування преінспіраторних і області розташування інспіраторних і експіраторних нейронів прямокутними імпульсами струму тривалістю 5.0 мс (20 мкА).

У роботі використовувалися блокатор μ -опіатних рецепторів налоксон і блокатор серотонінових (5-HT_2) рецепторів метисергід ("Sigma", США). Аналіз експериментальних даних здійснювався з використанням критерію Ст'юдента для малих об'ємів експериментальних виборок ($P < 0.05$). Оцінювались частота F_1 , хв^{-1} , тривалість T_1 , мс, інтегральна інтенсивність S_1 і амплітуда A_1 , ум.од. (1 умовна одиниця дорівнює інтегрованому електричному сигналу, який має амплітуду 5 мкВ при частоті 5 Гц) IP.

Дослідження імпульсної активності респіраторних нейронів здійснювалось на основі реєстрації їх розрядів протягом

20 респіраторних циклів. Частота розрядів преінспіраторних нейронів усереднювалась, оцінювався ступінь гальмування активності преінспіраторних і експіраторних нейронів протягом фази IA у n. phrenicus.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Результати проведених експериментів показали, що у 4-5-денних щурят частота дихальної ритміки, її тривалість і інтенсивність при будь-якій конфігурації препарату були вірогідно вищими, ніж у новонароджених тварин (табл.1). Після перерізу нижче хемочутливої зони "M" достовірно збільшувалася частота слідування і зменшувались тривалість, інтегральна інтенсивність і амплітуда IP при одночасному збільшенні дисперсії цих величин. Результати перерізки між хемочутливими зонами "S" і "L" показали, що у піддослідних тварин обох груп достовірно знижувались частота, тривалість, інтегральна інтенсивність і амплітуда IP при одночасному збільшенні дисперсії цих параметрів. Було також відмічено, що після перерізки нижче хемочутливої зони "S" респіраторний ритм зберігався тільки у 7 з 12 новонароджених щурят. У 4-5-денних тварин дихальна періодика спостерігалась у всіх без виключення препаратах.

Суперфузія протягом 2 хв розчином, що містить 1.0 мк-Моль налоксону, в умовах вихідної конфігурації препарату викликала достовірне збільшення частоти слідування IP у тварин обох груп. Абсолютні величини приросту частоти IP у групах виявились близькими, проте у новонароджених щурят цей приріст складав у середньому 124, а у 4-5-денних - тільки 57 %. У 4-5-денних щурят налоксон викликав достовірне зменшення

Табл. 1. Показники респіраторної активності медулоспинальних препаратів при послідовних перерізах вентролатеральних відділів довгастого мозку у новонароджених (одноденних) і чотирьох-п'ятиденних щурят.

Вік тварин, дні	Рівень перерізи	Параметри респіраторної активності			
		F_i , хв^{-1}	T_i , мс	S_i , ум.од.	A_i , ум.од.
1	а	4.3 ± 0.3	571 ± 48	465 ± 29	41 ± 4
		*	+	*	*
1	б	12.8 ± 2.3	436 ± 53	218 ± 34	32 ± 7
			+	*	*
1	с	3.4 ± 0.8	412 ± 52	150 ± 30	26 ± 5
4-5	а	11.6 ± 0.5	987 ± 73	1795 ± 40	91 ± 10
		*	+	*	+
4-5	б	19.1 ± 1.4	614 ± 71	952 ± 56	68 ± 8
		*	+	*	+
4-5	с	6.1 ± 0.7	429 ± 53	317 ± 32	39 ± 6

Примітки: зірочками і хрестиками позначені вірогідно достовірні відрізнення між середніми і їх дисперсіями відповідно ($n = 12$ - для новонароджених, $n = 8$ - для 4-5-денних тварин, $P < 0.05$); а-с - рівні поперечних перерізів вентролатеральних відділів довгастого мозку.

як амплітуди, так і інтегральної інтенсивності IP у серед-

ньому на 24 і 31 % відповідно. Між тим у новонароджених тварин хоч і спостерігалася тенденція до зниження даних параметрів, достовірних відрізень від їх контрольних величин виявлено не було. Після відділення хемочутливої зони "М" приріст частоти ІР під впливом налоксону у одноденних щурят у середньому склав 5.1, а у 4-5-денних - 3.1 хв^{-1} , тобто 47 і 20 % відповідно. Таким чином, відносне збільшення частоти ІР стало майже втричі меншим, ніж в умовах вихідної конфігурації препарату (розбіжності достовірні). Після відділення хемочутливої зони "S" приріст частоти ІР під впливом налоксону відносно її вихідного рівня у одноденних щурят у середньому дорівнював 1.5 хв^{-1} , що склало 38 %.

Суперфузія протягом 2 хв розчином, що містить 10.0 мкМоль метисергіда, в умовах вихідної конфігурації препарату у тварин обох груп викликала достовірне зменшення частоти слідування ІР. Після відділення хемочутливої зони "М" зниження частоти ІР під впливом метисергіда у одноденних щурят у середньому склало 4.0 (37 %), а у 4-5-денних - 9.4 (62%) хв^{-1} . Таким чином, відносне зменшення частоти ІР у 4-5-денних тварин достовірно перевищувало аналогічний показник у новонароджених. Після відділення хемочутливої зони зменшення частоти ІР у результаті дії метисергіда у 4-5-денних щурят у середньому дорівнювало 2.0 хв^{-1} , що склало 37 %. У новонароджених тварин будь-яких вірогідних змін ІА не було виявлено.

Короткочасна гіпоксія, що викликається експозицією суперфузуючого розчину з вмістом 20 % O_2 на протязі 2 хв, не викликала будь-яких достовірних змін характеристик ІА у *p. phrenicus* у новонароджених щурят. У 4-5-денних тварин в аналогічних умовах було відзначено короткочасне (до 30 с) поча-

стіцання IP з подальшим більш тривалим пригніченням (до 4 хв) - причому знижувались і частота, і амплітуда IP. У ході дослідження впливу тривалої гіпоксії (до 20 - 30 хв) на характеристики респіраторних патернів встановлено, що у одноденних ЧІМСП пригнічення IP у *n.phrenicus* відбувалося поступово протягом 10-13 хв. У 4-5-денних щурят повне пригнічення IA відбувалося за 4-6 хв, тобто, значно швидше. Як і у тесті з короткочасною гіпоксією, пригніченню IA у 4-5-денних щурят передувало недовгочасне (до 30 с) почаття IP. Після повного пригнічення IA у 10 з 13 4-5-денних щурят відзначалась поява у *n. phrenicus* різної за ступенем інтенсивності тонічної активності. У 5 препаратів одноденних щурят подібна тонічна активність була слабо вираженою і змінювалась розвитком нерегулярних низькоамплітудних IP короткої тривалості (283 ± 48 мс). Ці скорочені залпи були кваліфіковані як гаспінг - розряди. У 6 4-5-денних щурят після фази тонічної активності була відзначена поява таких же нерегулярних низькоамплітудних гаспінг-розрядів скороченої тривалості (328 ± 67 мс). У 4 з цих препаратів на фоні гаспінг-патерну спостерігались окремі ейпное - подібні інспіраторні залпи. Як у новонароджених, так і у 4-5-денних щурят тривалість фази гаспінг - розрядів складала не більше 6-8 хв, після чого яка-небудь активність у *n. phrenicus* була відсутня. Після поперечних перерізів ВЛЕДМ по середньому рівню виходу *n.hypoglossus*, що проекційно відповідає розташуванню "заслонки" (obex) дна 4-го шлуночка мозку, ми не виявили у контролі будь-якої фази IA у *n.phrenicus* у жодному з препаратів. Проте у тесті з тривалою гіпоксією у *n. phrenicus* розвивалась незначна тонічна активність з подальшою появою гаспінг-розрядів як

у новонароджених (3 з 14), так і у 4-5-денних (5 з 13) тварин. Тривалість таких гаспінг-роарядів у одноденних щурят складала 294 ± 67 мс, а у 4-5-денних - відповідно 317 ± 44 мс. Тривалість фази генерації гаспінг-роарядів у щурят обох груп була не більш 4-6 хв, після чого будь-яка активність у *n.phrenicus* припинялась. Після поперечної перерізки ВЛЕДМ по нижньому краю області виходу *n.hypoglossus*, що проекційно відповідає "письмовому перу" дна четвертого шлуночка мозку, ми також не виявили будь-якої фазної активності у *n.phrenicus* при суперфузії ЧІМСП стандартним розчином у жодному з випадків. Але у тесті з тривалою гіпоксією у частини досліджених препаратів (у 2 з 14 1-денних і 4 з 13 4-5-денних) у *n.phrenicus* були виявлені тільки слабкі тонічні реакції без розвитку яких-небудь фазних роарядів.

При дослідженні частотних характеристик респіраторних нейронів було вивчено 53 преінспіраторних (26 - у новонароджених і 27 - у 4-5-денних ЧІМСП), 35 інспіраторних (17 - у новонароджених і 18 - у 4-5-денних ЧІМСП) і 29 експіраторних нейронів (13 - у новонароджених і 16 - у 4-5-денних ЧІМСП). Патерни роарядів преінспіраторних нейронів характеризувались наявністю двох максимумів - преінспіраторного і постінспіраторного - тобто безпосередньо перед початком інспіраторного роаряду у *n. phrenicus* (за 150 - 300 мс) і у момент його закінчення, що узгоджується з даними робіт групи Онімару (Onimaru et al. 1987, 1989). Усереднені значення частоти преінспіраторного максимуму були достовірно вище у 4-5-денних ЧІМСП, а їх дисперсії - нижче ($18.2 \pm 4.7 \text{ с}^{-1}$) у порівнянні з такими у препаратів новонароджених щурят ($11.3 \pm 5.8 \text{ с}^{-1}$). У всіх зареєстрованих преінспіраторних нейронів

відначалося зниження частоти розрядів у фазу інспірації - аж до повного їх зникнення у частини з них, знайдених у 4-5-денних препаратів. Середнє значення частоти розрядів у момент фази інспірації було достовірно вище у новонароджених ЧІМСП ($3.4 \pm 2.1 \text{ с}^{-1}$) у порівнянні з таким у 4-5-денних щурят ($1.6 \pm 0.8 \text{ с}^{-1}$). Звертає на себе увагу також той факт, що серед всіх преінспіраторних нейронів, зареєстрованих у ЧІМСП новонароджених щурят, постінспіраторний максимум був досить добре виражений у 14 одиниць, у той час як у 7 він мав тенденцію до зменшення, а у інших 5 нейронів і зовсім був відсутній. Між тим для преінспіраторних нейронів, зареєстрованих у ЧІМСП 4-5-денних щурят, постінспіраторний максимум був досить добре виражений всього тільки у 6 одиниць, мав тенденцію до зменшення у 4 і був відсутній у 17 з них.

При дослідженні інспіраторних нейронів виявлено, що середнє значення частоти їх розрядів протягом всієї фази інспірації було достовірно вище у ЧІМСП 4-5-денних щурят, у той час як її дисперсія значно нижче ($26.4 \pm 3.9 \text{ с}^{-1}$) в порівнянні з аналогічними показниками у препаратів новонароджених тварин ($19.8 \pm 5.7 \text{ с}^{-1}$). В експіраторних нейронах середнє значення їх частоти протягом межінспіраторної фази було достовірно вище у ЧІМСП 4-5-денних щурят, у той час як її дисперсія значно нижче ($13.9 \pm 3.9 \text{ с}^{-1}$) в порівнянні з аналогічними показниками у препаратів новонароджених тварин ($9.3 \pm 4.6 \text{ с}^{-1}$). Характерною особливістю експіраторних нейронів було зниження частоти їх розрядів у фазу інспірації, середнє значення якої було достовірно вище у новонароджених ЧІМСП ($2.7 \pm 1.9 \text{ с}^{-1}$) в порівнянні з таким у препаратів 4-5-денних щурят ($1.1 \pm 0.6 \text{ с}^{-1}$). Морфологічний аналіз ділянок

відведення позаклітинної активності респіраторних нейронів показав, що вони відповідають ретрофасіальній зоні роотраль-ного ВЛЕДМ, яка містить, згідно Онімару та ін. (Onimaru et al. 1987, 1989), преінспіраторні пейсмеркерні нейрони, і Complex Pre-Botzinger каудального ВЛЕДМ, який, згідно Сміта і Фельдмана (Smith et al. 1991), містить інспіраторні умовно-пейсмеркерні нейрони.

Електрична стимуляція зони розташування преінспіраторних нейронів показала, що у щурят обох груп викликана інспіраторна відповідь у *n.phrenicus* виникала при нанесенні стимулу тільки у другій половині міжінспіраторної паузи. Проте стимуляція зони розташування виявлених нами інспіраторних і експіраторних нейронів викликала у ЧІМСП обох груп інспіраторну відповідь у *n.phrenicus* незалежно від того, у який момент інспіраторного циклу був нанесений стимул.

Після двосторонньої електрокоагуляції зони розташування преінспіраторних нейронів усі ЧІМСП 4-5-денних щурят відновили свою вихідну респіраторну активність, у той час як серед препаратів новонароджених тварин фаза респіраторна активність була відновлена тільки у 21 з 27 ЧІМСП. Між тим, двостороння електрокоагуляція області розташування інспіраторних нейронів виявилася для всіх досліджених ЧІМСП новонароджених і 4-5-денних щурят невідтворюваною - жодний з них не відновив своєї вихідної респіраторної активності.

З метою з'ясування пейсмеркерних властивостей респіраторних нейронів на стійкість до дефіциту Ca^{2+} в середовищі, що надійно блокує синаптичну передачу, було протестовано 53 преінспіраторних (26 - у новонароджених і 27 - у 4-5-денних ЧІМСП), 35 інспіраторних (17 - у новонароджених і 18 - у

4-5-денних ЧІМСП) і 39 експіраторних нейронів (19 - у новонароджених і 20 - у 4-5-денних препаратів). З усіх 35 досліджених інспіраторних нейронів жодний не виявив яких-небудь ознак стійкості до дефіциту Ca^{2+} - всі вони припиняли свою активність майже одночасно зі зникненням фазних розрядів у *n.phrenicus*. Преінспіраторні нейрони виявилися більш стійкими до нестачі Ca^{2+} . Найбільш стійкі з них були у змоззі генерувати спайкову активність протягом декількох десятків хвилин після зникнення інспіраторних розрядів у *n.phrenicus*. Проте час стійкості преінспіраторних нейронів до дефіциту Ca^{2+} не перевищував 25 хв для 4-5-денних ЧІМСП і 40 хв - для препаратів новонароджених тварин (табл. 2). Було також виявлено, що у процесі дії розчину зі знизеним вмістом іонів Ca^{2+} патерни розрядів преінспіраторних нейронів проходять фазу нерегулярної низькочастотної тонічної активності, що з'являється у міжпачечних інтервалах, яка потім знову набуває характеру пачечного патерну, який поступово трансформується у поодинокі розряди.

Дослідження динаміки розрядів експіраторних нейронів в умовах дефіциту Ca^{2+} у середовищі виявило, що дані одиниці хоч і мають певний ступінь резистентності до дії тестуючого розчину, проте їх активність виявилась менш стійкою в порівнянні з преінспіраторними нейронами. Це особливо характерно для ЧІМСП новонароджених тварин, у яких найбільш стійкі до дії тестуючого розчину преінспіраторні нейрони виявляли свою активність протягом 30 - 40 хв, у той час як максимальний термін стійкості експіраторних нейронів не перевищував 15 - 25 хв (табл. 2). Аналіз патернів активності стійких до дефіциту Ca^{2+} експіраторних нейронів показав, що

Табл. 2. Динаміка стійкості респіраторних нейронів до дії розчину з низьким вмістом іонів Ca^{2+} .

		Кількість стійких до дефіциту Ca^{2+}								
Вік тварин,	Тип нейро-	респіраторних нейронів у різні інтервали часу (хв) їх тестування								
дні	нів									
		0-5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	
	пре-	6	5	4	3	3	2	2	1	
1	інсп									
	експ-і	7	5	4	2	1	0	0	0	

	пре-	11	8	5	2	1	0	0	0	
4-5	інсп									
	експ-і	12	4	3	1	0	0	0	0	

Примітки: пре-інсп - преінспіраторні, експ-і - експіраторні.

Іх розряди проходять фазу відносно регулярної тонічної активності, середня частота якої перевищує вихідний рівень на 8.3 ± 4.2 і 12.7 ± 5.4 % у новонароджених і 4-5-денних ЧІМСР відповідно. Звертає на себе увагу також той факт, що після фази підвищеної тонічної активності розряди експіраторних нейронів трансформуються у відносно регулярний пачечний тип, який у міру подальшої дії тестуючого розчину зменшується до регулярної низькочастотної імпульсної активності.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.

Дані цього дослідження дають основу вважати, що цілісність зв'язків з структурами проміжних відділів ВЛВДМ необхідна для підтримання більш високочастотного режиму діяльності генераторних структур бульбарної респіраторної мережі. Результати проведених експериментів свідчать про те, що у підтриманні респіраторного ритму проміжні відділи ВЛВДМ у новонароджених тварин грають більш істотну роль у порівнянні з ЧІМСП 4-5-денних щурят. Як свідчать результати роботи, одним з нейромедіаторних механізмів, що забезпечують підтримання досить високочастотного і стабільного режиму діяльності бульбарної респіраторної мережі, є серотонінергічні впливи проміжних відділів ВЛВДМ, опосередковані активацією 5-HT₂-серотонінових рецепторів. Вони більш виражені у 4-5-денних щурят у порівнянні з одноденними. Між тим ростральні відділи ВЛВДМ надають тонічний гальмівний опосередкований μ -опіоїдними рецепторами вплив на бульбарні механізми генерації дихального ритму. Це гальмування більш істотно виражено у новонароджених щурят у порівнянні з таким у 4-5-денних тварин. Можливо, що більш потужне тонічне опіоїдергічне гальмування з боку ростральних відділів ВЛВДМ у новонароджених тварин у порівнянні з таким у більш зрілих щурят має визначену функціональну доцільність. Воно, імовірно, приймає участь у гальмуванні дихальної активності плода і тим самим перешкоджає попаданню навколоплідних вод у його повітряносні і дихальні шляхи безпосередньо перед народженням і в його момент (Jansen, Chernick, 1983).

Результати роботи також свідчать, по-перше, про більш стійкий характер респіраторних реакцій у відповідь як на ко-

ротючасну, так і на тривалу гіпоксію у новонароджених тварин у порівнянні з таким у 4-5-денних, а, по-друге, дають підставу для припущення про більш каудальну локалізацію гаспінггенеруючих структур довгастого мозку відносно до ейпногенеруючих.

У роботі також виявлено, що частота розрядів респіраторних нейронів у 4-5-денних ЧІМСП достовірно вище, а її дисперсія значно нижче у порівнянні з аналогічними показниками у препаратів новонароджених тварин. Пригнічення частоти розрядів преінспіраторних і експіраторних нейронів протягом фази інспірації було значно менше вираженим у новонароджених ЧІМСП у порівнянні з таким у 4-5-денних препаратів. Слід також відзначити виявлену тенденцію трансформації патерна розрядів більшості преінспіраторних нейронів з біфазного, що має два частотних максимуми - преінспіраторний і постінспіраторний у новонароджених тварин, на монофазний, що має один преінспіраторний частотний максимум у 4-5-денних щурят. Можливо, що даний факт може лежати в основі пояснення того, чому у дорослих тварин виявляються тільки монофазні преінспіраторні нейрони (Cohen, 1979; Long, Duffin, 1984; Bianchi et al. 1995). Не виключено, що основною причиною даного феномену може слугувати формування реципрокних синаптичних відносин між елементами респіраторної мережі.

Дослідження пейсмейкерних властивостей респіраторних нейронів до дії розчину зі знизеним вмістом іонів Ca^{2+} , який надійно блокує синаптичну передачу, показало, що найбільш стійкими з них є преінспіраторні нейрони щурят першого дня життя. Менше стійкими виявились експіраторні нейрони. Виявлено, що обидва типи цих нейронів мали меншу стійкість до

нестачі Ca^{2+} в середовищі у 4-5-денних тварин у порівнянні з аналогічними одиницями ЧІМСП новонароджених щурят. Що стосується інспіраторних нейронів тварин обох груп, то стійкість даних одиниць до дії тестуючого розчину виявлена не була. Між тим виявилось, що більшість преінспіраторних нейронів під час дії розчину зі знизеним вмістом іонів Ca^{2+} проходить фазу нерегулярної, а більшість експіраторних - фазу відносно високочастотної регулярної тонічної активності. Це може вказувати на розгальмовування даних нейронів внаслідок усунення реципрокних синаптичних впливів в умовах дефіциту Ca^{2+} в середовищі. Ці результати знаходяться у певній відповідності з даними Онімару (Onimaru, Homma, 1987; Onimaru et al. 1989) та Ді Паскуале (Di Pasquale et al. 1994), що виявили високу стійкість преінспіраторних неронів до дефіциту Ca^{2+} у повністю ізольованих медулоспинальних препаратів щурят перших 4-х днів життя. Результати цього дослідження, що виявили більш стійкий характер розрядів преінспіраторних нейронів ЧІМСП новонароджених щурят у середовищі зі знизеним вмістом іонів Ca^{2+} , дають основу на користь припущення щодо "підтримуючої" ролі преінспіраторних нейронів відносно до ще недостатньо сформованої респіраторної мережі у тварин першого дня життя. На користь цього припущення свідчить також виявлене нами неповне відновлення респіраторної активності у ЧІМСП новонароджених щурят після попередньої двосторонньої електрокоагуляції зони розташування преінспіраторних нейронів. Між тим необхідно відзначити, що частина експіраторних нейронів, яка має пейсмейкерно-подібні властивості, також може вносити свій певний внесок у підвищення надійності функціонування респіраторної мережі у тварин першого дня життя. На

це, зокрема, вказує робота, згідно якої у щурят гальмівні синапси між респіраторними нейронами починають функціонувати до 4-6 дня життя (Schweitzer et al. 1992).

Виявлені ефекти стимуляції зон розташування преінспіраторних нейронів можуть також свідчити на користь існування медулярного механізму перемикування фази видиху на фазу вдиху.

Таким чином, можна дійти висновку, що бульбарні механізми генерації дихального ритму у щурят протягом перших п'яти днів життя підвладні досить складним змінам, спрямованим на стабілізацію їх роботи і, імовірно, пов'язаним з переходом у нові умови існування організму і адаптації до них.

ВИСНОВКИ.

1. У досліджах на штучно суперфузованих частково ізольованих медулоспинальних препаратах щурят перших п'яти днів життя показано, що в ідентичних умовах експерименту у одноденних щурят частота інспіраторних розрядів у n.phrenicus та їх інтегральна інтенсивність значно нижче аналогічних показників чотирьох-п'ятиденних.

2. Виявлено, що у частково ізольованих медулоспинальних препаратів новонароджених щурят активність системи опіоїдергічного контролю механізмів респіраторного ритмогенезу перевищує таку у чотирьох-п'ятиденних, у той час як серотонінергічні впливи, які, імовірно, підтримують стабільність рівню абудженості респіраторної мережі, більш виражені у останніх.

3. Доведено, що респіраторна активність, яка генерується частково ізольованими медулоспинальними препаратами щурят перших днів життя, з ейноеподібною, у той час як розвиток гаспінгподібною активності спостерігається тільки в умовах три-

валої гіпоксії.

4. Дослідження впливу гіпоксії на респіраторну активність частково ізольованих медулоспинальних препаратів виявили більш стійкий характер респіраторних реакцій на гіпоксію у новонароджених тварин у порівнянні з такими у 4-5-денних, а також дали підставу для припущення того, що гаспінггенеруючі структури вентролатеральних відділів довгастого мозку мають більш каудальну протяжність у порівнянні з ейпноегенеруючею системою нейронів.

5. Частота розрядів медулярних респіраторних нейронів у препаратів чотирьох-п'ятиденних щурят достовірно перевищує таку у новонароджених, а пригнічення частоти розрядів експіраторних і преінспіраторних нейронів під час інспіраторної фази менше виражено у останніх, що може свідчити про визначену морфофункціональну незрілість респіраторної мережі у тварин першого дня життя.

6. Більшість преінспіраторних нейронів частково ізольованих медулоспинальних препаратів новонароджених щурят мають два частотних максимумів - преінспіраторний і постінспіраторний, у той час як у більшості аналогічних нейронів 4-5-денних щурят був тільки один преінспіраторний максимум. Основою даного феномену може бути поступове формування реципрокних синаптичних відносин між елементами респіраторної мережі, спрямованих на гальмування активності преінспіраторних нейронів у фазі інспірації.

7. Стимуляція зони розташування преінспіраторних нейронів викликала інспіраторну відповідь у *n.phrenicus* при нанесенні стимулу тільки протягом другої половини міжінспіраторної паузи, що може свідчити на користь існування медулярного меха-

нізму перемикання фази видиху на фазу вдиху.

8. Дослідження пейсмеркерних властивостей респіраторних нейронів на основі їх стійкості до дії розчину, який блокує синаптичну передачу, показало, що найбільш стійкими з них є преінспіраторні і експіраторні нейрони щурят першого дня життя. Менш стійкими виявились аналогічні нейрони 4-5-дочних щуренят, у той час як інспіраторні нейрони такою стійкістю не володіли. Це може вказувати на важливу роль пейсмеркерних механізмів у генерації респіраторного ритму у новонароджених тварин.

9. У результаті відділення шляхом поперечних перерізків і ефектів електрокоагуляції дільниць вентролатеральної області доовгастого мозку, які містять преінспіраторні нейрони, виявлено неповне відновлення респіраторної активності у частково ізольованих медулоспинальних новонароджених щурят, у той час як у препаратів чотирьох-п'ятиденних тварин респіраторна активність відновлялась у всіх без винятку випадках. Це може свідчити про важливу роль зони розташування преінспіраторних нейронів у механізмах генерації респіраторного ритму у тварин першого дня життя.

ПЕРЕЛІК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Voitenko L.P., Osadchenko I.A., Marchenko V.A., Preobrazhensky N.N., Sushko B.S. Comparative anatomy of rats medullar respiratory nuclei in postnatal development // Tea. межд. конфер. Rythmogenesis, Plasticity: Advantages and limits of new experimental approaches in Neurobiology (Marseille, 1994). - P. 61.
2. Марченко В.А., Феник В.Б., Преображенский Н.Н., Середенко

М.М. Респираторная активность в диафрагмальном нерве частично изолированного медулло-спинального препарата мозга новорожденных крысят // *Нейрофизиология*. - 1995. - Т. 27, N 5/6. - С. 387-395.

3. Марченко В.А., Феник В.Б., Преображенский Н.Н., Середенко М.М. Роль опиоидергической и серотонинергической системы вентролатеральных отделов продолговатого мозга в регуляции респираторной активности у крысят раннего возраста // *Нейрофизиология*. - 1996. - Т. 28, N 1. - С. 62-73.

4. Марченко В.А. Влияние гипоксии на респираторную активность, генерируемую частично изолированными медуллоспинальными препаратами крысят раннего возраста // *Нейрофизиология*. - 1996. - Т. 28, N 2/3. - С.121-131.

5. Марченко В.А., Феник В.Б., Войтенко Л.П., Осадченко И.А. Характеристики разрядов респираторных нейронов вентролатеральных отделов продолговатого мозга у крысят раннего возраста // *Нейрофизиология*. - 1996. - Т. 28, N 4/5. - С.107-117.

6. Марченко В.А. Респираторна активність у діафрагмальному нерві частково ізольованого штучно суперфузованого медулло-спинального препарату новонароджених шурів (in situ) // *Тези доп. II конгресу патофізіологів України (Київ, 1996)*. - *Фізіол. журн.* - 1996. - Т. 42, N 3/4. - С. 73.

Marchenko V.A. Investigation of the medullary formation of respiratory rhythm. The dissertation (manuscript) is presented in accordance with requirements for the degree of candidat of medical sciences in the speciality 14.03.03. - *Normal Physiology*. A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1997.

We have studied respiratory activity generated by artificially superfused *in situ* semi-isolated medullo-spinal preparation of newborn (1-day-old) and 4- to 5-day-old rats. It was discovered that medullary respiratory rhythm generating mechanism is under tonic opioidergic inhibitory and serotonergic excitatory control in the first days of life. It was shown that preinspiratory neurons of the newborn rats are more resistant to the synaptic blocking Ca^{2+} -low-containing solution than others units and consequently have pacemaker peculiarities. Moreover, results show that in newborn animals the retrofacial region containing preinspiratory neurons play a more important role in the support of respiratory rhythm. The results allow us to conclude that the level of maturity of morphofunctional organization of medullary respiratory networks considerably differs in newborn and older animals.

Марченко В.А. Исследование медуллярных механизмов формирования дыхательного ритма. Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - нормальная физиология. Институт физиологии им. А.А.Вогомольца НАН Украины, Киев, 1997.

Исследовали респираторную активность искусственно суперфузируемого *in situ* частично изолированных медулоспинальных препаратов новорожденных (1-й день жизни) и 4-5-дневных крысят. Показано, что центральные механизмы генерации дыхательного ритма у животных первых дней жизни жизни находятся как под тормозным опиоидергическим так и под возбуждающим серотонинергическим контролем. При исследовании пейсмеркерных свойств респираторных нейронов, выявлено, что наибольшей устойчивостью к раствору с низким содержанием Ca^{2+} , блокирующим синаптическую передачу, обладают преинспираторные нейроны у новорожденных крысят. Показано, что ретрофациальная зона продолговатого мозга, содержащая преинспираторные нейроны, имеет важное значение для поддержания генерации респираторного ритма у животных 1-го дня жизни. Сделан вывод о существенном отличии степени зрелости и морфофункциональной организации медуллярной респираторной сети у животных разного возраста.

Ключові слова: респираторна мережа, пейсмеркерні механізми, гіпоксія, опіоїди, серотонін, нейрон, синапс.

АВ 37.089

Підп. до друку 21.02.96 Формат 60x84/16 Папір *світлий* Друк. офс.
Друк. офс. Умовн. друк. арк. 14 Обл. вид. арк. Тир. 100
Зам. 6-0781

Київська книжкова друкарня наукової книги, Київ, Б. Хмельницького, 19.