

На правах рукописи

ОРЛОВА Анастасия Олеговна

**РОЛЬ И МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ БОЛЬШОГО ЯДРА СРЕДИННОГО ШВА
В РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ**

03.03.01 – физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САМАРА – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева», **Инюшкин Алексей Николаевич**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, заведующий лабораторией общей патологии кардио-респираторной системы, ФГБНУ "НИИОПП", **Тараканов Игорь Анатольевич**

кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», **Миняева Арина Владимировна**

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО "Башкирский государственный университет", биологический факультет.

Защита диссертации состоится «17» мая 2018 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 001.008.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина», по адресу: г. Москва, ул. Моховая, дом 11, строение 4.

С диссертацией можно ознакомиться в ФГБНУ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина и на официальном сайте <http://nphys.ru/>

Автореферат разослан « » _____

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 001.008.01,

кандидат биологических наук,

Кубряк Олег Витальевич



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Исследование ритмогенеза и центральных механизмов регуляции дыхания являются важнейшими направлениями в физиологии дыхания [Меркулова, 2001; Якунин и соавт., 2003; Onimaru et al., 2003; Verner et al., 2004; Александрова, 2004, 2007; Инюшкин, 2005, 2006; Бреслав, 2005; Пятин и соавт., 2005; Сафонов, 2006, 2007; Ковалев и соавт., 2011; Алиев и соавт., 2012; Ведясова и соавт., 2012].

Основная роль функциональной системы дыхания заключается в поддержании ряда важнейших гомеостатических констант: напряжения кислорода, углекислого газа и pH артериальной крови. Процессы, протекающие на разных уровнях дыхательной системы, обеспечивают его оптимальное состояние в тех или иных условиях, в том числе в стрессовых состояниях [Перцов С.С. и соавт., 2011; Судаков К.В. и соавт., 2011]. Координация этих процессов осуществляется структурами центральной нервной системы. Благодаря наличию афферентных проекций от многочисленных структур мозга к дыхательному центру, оказывающих модулирующее влияние на его деятельность, обеспечивается адаптация дыхания к разнообразным меняющимся внутренним и внешним факторам среды организма [Nichols et al., 2014; Subramanian et al., 2014]. Особый интерес в этом плане представляет изучение функций большого ядра срединного шва [Hornung, 2003; Maseko, 2007; Stamp, 1995; Pearlstein et al., 2005; Silva et al., 2007; Pilowsky, 2014].

Большое ядро условно делят на две части – рostrальную и каудальную. Нервные клетки обеих частей физиологически и анатомически гетерогенны [Cordero et al., 2001]. Среди них наиболее широко представлены серотонинергические нейроны, однако, здесь также находятся нейроны, продуцирующие γ -аминомасляную кислоту, аминоксусную кислоту, вещество P, глутамат, тиролиберин, лейцин-энкефалин и энкефалин- α -амино- γ -метилтиомаляную кислоту [Leger et al., 1986; Ohta et al., 1995; Mazzone et al., 1998; Serrats et al., 2003, 2005; Cao et al., 2006]. Известно также, что каудальная область содержит меньше серотонинергических клеток, чем рostrальная.

Каудальная часть большого ядра дает начало нисходящим серотонинергическим и не-серотонинергическим проекциям к спинному мозгу, в то время как рostrальная область по-

сылают восходящие проекции к переднему мозгу и гипоталамусу. Разнообразие рецепторов и их пространственного распределения на различных нейронах способствует более тонкой координации активности тех или иных клеток большого ядра [Kocsis et al., 2006; Harsing, 2006]. Активация ГАМКергических нейронов ингибирует серотонинергическую систему и уменьшает интенсивность круговорота серотонина в большом ядре [Inyushkin et al., 2010]. Обратное взаимодействие между серотонин- и ГАМКергическими нейронами осуществляется при участии пре- и постсинаптических 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, ГАМК_A- и ГАМК_B-рецепторов [Bagdy et al., 2000]. Следует отметить специфическую чувствительность серотонинергических клеток к P_{CO2} и pH, при воздействии которых на большое ядро возникают соответствующие дыхательные реакции [Corcoran et al., 1993; Hosogai et al., 1998; Lindsey et al., 1998; Hodges et al., 2004; Taylor et al., 2005; Teran et al., 2014; Mosher, 2014; Hawkins et al., 2015]. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные являются доказательством того, что большое ядро – важная структура в механизмах регуляции дыхания [Taylor, 1982; Nucci et al., 2004; Ribas-Salgueiro et al., 2005].

Степень разработанности темы. Многие аспекты участия большого ядра в регуляции дыхания остаются недостаточно изученными. Так, отсутствуют данные по изучению влияния параметров стимуляции большого ядра шва на респираторные показатели; не исследована сравнительная роль роstralных и каудальных отделов большого ядра в реализации дыхательных реакций в данных экспериментальных условиях. Между тем известно о том, что респираторные реакции на химическое или электрическое раздражение большого ядра имеют противоположный характер [Vago et al., 2002; Serrats et al., 2003, 2005]. В связи с этим особого внимания заслуживают механизмы взаимодействия ГАМКергических и серотонинергических и элементов данной структуры. Это определило цель и задачи исследования.

Цель и задачи исследования: целью работы явилось изучение роли и физиологических механизмов участия большого ядра в регуляции дыхания.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить изменение показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности диафрагмы и наружных межреберных мышц в условиях электростимуляции большого ядра током различной частоты и силы.

2. Сравнить изменения показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности диафрагмы и наружных межреберных мышц в условиях электростимуляции каудальной и ростральной областей большого ядра.

3. Изучить изменения показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности диафрагмы и наружных межреберных мышц в условиях электростимуляции каудальной и ростральной областей большого ядра током различной частоты и силы после токсического действия глутамата на данные области.

4. Исследовать влияние электростимуляции каудальной и ростральной областей большого ядра на проявление рефлекса Геринга-Брейера.

5. Исследовать изменения показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц в условиях электростимуляции ростральной области большого ядра на фоне локального действия на нее γ -аминомасляной кислоты.

6. Определить характер изменений показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц в условиях электростимуляции ростральной области большого ядра на фоне локального действия на нее ГАМК-блокатора – габазина.

Научная новизна работы. В данной работе впервые проведен сравнительный анализ респираторных реакций, обусловленных локальной электростимуляцией двух точек большого ядра в каудальной и двух точек в ростральной его областях широким диапазоном частот и силы тока. Впервые выявлены различия в респираторных эффектах при электростимуляции каудальных и ростральных точек большого ядра. Более выраженные и статистически значимые дыхательные реакции зарегистрированы при стимуляции ростральных точек большого ядра.

Получены новые данные, свидетельствующие о том, что важным механизмом участия большого ядра срединного шва в регуляции дыхания является модуляция рефлекса Геринга-Брейера, преимущественно, в виде стимуляции последнего.

Результаты нашего исследования позволили впервые провести анализ роли γ -аминомасляной кислоты в модулирующем влиянии большого ядра на деятельность дыхательного центра и регуляцию дыхания. В частности, установлено наличие тонического модулирующего влияния большого ядра на функцию дыхательного центра, реализующегося через ГАМК_A-рецепторы.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные в работе данные о важной роли большого ядра в регуляции дыхания имеют важное значение в плане расширения существующих представлений о механизмах деятельности дыхательного центра и его взаимодействия с другими структурами центральной нервной системы. Большое ядро является частью серотонинергической системы. Одновременно здесь продуцируется множество

других нейротрансмиттеров, вовлекаемых в дыхательный контроль. Результаты проведенных нами исследований позволяют сделать заключение о том, что различия в направленности и выраженности респираторных реакций, возникающих при воздействии на структуры большого ядра, могут быть связаны с нейрхимическим разнообразием нейронов, входящих в его состав.

Известно, что нарушение работы серотонинергической системы является одной из причин синдрома внезапной смерти младенцев. Полученные данные об особенностях модулирующего влияния большого ядра шва на центральные механизмы регуляции дыхания открывают перспективы целенаправленной фармакологической коррекции дыхательных нарушений при данном заболевании.

Методология и методы диссертационного исследования. В исследовании было использовано 120, подходящих по массе, животных, по 6 особей в каждой из групп серий опытов. Методики исследования подобраны корректно и соответствуют нормам биоэтики.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Электростимуляция большого ядра приводит к снижению амплитудных параметров внешнего дыхания и, в отдельных случаях, к повышению частотных параметров.

2. Выраженность и направленность респираторных реакций на электростимуляцию большого ядра шва существенно зависит от параметров электрического стимула и координат точки, подвергшейся стимуляции, при этом наиболее выраженные реакции отмечаются при воздействии на ростральную часть ядра.

3. Токсическое воздействие глутамата на большое ядро приводит к угнетению дыхания.

4. Важным механизмом участия большого ядра шва в регуляции дыхания является модулирующее влияние на выраженность рефлекса Геринга-Брейера, преимущественно проявляющееся в его стимуляции.

5. В реализацию участия большого ядра шва в регуляции дыхания непосредственно вовлечены элементы серотонинергической и ГАМКергической нейромедиаторных систем.

6. ГАМК_A рецепторы участвуют в реализации тонического влияния большого ядра на дыхательный центр.

Достоверность полученных результатов определяется использованием достаточной выборки во всех сериях эксперимента и применением статистической обработки результатов с помощью программного пакета «SigmaStat 3.1» [Jandel Scientific, USA]. Статистически значимыми считали изменения со значениями $p < 0,05$.

Апробация работы. Материалы работы доложены и обсуждены:

На I молодежной научной конференции «Актуальные проблемы экологии Волжского бассейна» (Тольятти, 2007); на X Всероссийской Школе-семинаре с международным участием «Экспериментальная и клиническая физиология дыхания» (Санкт-Петербург, 2007); на V Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения В.Н. Черниговского «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2007); на XXXIII, XXXVII, XXXX научных конференциях молодых ученых и специалистов Самарского государственного университета (Самара, 2008, 2012, 2015); на XIII Всероссийской школе-семинаре с международным участием «Вопросы экспериментальной и клинической физиологии дыхания» (Санкт-Петербург, 2016).

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, включая 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК. Одна из этих публикаций издана в журнале, рецензируемом SCOPUS.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа, изложенная на 185 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех экспериментальных глав, обсуждения результатов, выводов, списка сокращений, списка литературы, приложения. Библиографический указатель включает 320 источников, в том числе 226 на иностранном языке. Работа содержит 49 таблиц, иллюстрирована 82 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 120 взрослых белых нелинейных крысах обоего пола, массой 180-250 г. Животных наркотизировали уретаном («Sigma») 1,5 г/кг внутрибрюшинно. Электростимуляцию большого ядра производили биполярным концентрическим электродом (диаметр кончика 100 мкм). Использовали электрический ток с параметрами 30 и 50 Гц; 9, 11, 13 и 15 В. Время стимуляции составляло 5 с. По окончании эксперимента выполняли гистологический контроль локализации точки стимуляции по методу Елисеева и соавт. [1967]. Регистрацию паттерна дыхания осуществляли методом спирографии, определяли дыхательный объем (V_T , мл), длительность дыхательного цикла (T_T , с), длительность инспираторной (T_i , с) и экспираторной (T_e , с) фаз дыхательного цикла, рассчитывали частоту дыхания (f , мин⁻¹) по формуле: $f = 60 / T_T$; минутный объем дыхания (V , мл/мин) по формуле: $V = f * V_T$ [Бреслав, 1981]. Биоэлектрическую активность диафрагмы и наружных межреберных мышц регистрировали с помощью биполярных игольчатых электродов диаметром 150 мкм и межэлектродным расстоянием 3 мм. На электромиограммах определяли максимальную амплитуду осцил-

ляций (отн. ед.) в залпах активности [Evanich et al., 1976]. В данной работе был использован метод стереотаксических микроинъекций. В качестве контроля применяли искусственную цереброспинальную жидкость. Растворы инъецировали при помощи микрошприца МШ-1 через микропипетку (диаметр кончика 20-30 мкм). Вещества растворяли *ex tempore* в искусственной цереброспинальной жидкости и вводили в объеме 0,5 мкл со скоростью около 0,1 мкл/с. Для изучения влияния электростимуляции большого ядра на выраженность рефлекса Геринга-Брейера проводили тест с раздуванием лёгких в начале выдоха четырьмя различными уровнями избыточного давления воздуха: 5,0; 7,5; 10,0 и 12,5 см вод. ст. Оценку выраженности данного рефлекса на электромиограмме диафрагмы определяли по величине нормализованной продолжительности выдоха, которую рассчитывали отдельно для каждого теста как отношение длительности выдоха при раздувании легких к длительности выдоха в исходном состоянии ($T_E \text{ norm.} = T_E \text{ infl.} / T_E \text{ init.}$). $T_E \text{ init.}$ рассчитывали как среднюю арифметическую продолжительности выдоха в 7 циклах, предшествующих раздуванию легких. Статистическую обработку данных производили с помощью программного пакета «SigmaStat 3.1» (Jandel Scientific, USA). Статистически значимыми считали изменения со значениями $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изменения паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц при электростимуляции большого ядра срединного шва

В настоящей работе представлены экспериментальные данные об изменениях паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц, наблюдавшихся при различных режимах электрической стимуляции ростральных (точка 1 и точка 2) и каудальных (точка 3 и точка 4) отделов большого ядра (частота тока 30 Гц и 50 Гц; сила стимула 9 В, 11 В, 13 В и 15В) наркотизированных крыс.

Электростимуляция точки 1 (P – 9,8; L – 0; V – 10,2 мм относительно bregma) большого ядра как током частотой 30 Гц, так и током частотой 50 Гц, вызывала укорочение вдоха. Максимальные сокращения продолжительности инспирации на 16,7% ($p < 0,01$) и 19,1% ($p < 0,01$) были зарегистрированы при использовании тока частотой 50 Гц и силы стимула 13 В и 15 В (Рисунок 1 А). Было отмечено уменьшение дыхательного объема максимально на 24,5% ($p < 0,05$) под действием тока частотой 50 Гц и силой стимула 15 В (Рисунок 1 Б). При

этом минутный объем дыхания максимально уменьшался на 18,9% ($p>0,05$) при электростимуляции током частотой 50 Гц и силой стимула 15 В, но это изменение было статистически не значимым.

Наиболее выраженные снижения максимальной амплитуды осцилляций в залпах активности диафрагмы на 15,3% ($p<0,01$) зарегистрированы в условиях применения тока частотой 30 Гц и силы стимула 13 В и на 16,2% ($p<0,01$) при силе стимула 15 В. Максимальная амплитуда осцилляций интеркостальных мышц более выражено уменьшалась на 19,0% ($p<0,01$) и 21,5% ($p<0,01$) в условиях применения тока частотой 50 Гц и силы стимула 13 В и 15 В.

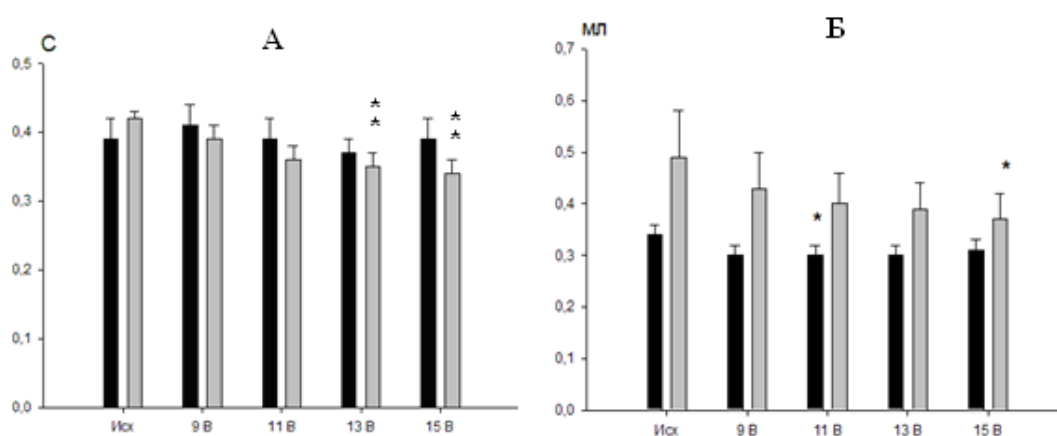


Рисунок 1. Изменение длительности вдоха (А) и дыхательного объема (Б) при электростимуляции точки 1 большого ядра (черные столбики – ток частотой 30 Гц; серые – 50 Гц); * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$

Стимуляция точки 2 большого ядра (P – 10,3 ; L – 0; V – 9,9 мм относительно bregma) электрическим током частотой 50 Гц приводила к максимальному статистически значимому сокращению длительности инспирации на 23,9% ($p<0,01$) при силе стимула 13 В и на 30,4% ($p<0,001$) при силе стимула 15 В (Рисунок 2 А). Дыхательный объем максимально уменьшался на 32,3% ($p<0,01$) в условиях воздействия тока частотой 30 Гц и силы стимула 15 В (Рисунок 2 Б). Минутный объем дыхания максимально уменьшался на 22,0% ($p>0,05$) при электростимуляции током частотой 30 Гц и 15 В, однако изменение не было статистически значимым. Максимальное укорочение выдоха в условиях раздражения точки 2 большого ядра током частотой 30 Гц и силой стимула 15 В происходило на 12,0% ($p<0,01$). При этих же характеристиках электрического тока максимальное увеличение частоты дыхания составило 14,9% ($p<0,001$). Наиболее выраженное статистически значимое снижение биоэлектрической активности диафрагмы имело место при воздействии тока частотой 50 Гц и силы стимула 15 В на 13,3% ($p<0,01$). Максимальная амплитуда осцилляций залпов активности наружных

межреберных мышц наиболее значительно уменьшалась при токе частотой 50 Гц и силе стимула 15 В на 14,8% ($p < 0,05$).

Электростимуляция точки 3 большого ядра (P – 10,8; L – 0; V – 10,1 мм относительно bregma) током частотой 50 Гц и силой стимула 15 В приводила к увеличению продолжительности инспирации максимально на 12,5% ($p < 0,001$). Дыхательный объем максимально снижался на 23,3% ($p < 0,001$) при использовании тока частотой 30 Гц и силой стимула 15 В. Минутный объем дыхания также выражено уменьшался при токе частотой 30 Гц и силе стимула 15 В на 18,9% ($p < 0,01$). При частоте тока 50 Гц и силе стимула 15 В длительность экспирации сокращалась на 17,9% ($p < 0,01$).

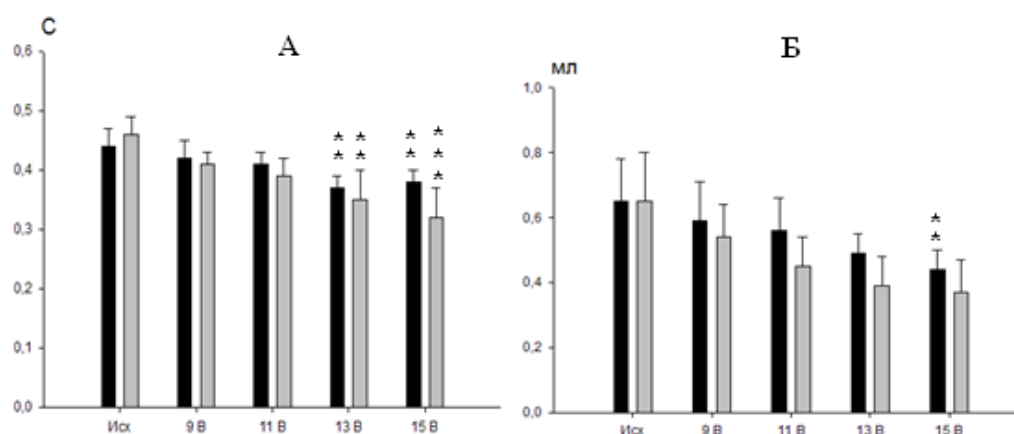


Рисунок 2. Изменение длительности вдоха (А) и дыхательного объема (Б) при электростимуляции точки 2 большого ядра (черные столбики – ток частотой 30 Гц; серые – 50 Гц); # – $p < 0,01$; † – $p < 0,001$

Максимальная амплитуда залповой активности диафрагмы при действии тока частотой 30 Гц и силы стимула 15 В максимально снижалась на 26,6% ($p < 0,001$; Рисунок 3 А). Данный параметр наружных межреберных мышц в условиях применения тока частотой 50 Гц и силы стимула 15 В наиболее выражено уменьшался на 17,6% ($p < 0,001$; Рисунок 3 Б).

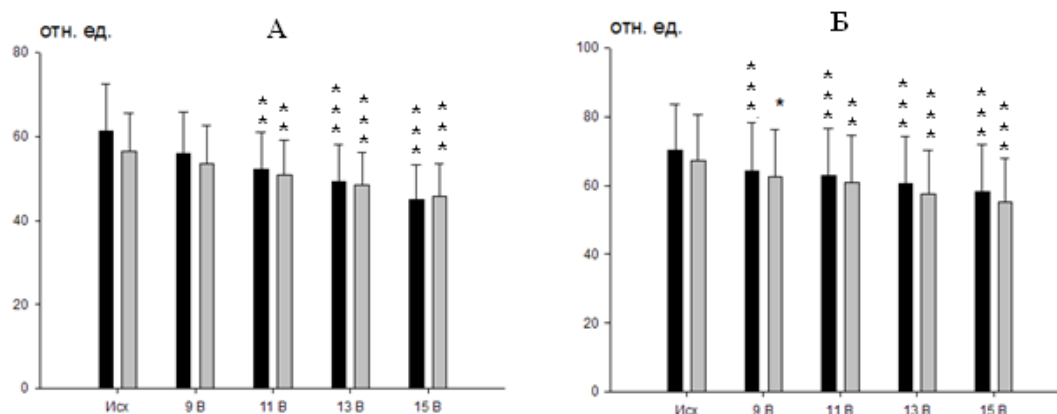
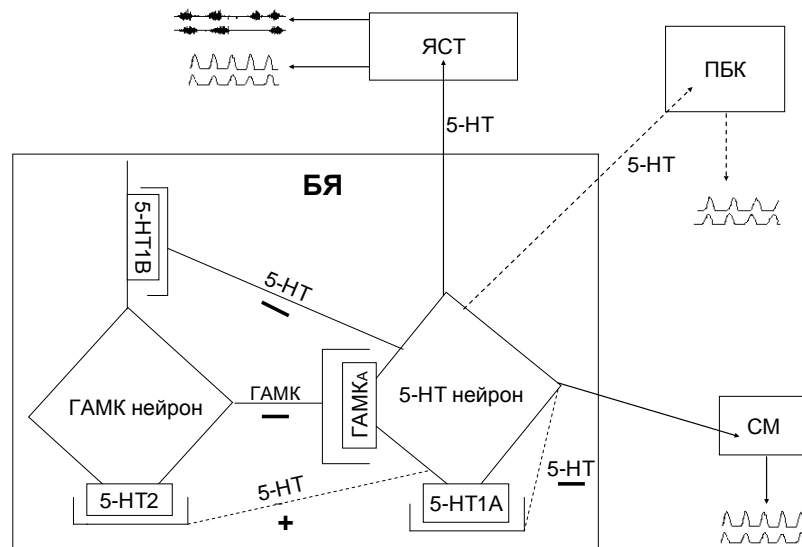


Рисунок 3. Изменение максимальной амплитуды осцилляций в залпах активности диафрагмы (А) и наружных межреберных мышц (Б) при электростимуляции точки 3 большого ядра (черные столбики – ток частотой 30 Гц; серые – 50 Гц); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

При электростимуляции точки 4 большого ядра (Р – 11,3; L – 0; V – 10,3 мм относительно bregma) током частотой 50 Гц и силой стимула 15 В дыхательный объем максимально снижался на 32,3% ($p < 0,01$). Минутный объем дыхания уменьшался на 37,5% ($p < 0,05$) при воздействии тока частотой 50 Гц и силой стимула 15 В. Максимальная амплитуда залповой активности диафрагмальной мышцы при действии тока частотой 30 Гц и силе стимула 15 В сокращалась на 31,3% ($p < 0,01$). Наиболее выраженное снижение значения аналогичного параметра наружных межрёберных мышц на 17,6% ($p < 0,001$) было зарегистрировано при электростимуляции током частотой 30 Гц и силой стимула 15 В.

Таким образом, в наших экспериментах при электростимуляции большого ядра были отмечены респираторные реакции, наиболее постоянной характеристикой которых, независимо от точки стимуляции в пределах ядра, оказалось снижение дыхательного объема и амплитуды активности инспираторных мышц. В то же время, изменения продолжительности дыхательных фаз определялись локализацией стимулирующего электрода в большом ядре. Так, стимуляция наиболее ростральной точки 1 закономерно приводила к удлинению вдоха, при смещении электрода в каудальном направлении, в точку 2 наряду с удлинением вдоха происходило укорочение выдоха. При дальнейшем перемещении места стимуляции в более каудальную точку 3 продолжительность вдоха, напротив, изменялась в сторону удлинения, а при стимуляции наиболее каудальной точки 4 изменений продолжительности вдоха не происходило вовсе. Итак, в зависимости от области стимуляции в пределах большого ядра шва можно было получить реакции временных параметров паттерна дыхания противоположного характера, что согласуется с данными литературы [Leger et al., 1986; Ohta et al., 1995; Serrats et al., 2003, 2005; Verner et al., 2004; Cao et al., 2006], описывающими неоднозначность модулирующего влияния большого ядра на дыхательную активность наркотизированных крыс. Различия в характере и выраженности дыхательных реакций на стимуляцию различных отделов большого ядра, обнаруженные в ходе нашего исследования, прежде всего, могут объясняться нейрохимической неоднородностью расположенных здесь нейронов, а также особенностями организации их эфферентных проекций. Анализируя результаты настоящей работы, стоит отметить обилие эфферентных связей большого ядра со структурами бульбарного дыхательного центра и пневмотаксической системы моста: с парабрахиальным ядром,

ядром Келликера-Фьюза, комплексом Бетцингера, комплексом пре-Бетцингера, вентральной и дорсальной дыхательными группами [Sim, 1992; Gang, 1995; Hornung, 2003]. Есть все основания предполагать, что данные связи принимали непосредственное участие в механизмах реализации наблюдавшихся реакций на электростимуляцию большого ядра. Известно, что использованная в наших экспериментах частота стимуляции (30 и 50 Гц) вызывает активное высвобождение из аксонных терминалей нейронов ядер шва, наряду с серотонином, его котрансмиттеров - субстанции P и тиролиберина [Bartfai, 1988; Arvidsson, 1994]. Также можно предположить, что снижение дыхательного объема было в определенной степени обусловлено ингибирующим влиянием прямых нисходящих проекций от нейронов большого ядра к мотонейронам диафрагмы (Рисунок 4), поскольку ранее было показано, что высоко-частотная электростимуляция большого ядра у кошек *in vivo* приводит к угнетению инспираторных разрядов в данной группе мотонейронов [Lalley, 1986].



Риснок 4. Схема предполагаемых механизмов реализации респираторных реакций, полученных в настоящей работе (БЯ – большое ядро, ЯСТ – ядро солитарного тракта,

ПБК – комплекс пре-Бетцингера, СМ – спинной мозг, 5-НТ – серотонин,

ГАМК – γ -аминомасляная кислота, «+»– активирование, «-» – ингибирование)

2. Изменения паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц при электростимуляции большого ядра срединного шва на фоне локального действия глутамата

С целью подтверждения предположения о том, что зарегистрированные респираторные эффекты при электростимуляции названных выше точек большого ядра обусловлены стимуляцией расположенных здесь нейронов и не связаны с активацией нервных волокон из других отделов центральной нервной системы, проходящих через область стимуляции, была проведена следующая серия экспериментов, в которой локальную электростимуляцию осуществляли на фоне предварительного введения в эти точки токсической концентрации глутамата – 3 мМ [Миронова, 2004].

Введение токсической концентрации глутамата в точки 1, 2, 3 и 4 большого ядра вызывало закономерные изменения всех исследованных нами показателей. Реакции проявлялись в увеличении продолжительности инспирации и экспирации, а также в уменьшении частоты дыхания, дыхательного объема, минутного объема дыхания и снижении биоэлектрической активности дыхательных мышц.

При электростимуляции точки 1 большого ядра на фоне действия токсической концентрации глутамата большинство параметров паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности наружных межреберных мышц не изменялись. Исключение составило увеличение максимальной амплитуды осцилляций залповой активности диафрагмы, которое происходило в статистически значимых пределах от 7,4% до 9,8% ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$), при частоте тока как 30 Гц, так и 50 Гц и силе стимула 11 – 15 В.

Электрическое раздражение точки 2 большого ядра током частотой 30 Гц и различной силой стимула (9, 11, 13, 15 В) на фоне действия глутамата вызывало рост дыхательного объема с максимумом изменения на 26,4% ($p < 0,001$) при силе стимула 15 В. В этих же условиях проявилось максимальное увеличение минутного объема дыхания на 37,9% ($p < 0,001$). Под влиянием тока частотой 30 Гц и силы стимула 15 В на фоне применения глутамата максимальная амплитуда осцилляций залповой активности диафрагмы предельно увеличивалась на 13,6% ($p < 0,01$).

При электростимуляции точки 3 большого ядра на фоне действия токсической концентрации глутамата большинство параметров паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц не изменялись. Дыхательный объем максимально возрос на 17,0% ($p < 0,01$) в условиях применения тока частотой 30 Гц и силы стимула 11 В. Минутный объем дыхания максимально повышался на 18,5% ($p < 0,05$) в режиме применения тока частотой 30 Гц и силы стимула 15 В.

При электростимуляции точки 4 большого ядра на фоне действия токсической концентрации глутамата практически все параметры паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц не изменялись. Исключением явилась продолжи-

тельность инспирации, которая увеличивалась в условиях применения тока частотой 30 Гц и силы стимула 11 В на 6,5% ($p < 0,001$).

В контрольных наблюдениях микроинъекции искусственной ЦСЖ в точки 1, 2, 3 и 4 большого ядра не вызвали закономерных и статистически значимых изменений исследуемых показателей паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц.

Итак, после воздействия токсической концентрации глутамата, которая, как известно, разрушает нервные клетки, электростимуляция изучаемых нами участков большого ядра в ряде случаев приводила к слабым изменениям некоторых показателей паттерна внешнего дыхания и амплитуды залпов электрической активности инспираторных мышц. При этом мы не наблюдали характерных признаков реакций на электрическую стимуляцию интактного большого ядра – сокращения времени вдоха, уменьшения дыхательного объема и снижения биоэлектрической активности инспираторных мышц, вероятно, по причине токсического разрушения тел нейронов большого ядра, которое практически прекращало его адекватное участие в регуляции дыхания.

3. Влияние электростимуляции большого ядра срединного шва на инфляционный рефлекс Геринга-Брейера

В настоящей серии экспериментов было изучено влияние электростимуляции (током частотой 50 Гц и силой стимула 15 В) ранее исследованных нами четырех точек большого ядра на выраженность рефлекса Геринга-Брейера. Тест проводили с раздуванием легких в начале выдоха четырьмя стандартными уровнями избыточного давления воздуха: 5,0; 7,5; 10,0 и 12,5 см вод. ст. в отсутствие (контрольная группа животных) и на фоне электростимуляции большого ядра с последующей регистрацией биоэлектрической активности диафрагмы для расчета нормализованной продолжительности выдоха. Раздувание легких в начале экспирации закономерно вызывало ее удлинение, как у контрольных животных, так и подвергшихся действию электрического тока. Несмотря на продолжающееся растяжение легочной ткани, наступала отставленная инспирация, с момента появления которой подача избыточного давления в легкие прекращалась и восстанавливалась физиологическая смена фаз дыхания. Время задержки вдоха в исследуемом нами диапазоне давления, как правило, находилось в прямой зависимости от величины последнего.

Раздувание легких на фоне электростимуляции точки 1 большого ядра приводило, преимущественно, к менее выраженному проявлению рефлекса Геринга-Брейера по сравнению с контрольной группой животных в условиях применения избыточного давления, равно-

го 7,5 см водн.ст.; 10,0 см водн. ст. и 12,5 см водн.ст., и максимумом ослабления реакции на 33,2% ($p < 0,001$) при давлении 12,5 см водн.ст. Исключение составило только применение давления 5 см водн. ст., при котором нормализованная продолжительность выдоха была больше контрольного значения на 32,9% ($p < 0,001$).

Эффекты, зарегистрированные в условиях воздействия на точки 2, 3 и 4 большого ядра, свидетельствуют о росте выраженности проявлений рефлекса при электростимуляции. Максимальная нормализованная продолжительность выдоха при рефлексе Геринга-Брейера на фоне электростимуляции точки 2 зарегистрирована при 5 см водн.ст. на 175,0% ($p < 0,001$), точки 3 – при 5 см водн.ст. на 24,6% ($p < 0,05$), точки 4 – при 7,5 см водн.ст. на 19,4% ($p < 0,001$).

Итак, электростимуляция большого ядра приводила к модуляции рефлекса Геринга-Брейера, главным образом, посредством увеличения нормализованной продолжительности выдоха. Возможно, в реализации данной реакции участвуют проекции большого ядра к ядру солитарного тракта. Есть все основания предполагать, что раздражение электрическим током большого ядра, в первую очередь, приводит к активации серотонинергических нейронов. Более выраженный эффект был отмечен при стимуляции током точки 2 большого ядра, как и в серии экспериментов с электрическим раздражением различных участков исследуемого ядра, что подтверждает такое предположение, так как роstralная часть ядра характеризуется большим количеством серотонинергических клеток по сравнению с каудальной областью. Таким образом, с одной стороны, происходило растяжение легких под действием избыточного давления воздуха, что активизировало медленноадаптирующиеся рецепторы и через блуждающий нерв возбуждение передавалось в ядро солитарного тракта I_□- и P-клеткам и благодаря этому фаза экспирации удлинялась [Bonham et al., 1993; Kubin et al., 2006], а с другой стороны – электростимуляция приводила к возбуждению серотонинергических нейронов, которые запускали другой механизм, приводивший к дополнительному увеличению продолжительности выдоха. Согласно данным других авторов, на рефлекс Геринга-Брейера могут оказывать влияние разнообразные нейротрансмиттеры, при этом в ядре солитарного тракта в реализации рефлекса могут принимать участие такие рецепторы как NMDA, SST и другие [Александров и соавт., 2012; Петряшин, 2013]. Вполне вероятно, что в данных экспериментальных условиях имело место сочетание различных механизмов взаимодействия серотонинергических нейронов с нейронами ядра солитарного тракта (Рисунок 4).

**4. Респираторные реакции на электростимуляцию
точки 2 большого ядра срединного шва до и после микроинъекции
γ-аминомасляной кислоты или габазина**

В данной серии экспериментов изучали реакции паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц наркотизированных крыс при действии электрического тока частотой 50 Гц и силы стимула 15 В на точку 2 большого ядра до и на фоне микроинъекции растворов γ -аминомасляной кислоты (10^{-5} М) или ГАМК_A-блокатора – габазина (10^{-5} М). Выбор точки воздействия электростимуляции был определен полученными в настоящем исследовании результатами о наиболее выраженном модулирующем влиянии на параметры дыхания электростимуляции именно этой точки большого ядра.

В ходе экспериментов установлено, что введение раствора γ -аминомасляной кислоты в точку 2 большого ядра приводит к изменению лишь одного из исследуемых параметров дыхания – увеличению максимальной амплитуды осцилляций залповой активности наружных межреберных мышц на 37,2% ($p < 0,01$). Микроинъекции искусственной цереброспинальной жидкости в точку 2 не вызывали статистически значимых изменений параметров биоэлектрической активности инспираторных мышц и показателей паттерна внешнего дыхания ($p > 0,05$).

Респираторные реакции, зарегистрированные при электростимуляции точки 2 большого ядра через 10 мин. после введения γ -аминомасляной кислоты, характеризовались статистически значимым снижением частоты дыхания на 4,9% ($p < 0,05$; Рисунок 5 А), увеличением минутного объема дыхания на 8,9% ($p < 0,05$; Рисунок 5 Б). Одновременно с этим происходило увеличение амплитуды осцилляций залпов активности наружных межреберных мышц на 10,4% ($p < 0,05$; Рисунок 5 В).

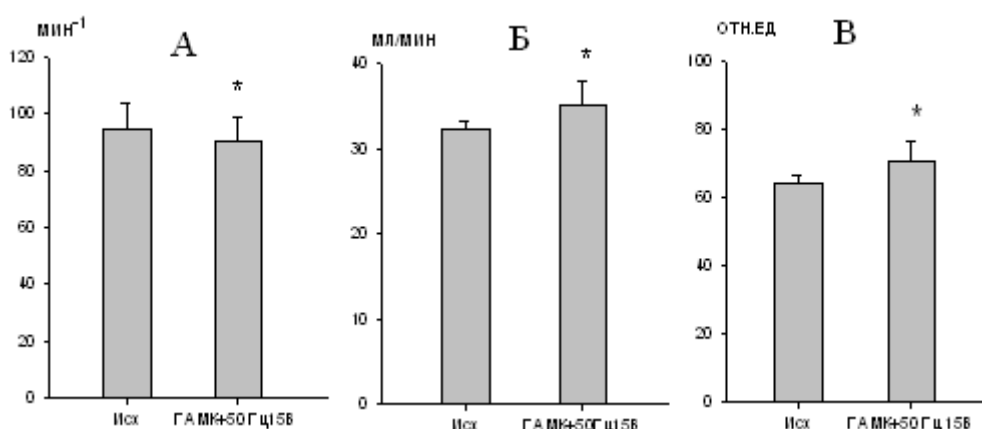


Рисунок 5. Изменение частоты дыхания (А), минутного объема дыхания (Б) и максимальной амплитуды осцилляций залповой активности наружных межреберных мышц (В) при электростимуляции точки 2 большого ядра (ток частотой 50 Гц и сила стимула 15 В) на фоне ГАМК (10^{-5} М); * – $p < 0,05$

С целью выяснения возможного участия ГАМК_A-рецепторов в реализации модуляции дыхательных реакций было изучено действие специфического антагониста ГАМК_A-рецепторов – габазина в точку 2 большого ядра на паттерн внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц при электростимуляции данной точки.

Нами установлено, что микроинъекции раствора (10^{-5} М) габазина в точку 2 большого ядра вызывали закономерные изменения ряда дыхательных параметров. Так, время инспирации уменьшалось на 14,3% ($p < 0,05$), продолжительность экспирации увеличивалась на 9,7% ($p < 0,05$), дыхательный объем снижался на 10,0% ($p < 0,05$). Максимальная амплитуда осцилляций наружных межреберных мышц снижалась на 45,8% ($p < 0,01$).

При электростимуляции точки 2 большого ядра через 10 мин. после микроинъекции габазина было зарегистрировано увеличение дыхательного объема на 16,0% ($p < 0,01$; рисунок 6 А), минутного объема дыхания на 13,9% ($p < 0,05$; Рисунок 6 Б). Одновременно отмечено усиление биоэлектрической активности наружных межреберных мышц на 11,6% ($p < 0,01$) и диафрагмы – на 9,3% ($p < 0,01$).

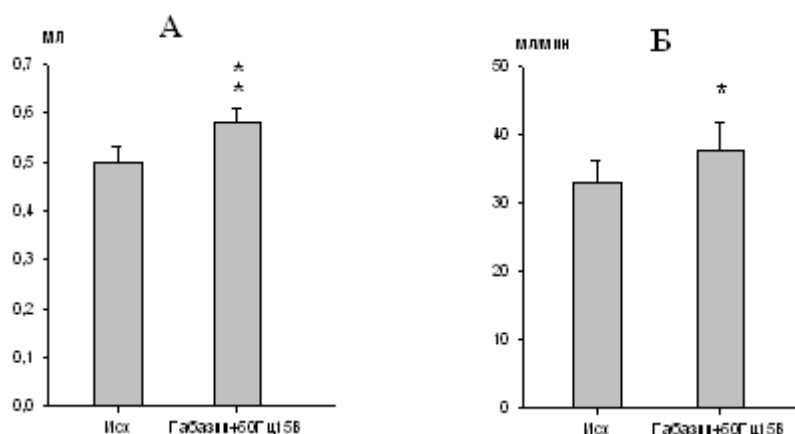


Рисунок 6. Изменение дыхательного объема (А) и минутного объема дыхания (Б) при электростимуляции точки 2 большого ядра (ток частотой 50 Гц и сила стимула 15 В) на фоне габазина (10^{-5} М); * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Микроинъекции γ -аминомасляной кислоты в большое ядро в наших экспериментах приводили к усилению биоэлектрической активности наружных межреберных мышц. При этом частотные характеристики внешнего дыхания оставались на исходном уровне. Возможно, это происходило за счет механизма торможения серотонинергических нейронов ГАМК-ергическими клетками через ГАМК_A-рецепторы (Рисунок 4), и таким образом мы наблюда-

ли реакцию, в целом, противоположную той, что была зарегистрирована при электростимуляции большого ядра.

Респираторные реакции, зарегистрированные при электростимуляции большого ядра на фоне введения γ -аминомасляной кислоты, характеризовались снижением частоты дыхания и увеличением минутного объема дыхания; одновременно возрастала максимальная амплитуда осцилляций залповой активности инспираторных мышц. В данной серии экспериментов мы наблюдали реакции паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц противоположные тем, что были зарегистрированы нами при электростимуляции большого ядра. Из этого следует, что при реализации дыхательных реакций в условиях электростимуляции большого ядра или микровведения в него γ -аминомасляной кислоты на фоне электростимуляции могут быть задействованы различные нейронные механизмы. Вместе с тем, тот факт, что биоэлектрическая активность наружных межреберных мышц увеличивалась на 37% ($p < 0,01$) после введения γ -аминомасляной кислоты и только на 10% ($p < 0,05$) после электростимуляции на фоне действия γ -аминомасляной кислоты, позволяет сделать предположение о возбуждении преимущественно серотонинергических нейронов при раздражении токком большого ядра, которые посредством рецепторов 5-HT_{1B} могут ингибировать ГАМКергические нейроны, и о том, что угнетение амплитудных и активация, в отдельных случаях, частотных параметров дыхания связана именно с действием серотонина. Наличие в большом ядре серотонина и γ -аминомасляной кислоты, а также большое разнообразие их рецепторов, которые могут использоваться и как авторецепторы, обуславливает возможность модуляции параметров внешнего дыхания в двух противоположных направлениях – угнетение амплитудных показателей и вместе с тем активация частотных параметров, или наоборот – повышение амплитудных параметров и понижение частотных. Учитывая тот факт, что серотонинергические нейроны богаты различными котрансмиттерами, которые также могут влиять на характер респираторной реакции при действии комплекса воздействующих факторов, а в данном случае при сочетании электростимуляции и микровведения γ -аминомасляной кислоты, можно предполагать участие котрансмиттеров – тиролиберина и вещества P в реализации наблюдавшихся реакций паттерна внешнего дыхания.

При электростимуляции большого ядра на фоне введения ГАМК_A блокатора – габазина мы наблюдали увеличение дыхательного объема, минутного объема дыхания, максимальной амплитуды осцилляций залповой активности диафрагмы и интеркостальных мышц. Активация ГАМК_A-рецепторов приводит к высвобождению γ -аминомасляной кислоты из аксонных терминалей [Bagdy et al., 2000; Harsing, 2006], действие же габазина, по всей видимости, приводило к угнетению активности ГАМКергических нейронов. Сопоставляя эти дан-

ные с описанными выше, можно отметить, что при выключении ГАМК_A-рецепторов, а тем самым и ГАМКергических нейронов из процесса модуляции дыхания, наблюдается ослабление биоэлектрической активности наружных межреберных мышц, а также уменьшение дыхательного объема. Учитывая результаты, полученные нами в предыдущих сериях эксперимента, мы могли ожидать эффекты сходные с таковыми при раздражении током интактного большого ядра, однако в данном случае направленность дыхательных реакций оказалась обратной. Возможно, это связано с активацией рецепторов 5-HT_{1A} и самоингибированием серотонинергических клеток, либо с возбуждением 5-HT₂-рецепторов, стимулирующих ГАМКергические интернейроны, которые подавляют активность серотонинергических клеток. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что на параметры внешнего дыхания на уровне большого ядра оказывают влияние как серотонинергические, так и ГАМКергические механизмы.

ВЫВОДЫ

1. Локальная электростимуляция большого ядра оказывает угнетающее влияние на механизмы регуляции глубины дыхания и, в отдельных случаях, активирующее – на механизмы генерации дыхательного ритма.

2. Характер и выраженность эффектов электростимуляции большого ядра определяются локализацией стимула в пределах ядра и параметрами стимуляции. Наиболее выраженные реакции отмечены при стимуляции ростральной части большого ядра, наименее выраженные – при стимуляции каудального отдела большого ядра.

3. Локальное токсическое воздействие глутамата на большое ядро приводит к угнетению дыхания, что указывает на исходное стимулирующее влияние большого ядра на дыхание.

4. Важнейшим механизмом модулирующего влияния большого ядра на деятельность дыхательного центра является стимуляция рефлекса Геринга-Брейера.

5. Влияние большого ядра на механизмы регуляции дыхания может осуществляться с вовлечением серотонинергических и ГАМКергических нейромедиаторных систем, взаимодействия между которыми могут обеспечивать разнообразные варианты респираторных реакций.

6. Блокада ГАМК_A-рецепторов большого ядра вызывает снижение дыхательного объема и изменение продолжительности фаз дыхательного цикла, что свидетельствует о нали-

чий тонического модулирующего влияния большого ядра на функцию дыхательного центра, реализующегося через ГАМК_A-рецепторы.

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Орлова А.О. Респираторные реакции в условиях электростимуляции большого ядра срединного шва крыс / А.О. Орлова, А.Н. Инюшкин // Вестник Самарского государственного университета. – Самара, 2007. – №8 (58). – С.182 – 190.

2. Инюшкин А.Н. Локальная ГАМКергическая модуляция активности серотонинергических нейронов большого ядра шва / А.Н. Инюшкин, Н.А. Меркулова, А.О. Орлова, Е.М. Инюшкина // Рос. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95. – № 7. – С. 750 – 761.

3. Орлова А.О. Модуляция респираторных реакций на электростимуляцию большого ядра срединного шва до и после микроинъекции габазина / А.О. Орлова // Вестник Самарского государственного университета. – 2013. – №6 (107). – С.196 – 200.

4. Орлова А.О. Модулирующее влияние ГАМК и габазина на респираторные реакции в условиях электростимуляции большого ядра срединного шва / А.О. Орлова, А.Н. Инюшкин // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2016. – №4. – С.152 – 159.

Публикации в сборниках и материалах конференций:

1. Орлова А.О. Влияние электростимуляции большого ядра шва на биоэлектрическую активность инспираторных мышц и паттерн дыхания / А.О. Орлова // Экологический сборник. Труды молодых ученых Поволжья. – Тольятти, 2007. – С. 114 – 118.

2. Орлова А.О. Реакции биоэлектрической активности инспираторных мышц и паттерна дыхания при электростимуляции большого ядра шва / А.О. Орлова, А.Н. Инюшкин // Вопросы экспериментальной и клинической физиологии дыхания. – Тверь, 2007. – С.166 – 172.

3. Орлова А.О. Реакции паттерна дыхания при электростимуляции большого ядра срединного шва у крыс / А.О. Орлова // Механизмы функционирования висцеральных систем. Тезисы докладов V Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100летию со дня рождения В.И. Черниговского. – СПб., 2007. – С. 226 – 227.

4. Орлова А.О. Влияние электростимуляции большого ядра срединного шва на биоэлектрическую активность инспираторных мышц / А.О. Орлова // «Биология XXI столетия». Материалы международной научной конференции. – Киев, 2007. – С. 320 – 322.

5. Орлова А.О. Биоэлектрическая активность инспираторных мышц при электростимуляции большого ядра срединного шва крыс / А.О. Орлова // Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Современные направления теоретических и прикладных исследований». – Одесса, 2007. – Т. 20 – С.32 – 35.

6. Орлова А.О. Реакции паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц на электростимуляцию большого ядра шва / А.О. Орлова, А.Н. Инюшкин // Тезисы докладов XX съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – М., 2007. – С.362.

7. Орлова А.О. ГАМКергическая модуляция дыхания при электростимуляции большого

ядра срединного шва // А.О. Орлова // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Современные достижения европейской науки - 2012». – София, 2012. – Т. 16. – С.59 – 61.

8. Орлова А.О. Модулирующее влияние электростимуляции большого ядра срединного шва на рефлекс Геринга-Брейера / А.О. Орлова // Материалы VIII международной научно-практической конференции. – Пшемысль, 2012. – Т. 18. – С. 23 – 25.

9. Орлова А.О. К вопросу об участии большого ядра срединного шва в механизмах регуляции внешнего дыхания / А.О. Орлова // Сборник научных работ VI межвузовской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. – Самара, 2016. – С.68 – 69.

10. Орлова А.О. К вопросу о модулирующем влиянии большого ядра срединного шва на респираторные реакции / А.О. Орлова, А.Н. Инюшкин // Ульяновский медико-биологический журнал. Приложение. Материалы XIII Всероссийской школы-семинара с международным участием. – Ульяновск, 2016. – № 4. – С.50 – 51.