

На правах рукописи

Тюрин Николай Леонидович

**РОЛЬ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВЕСТИБУЛЯРНОГО
КОМПЛЕКСА ЯДЕР В РЕГУЛЯЦИИ СПОНТАННОЙ РИТМИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА НОВОРОЖДЕННЫХ
КРЫС IN VITRO**

03.00.13 – физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Самара – 2009

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Пятин Василий Федорович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Якунин Валерий Ефимович;
доктор биологических наук, профессор
Ведясова Ольга Александровна

Ведущая организация: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
г. Санкт-Петербург

Защита состоится “ 14 ” октября 2009 года в 11 часов
на заседании диссертационного совета Д208.085.03 при ГОУ ВПО «Самарский
государственный медицинский университет Росздрава» по адресу: 443079,
г. Самара, пр. К. Маркса, 165 «Б».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ГОУ ВПО
«Самарский государственный медицинский университет Росздрава» по адресу:
443001 г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171.

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2009 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор

В.А. Кельцев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Период раннего постнатального онтогенеза характеризуется интенсивным развитием межнейронного взаимодействия внутри медуллярной респираторной сети, с одной стороны, и дыхательного центра с вышерасположенными структурами центральной нервной системы, с другой стороны (Liu, Wong-Riley, 2002; Paton, Richter, 1995; Shao, Feldman, 1997; Hilaire, Duron, 1999; Bou-Flores, Berger, 2001; St.John et al., 2002; Dutschmann, Paton, 2002; Onimaru, Homma, 2002; Elsen, Ramirez, 2005). Роль межнейронного взаимодействия между вестибулярным нейронным комплексом и стволовыми центрами регуляции вегетативных функций является ключевой в формировании механизмов контроля положения тела и головы в пространстве и в обеспечении вегетативных реакций при движении (Clarac et al., 1998; Barmack, 2003; Day, Fitzpatrick, 2005). В равной степени эта закономерность относится к взаимодействию между вестибулярной и сомато-вегетативной дыхательной системами.

Морфо-функциональное развитие нейронных структур вестибулярного ядерного комплекса, как и респираторной нейронной сети, происходит в период раннего постнатального онтогенеза путем формирования функции разных медиаторных систем. Как известно, именно при участии медиаторных систем осуществляются регулирующие и модулирующие синаптические влияния на дыхательный центр (Yamamoto et al., 1992; Ballanyi et al., 1997, 1999; Vincent et al., 2000; Murphy, du Lac, 2001; Sun et al., 2002; Puyal et al., 2002; Mellen et al., 2003; Takazawa et al., 2004; Gittis, du Lac, 2007; Eugene et al., 2007; Pascualetti et al., 2007). В современной литературе отсутствуют сведения о роли вестибулярного ядерного комплекса и его медиаторных систем в регулирующих и модулирующих синаптических воздействиях на дыхательный центр, в котором, как на ранних этапах постнатального онтогенеза, так и у взрослых животных, объектами синаптического влияния являются пейсмейкерные нейроны генератора дыхательного ритма и нейроны генератора инспираторного паттерна.

У взрослых животных межнейронное взаимодействие между вестибулярным комплексом и респираторной нейронной сетью вызывает два характерных ответа в изменении активности бульбарного дыхательного центра – стимуляция и угнетение ритмической дыхательной активности при изменении положения головы и тела в пространстве или при электрическом раздражении вестибулярных нервов (Bassal, Bianchi, 1982; Mameli et al., 1988; Yates et al., 1993, 2002; Kinney et al., 1994; Woodring, Yates, 1997; Zheng et al., 1997; Xu et al., 2002). Эффекты стимуляции или угнетения ритмической дыхательной активности при изменении активности структур вестибулярного ядерного комплекса обусловлены гетерогенностью его афферентных и эфферентных связей с нейронами дорсальной и вентральной респираторных групп, что позволяет напрямую регулировать возбудимость дыхательных премотонейронов и контролировать сокращение дыхательной мускулатуры (Miller et al., 1995; Rossiter et al., 1998; Yates et al., 2002). Кроме того, возможна непрямая

модуляция активности бульбарного дыхательного центра посредством реципрокных связей вестибулярных нейронов со структурами пневмотаксического центра варолиева моста, в частности, с популяциями клеток медиального и латерального парабрахияльных ядер и ядром Келликера-Фузе (Yates et al., 1994; Balaban, Beryozkin, 1994; Balaban, 1996, 1999; Porter, Balaban, 1997; Balaban et al., 2002).

У взрослых животных основная роль в механизмах синаптического взаимодействия вестибулярного ядерного комплекса со структурами бульбарного дыхательного центра принадлежит глутаматергической системе (Yates et al., 1993, 2002; Woodring, Yates, 1997; Zheng et al., 1997; Xu et al., 2002; Hernandez et al., 2004; Yates, Bronstein, 2005). Однако роль глутаматергической системы вестибулярного комплекса в механизмах реализации его регулирующих влияний на дыхательный центр новорожденных животных в настоящее время остаётся неизвестной, что делает актуальным исследование функций этой области мозга в регуляции дыхания в раннем постнатальном онтогенезе.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось изучение роли глутаматергической системы вестибулярного комплекса ядер в регуляции спонтанной ритмической активности дыхательного центра на ранних этапах постнатального онтогенеза.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучить влияние активации L-глутаматом глутаматергической системы разных ядер вестибулярного комплекса на параметры респираторной ритмической активности ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс.
2. Выявить влияние активации L-глутаматом глутаматергической системы медиального вестибулярного ядра на функцию генератора дыхательного ритма и генератора инспираторного паттерна у ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс.
3. Исследовать особенности респираторной активности ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс в условиях разрушения нейронных структур медиального вестибулярного ядра.
4. Выявить роль подтипов глутаматных рецепторов (NMDA, не-NMDA) в механизме взаимодействия нейронных структур рострального отдела медиального вестибулярного ядра и дыхательного центра ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые получены данные о роли глутаматергической системы вестибулярного комплекса ядер в регуляции дыхательного ритмогенеза и паттерна инспираторной активности на ранних этапах постнатального онтогенеза.

Впервые проведено сравнительное исследование респираторных эффектов, возникающих при микроинъекции L-глутамата в различные функционально-специфические отделы вестибулярного комплекса в ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс. Установлено, что активация глутаматергической системы вестибулярного комплекса ядер вызывает два типа ответных реакций со стороны бульбарного дыхательного центра: инспираторно-

активирующие и инспираторно-ингибирующие. При этом конкретные особенности респираторной активности ПБСП мозга новорожденных крыс зависят от структуры вестибулярного комплекса, подвергавшейся воздействию.

Продemonстрирована ведущая роль нейронных структур медиального вестибулярного ядра в реализации респираторных эффектов, при этом установлены возрастные особенности изменений различных параметров спонтанной ритмической активности дыхательного центра в ПБСП мозга 0–1 суточных и 2–3 суточных новорожденных крыс.

Показано наличие в период раннего постнатального онтогенеза тонического тормозного влияния на ритмогенерирующие структуры бульбарного дыхательного центра со стороны нейронных популяций роstralной области медиального вестибулярного ядра. Выявлено влияние роstralных структур медиального вестибулярного ядра на генератор инспираторного паттерна, на что указывают значительные изменения характеристик инспираторных залпов – уменьшение длительности и амплитуды респираторного залпа, снижение амплитуды осцилляций в низкочастотном и среднечастотном диапазонах.

Установлено, что ведущую роль в механизме синаптического взаимодействия нейронов роstralного отдела медиального вестибулярного ядра со структурами бульбарного дыхательного центра в изолированных ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс выполняет NMDA подтип глутаматных рецепторов и, в меньшей степени, не-NMDA подтип рецепторов.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные сведения о характере и особенностях реакций спонтанной ритмической активности в ПБСП мозга крыс на микроинъекции L-глутамата в различные функционально-специфические структуры вестибулярного комплекса ядер имеют существенное значение в плане развития и конкретизации теоретических представлений о нейрoхимических механизмах регуляции дыхания на ранних этапах постнатального онтогенеза.

Данные о роли глутаматергической системы вестибулярного комплекса расширяют современные представления о процессах регуляции и модуляции активности дыхательного ритмогенеза при участии супрабульбарных структур мозга, а также важны для понимания нейрoхимических закономерностей респираторного ритмогенеза и регуляции паттерна дыхания, особенностей формирования и обработки специфической вестибулярной афферентации, поступающей в дыхательный центр.

Результаты работы имеют также практическое значение для нейрoфармакологии и медицины, так как способствуют пониманию механизмов формирования различных нарушений дыхательной функции центрального генеза, таких как синдром внезапной смерти новорожденных при асфиксии, апноэ во время сна, синдром врожденной центральной гиповентиляции и при аномалиях развития вестибулярной системы. Полученные данные представляют также интерес для нейрoфизиологов и биохимиков, работающих в области исследования проблем развития нейромедиаторных и нейромодуляторных систем мозга.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Синаптические связи между дыхательной нейронной сетью продолговатого мозга и вестибулярным ядерным комплексом функционируют на ранних этапах онтогенеза при участии глутаматергической медиаторной системы медиального, латерального и спинального ядер.
2. Инспираторно-ингибирующая регуляция спонтанной ритмической активности дыхательного центра в ПБСП мозга 0-3 суточных новорожденных крыс осуществляется со стороны роstralного отдела медиального вестибулярного ядра, а инспираторно-активирующая – при участии нейронных популяций каудального отдела медиального ядра, и, в меньшей степени, латерального и спинального ядер вестибулярного комплекса.
3. Ритмогенерирующие нейроны бульбарного дыхательного центра ПБСП мозга 0-3 суточных новорожденных крыс находятся под тоническим тормозным синаптическим воздействием со стороны нейронов роstralной области медиального вестибулярного ядра.
4. Ведущая роль в механизме синаптической регуляции дыхательного ритмогенеза в ПБСП мозга 0-3 суточных новорожденных крыс со стороны вестибулярного комплекса принадлежит NMDA подтипу глутаматных рецепторов и, в меньшей степени, не-NMDA подтипу рецепторов нейронов роstralного отдела медиального вестибулярного ядра.

Апробация работы. Материалы работы доложены и обсуждены: на XVII Съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова РАН. (Ростов-на-Дону, 1998); на Международной конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2000); на II Российском Конгрессе по патофизиологии с международным участием «Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы» (Москва, 2000); на XVIII Съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова РАН (Казань, 2001); на XX Съезде Физиологического Общества им. И.П. Павлова РАН. (Москва, 2007); на VI Сибирском физиологическом съезде (Барнаул, 2008); на IV Международном междисциплинарном Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2008); на Всероссийской научной конференции «Самарская физиологическая школа», посвященной 110-летию со дня рождения М.В.Сергиевского (Самара, 2008).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 9 в центральной печати, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 175 страницах машинописного текста, содержит 13 таблиц, иллюстрирована 39 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения полученных данных, выводов, списка литературы (37 отечественных и 300 зарубежных источников).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 72 изолированных понтобульбоспинальных препаратах (ПБСП), полученных из мозга белых и пигментированных беспородных крыс в возрасте от 0 до 4 суток, в условиях *in vitro*. Подготовка объекта для экспериментального исследования осуществлялась в два этапа. На первом этапе животных наркотизировали эфиром и помещали в специальную установку для проведения подготовительной операции. Путем дорсальной кранио- и ламинэктомии обнажали головной мозг и шейные сегменты спинного мозга. Ствол мозга пересекался на межколликкулярном уровне. Во время препаровки мозг животных непрерывно орошался искусственной цереброспинальной жидкостью, охлажденной до $+10^{\circ}\text{C}$ и насыщаемой смесью кислорода (95%) и углекислого газа (5%). Препарат высвобождали от мозговых оболочек и последовательно пересекали дорсальные и вентральные корешки спинного мозга под контролем бинокулярного микроскопа. Кроме того препарировали волокна с V по XII пары черепно-мозговых нервов. По окончании препаровки температуру перфузионного раствора, орошающего ПБСП, постепенно повышали с $+10^{\circ}\text{C}$ до $+25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и затем пересекали спинной мозг на уровне VI-VII пары вентральных корешков.

На втором этапе изолированный понтобульбоспинальный препарат переносили в проточную термостатированную камеру ($+25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) и помещали в специальное фиксирующее устройство камеры дорсальной поверхностью вверх для осуществления визуального контроля места микроинъекции. Скорость суперфузии ПБСП мозга составляла в среднем 2,5 мл/мин. В экспериментах на изолированном ПБСП мозга новорожденных животных использовался раствор искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦСЖ) следующего состава (моль/л): NaCl – 124,0; KCl – 5,0; CaCl_2 – 2,4; MgSO_4 – 1,3; NaHCO_3 – 26; KH_2PO_4 – 1,2; d-глюкоза – 30 (по Suzue, 1984). В течение всего эксперимента pH раствора ИЦСЖ в регистрационной камере поддерживали постоянным на уровне $7,3\pm 0,05$.

О спонтанной генерации ритма в дыхательном центре ПБСП мозга новорожденных крыс судили по суммарной биоэлектрической активности диафрагмальных мотонейронов. С этой целью отводилась биоэлектрическая активность от C₄–C₅ вентральных корешков спинного мозга с помощью хлорсеребряного всасывающего электрода (внутренний диаметр 100–150 мкм). Отводимые разряды диафрагмальных мотонейронов усиливали с помощью усилителя переменного тока (DL 314N-725; Neurobiolab Company), подавали на вход аналого-цифрового преобразователя (L-Card E14-440, FBM Engineering) и записывали на жесткий диск персонального компьютера в формате wav.

Растворы исследуемых веществ вводили в мозг с помощью микрошприца МШ–1 через стеклянную микропипетку с диаметром кончика 20–30 мкм под контролем бинокулярного микроскопа. В экспериментах использовали следующие вещества: L–глутамат (50 мМоль/л; Sigma Chemicals, MO, USA); кетамина гидрохлорид – селективный антагонист NMDA подтипа глутаматных

рецепторов (4 мМоль/л; RBI, Natick, USA); GAMS – селективный антагонист не-NMDA подтипа глутаматных рецепторов (400 мМоль/л; RBI, Natick, MA, USA); каиновая кислота – нейротоксин (2 мкг/мл; Sigma Chemicals, MO, USA). Вещества растворяли *ex tempore* в ИЦСЖ и вводили в объеме 20–30 нл. Микропипетку в соответствии со стереотаксическими координатами вводили в исследуемые структуры и удерживали там в течение всего времени наблюдения во избежание распространения вещества вверх по треку (таблица 1).

Таблица 1. Координаты точек микроинъекций веществ в различные функционально-специфические области вестибулярного комплекса ядер, в мм.

Структура вестибулярного комплекса	Ростральное обех	Латеральное средней линии мозга	Вглубь от дорсальной поверхности мозга
Медиальное ядро: Ростральная часть	1,8	0,5	0,2
Каудальная часть	1,0	0,5	0,2
Латеральное ядро	1,8	1,0	0,5
Спинальное ядро	1,5	1,0	1,0
Верхнее ядро	2,2	1,5	0,5

В контрольных экспериментах по аналогичной методике инъецировали ИЦСЖ в том же объеме. Для гистологического контроля места микроинъекции по окончании эксперимента ПБСП фиксировали в 10% растворе формалина, после стандартной гистологической проводки заключали в парафиновый блок, из которого готовили коронарные срезы толщиной 10–20 мкм, с последующей окраской тионином по методу Ниссля (Буреш с соавт., 1991). Для сравнения использовали микрофотографии поперечных срезов мозга новорожденных крыс и атлас мозга взрослой крысы (Paxinos, Watson, 1998).

При обработке полученных нейрограмм оценивали следующие параметры: продолжительность респираторного цикла (с), время респираторного разряда (с), амплитуду респираторного разряда (относительные единицы). Для определения степени вариабельности параметров использовали коэффициент вариации – отношение среднего квадратичного отклонения к величине средней арифметической. Для описания пиков спектра респираторных разрядов использовали следующие параметры: частота пика (Гц) и мощность пика (относительные единицы). Средние показатели рассчитывали на основании данных, полученных от 10 последовательных респираторных залпов.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с помощью программного пакета SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, USA) с использованием непарного и парного t-теста Стьюдента. Все данные представлены как средние значения $\pm$ стандартные ошибки. Для построения графиков пользовались программным пакетом Sigma Plot 10.0 (Jandel Scientific, USA). Статистически значимыми считались изменения со значениями $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительный анализ респираторных реакций на микроинъекции L-глутамата в различные структурно-функциональные отделы вестибулярного комплекса в ПБСП мозга новорожденных крыс *in vitro*

В данной серии экспериментов исследованы реакции биоэлектрической активности, регистрируемой в С₄–С₅ вентральных корешках ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс, на микроинъекции глутамата в область рострального и каудального отделов медиального вестибулярного ядра (МВЯ), латерального (ЛВЯ), спинального (СВЯ) и верхнего вестибулярных ядер (ВВЯ). Установлено, что стимуляция глутаматергической системы вестибулярного комплекса ядер вызывает два типа ответных реакций со стороны бульбарного дыхательного центра: инспираторно-активирующие и инспираторно-ингибирующие, при этом выявлена четкая зависимость типа эффекта от локализации воздействия (рис.1).

Так, инспираторно-ингибирующий эффект наблюдали только в случае микроинъекции глутамата в ростральную часть МВЯ, при этом нами были выявлены возрастные особенности наблюдаемых реакций у ПБСП мозга 0–1 суточных (n=10) и 2–3 суточных (n=6) новорожденных крысят. В возрастной группе ПБСП 0–1 суточных крысят в 95% случаев нами было зарегистрировано полное торможение спонтанной активности дыхательного центра. Средняя продолжительность респираторного цикла при этом почти в 5,5 раз превышала величину данного показателя в исходных условиях ($p < 0,001$; парный t–тест). В отдельных экспериментах продолжительность депрессии респираторного ритма составляла более 20 мин. В возрастной группе ПБСП 2–3 суточных крысят микроинъекция глутамата в ростральный отдел МВЯ также вызывала уменьшение частоты генерации респираторных залпов в С₄–С₅ вентральных корешках за счет значительного увеличения общей продолжительности дыхательного цикла в среднем на $203,4 \pm 12,5$ % ($p < 0,01$; парный t–тест). При этом обнаружены статистически значимые различия в изменении данного параметра между исследуемыми возрастными группами ПБСП мозга ($p < 0,01$; t–тест).

Характерной особенностью, сопровождающей снижение ритмической активности дыхательного центра в обеих возрастных группах ПБСП, являлось резкое повышение вариабельности длительности респираторного цикла, что указывает на нерегулярность процесса генерации дыхательного ритма. На спектрограммах респираторных разрядов ПБСП мозга 0–1 суточных происходило значительное увеличение мощности низкочастотного пика в среднем на $132,5 \pm 24,1$ % ($p < 0,05$; парный t – тест), тогда как на спектрограммах респираторных разрядов ПБСП мозга 2–3 суточных крысят на фоне введения глутамата в исследуемую область наблюдали снижение мощности осцилляций низко- и среднечастотного диапазонов на $34,2 \pm 6,4$ % ($p < 0,05$; парный t–тест) и $31,3 \pm 5,7$ % ($p > 0,05$; парный t – тест) соответственно.

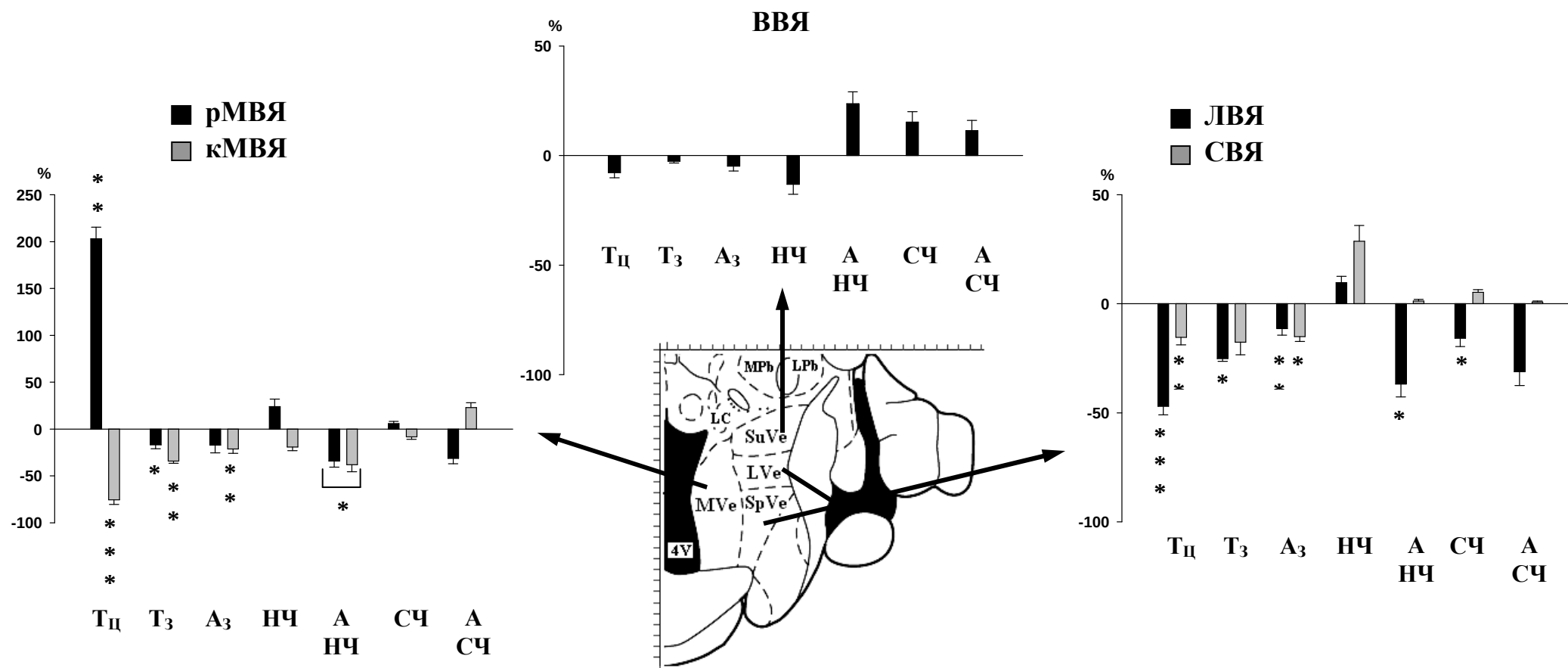


Рис. 1. Отклонения основных показателей респираторной активности (в % от фоновых значений) ПБСП мозга 0–3 суточных крыс при микроинъекции L-глутамата в различные структурно-функциональные отделы вестибулярного комплекса ядер.

рМВЯ и кМВЯ – роstralная и каудальная части медиального вестибулярного ядра, СВЯ, ЛВЯ и ВВЯ – спинальное, латеральное и верхнее вестибулярные ядра. T_ц – длительность респираторного цикла; T_з – длительность инспираторного залпа; A_з – амплитуда инспираторного залпа; НЧ – низкочастотный пик; А НЧ – амплитуда низкочастотного пика; СЧ – среднечастотный пик; А СЧ – амплитуда среднечастотного пика. Статистически значимые различия с исходным уровнем обозначены: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

В целом оценка изменений спектральных характеристик респираторных разрядов на фоне микроинъекции L-глутамата в ростральную область МВЯ свидетельствует о том, что данная структура вестибулярного ядерного комплекса у новорожденных крыс не только тормозит процессы дыхательного ритмогенеза, но и модулирует активность генератора инспираторного паттерна. Что касается возрастных особенностей изменений биоэлектрической активности, зарегистрированной в С₄–С₅ вентральных корешках в условиях данных экспериментов, то согласно данным ряда авторов, на протяжении первых трех суток после рождения как в дыхательном центре, так и в вестибулярном ядерном комплексе новорожденных крыс и мышей происходит активное изменение экспрессии рецепторов к медиаторам, в том числе к глутамату и ГАМК, что может обуславливать обнаруженные нами различия (Puyal et al., 2002; Liu, Wong-Riley, 2002; Eugene et al., 2007; Pascualetti et al., 2007).

В сериях опытов с микроинъекциями глутамата в каудальную часть МВЯ (n=8), а также ЛВЯ (n=8) и СВЯ (n=8) были зарегистрированы инспираторно-активирующие ответные реакции дыхательного центра. В этих сериях исследований использовали ПБСП мозга как 0–1, так и 2–3 суточных новорожденных крыс, однако сравнительный анализ не выявил возрастных различий в эффектах действия глутамата на их респираторную активность.

Максимальное увеличение частоты генерации инспираторных залпов наблюдали на фоне введения глутамата в каудальную часть МВЯ почти в 2,5 раза ($p < 0,001$; парный t – тест) по сравнению с исходным уровнем. Рост данного параметра был обусловлен как уменьшением общей продолжительности дыхательного цикла на $75,6 \pm 4,8\%$ ($p < 0,001$; парный t – тест), так и укорочением длительности инспираторного залпа на $32,4 \pm 2,4\%$ ($p < 0,01$; парный t – тест). На спектрограммах респираторных разрядов наблюдали значительное снижение амплитуды осцилляций низкочастотного диапазона на $38,2 \pm 7,3\%$ ($p < 0,05$; парный t–тест). Продолжительность наблюдаемых реакций составляла в среднем 1,5–2 мин, после чего показатели активности дыхательного центра возвращались к фоновым значениям, при этом латентный период не превышал 5–7 с.

В условиях микроинъекций глутамата в ЛВЯ и СВЯ сохранялась общая направленность реакции, однако выраженность инспираторно-активирующего эффекта существенно снижалась, при этом прирост частоты генерации респираторных разрядов составили, соответственно, $83,4 \pm 4,8\%$ ($p < 0,05$; парный t–тест) и $24,7 \pm 3,4\%$ ($p < 0,05$; signed rank–тест). Кроме того, в условиях воздействия L-глутамата на область ЛВЯ выявлено снижение мощности низкочастотных осцилляций ($36,8 \pm 5,89\%$; $p < 0,05$; парный t–тест), тогда как спектральные характеристики респираторных разрядов на фоне микроинъекции исследуемого вещества в спинальное ядро вестибулярного комплекса не претерпевали статистически значимых изменений, что свидетельствует о преимущественном воздействии L-глутамата через структуры СВЯ на активность генератора дыхательного ритма, а не паттерна инспираторной активности. В условиях введения L-глутамата в СВЯ обнаружены также

определенные отличия в динамике протекания дыхательных реакций, в частности, удлинение латентного периода реакции до 20–30 с, а также уменьшение ее длительности до 30–40 с. Все эти данные свидетельствуют о том, что СВЯ в естественных условиях играет менее значимую роль в реализации вестибуло-респираторных влияний, чем структуры латерального и каудальной части медиального вестибулярных ядер.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволили установить, что глутаматергическая система вестибулярного комплекса участвует в регуляции спонтанной активности дыхательного центра в раннем постнатальном онтогенезе, при этом наиболее выраженные респираторные эффекты реализуются через нейронные структуры МВЯ.

2. Влияние микроинъекций каиновой кислоты в медиальное вестибулярное ядро на параметры респираторной активности в ПБСП мозга новорожденных крыс *in vitro*

Селективное химическое разрушение нейронных структур ростральной ($n=6$) и каудальной ($n=6$) части МВЯ посредством микроинъекции каиновой кислоты в нейротоксичной концентрации оказывало, соответственно, инспираторно-активирующее и, в меньшей степени, инспираторно-ингибирующее влияние на частоту генерации респираторных разрядов в ПБСП мозга новорожденных крыс (рис.2). Инспираторно-активирующее влияние микроинъекций каиновой кислоты в ростральный отдел МВЯ проявлялось в увеличении частоты генерации инспираторных залпов в среднем на $71,8 \pm 6,4\%$ ($p < 0,05$; парный t -тест) с $3,80 \pm 0,62$ до $6,59 \pm 1,12$ мин⁻¹. Рост частоты генерации респираторных разрядов был обусловлен уменьшением общей продолжительности дыхательного цикла на $44,1 \pm 6,2\%$ ($p < 0,01$; парный t -тест) и длительности инспираторного залпа на $21,3 \pm 4,8\%$ ($p < 0,01$; парный t -тест). Кроме того, в условиях выключения рострального отдела МВЯ каиновой кислотой существенно снижался коэффициент вариации длительности респираторного цикла с $0,32 \pm 0,03$ до $0,24 \pm 0,02$ ($p < 0,05$; парный t -тест). Увеличение спонтанной ритмической активности дыхательного центра за счет роста частоты генерации инспираторных разрядов происходило через 3–5 мин после селективного воздействия нейротоксином на исследуемую структуру. Продолжительность реакции варьировала от 4 до 7 мин, после чего фоновая активность дыхательного центра устанавливалась на более высоком, относительно исходного, уровне. Это свидетельствует о наличии в период раннего постнатального онтогенеза тонического тормозного влияния на ритмогенерирующие структуры бульбарного дыхательного центра со стороны нейронных популяций ростральной области МВЯ. Кроме того, значительные изменения спектральных характеристик инспираторных залпов – снижение амплитуды осцилляций в низкочастотном (на $23,3 \pm 6,1\%$; $p < 0,01$; парный t -тест) и среднечастотном (на $40,1 \pm 8,2\%$; $p < 0,05$; парный t -тест) диапазонах, предполагают также влияние ростральных структур МВЯ на генератор инспираторного паттерна.

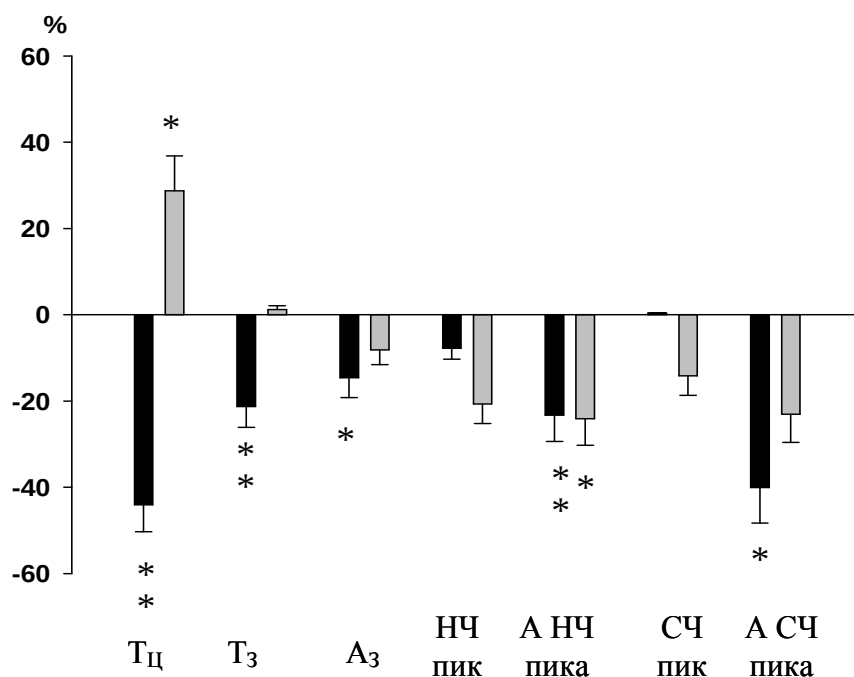


Рис. 2. Изменения параметров респираторной активности (в % от фоновых значений) ПБСП мозга 0–3 суточных крыс при микроинъекции каиновой кислоты в ростральную (черные столбики) и каудальную (серые столбики) части МВЯ.

T_ц – длительность респираторного цикла; T_з – длительность инспираторного залпа; A_з – амплитуда инспираторного залпа; НЧ пик – низкочастотный пик; А НЧ пика – амплитуда низкочастотного пика; СЧ пик – среднечастотный пик; А СЧ пика – амплитуда среднечастотного пика.

*, **, *** – статистически значимые различия параметров относительно фоновых значений, соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Основным эффектом на микроинъекцию раствора каиновой кислоты в каудальный отдел МВЯ было увеличение общей продолжительности дыхательного цикла в среднем на $28,7 \pm 8,1\%$ ($p < 0,05$; парный t–тест) и, соответственно, уменьшение частоты генерации респираторных залпов в среднем на $23,7 \pm 4,2\%$ ($p < 0,05$; парный t–тест) с $4,54 \pm 0,52$ до $3,52 \pm 0,34$ мин⁻¹, при этом наблюдаемый нами эффект в большинстве случаев распространялся на 1 – 2 цикла дыхания. Продолжительность наблюдаемых реакций составляла не более 40–80 с, после чего исследуемые показатели спонтанной активности дыхательного центра возвращались к уровню исходных величин. На спектрограммах респираторных разрядов ПБСП мозга 0–3 суточных крыс на фоне микроинъекции каиновой кислоты в каудальную часть МВЯ обнаружено снижение мощности осцилляций низкочастотного диапазона в среднем на $24,1 \pm 6,2\%$ ($p < 0,05$; парный t–тест). Совокупность приведенных данных позволяет предположить, что нейронные популяции каудального отдела медиального ядра вестибулярного комплекса не имеют выраженного тонического влияния на структуры бульбарного дыхательного центра в раннем постнатальном онтогенезе.

3. Роль NMDA и не-NMDA подтипов глутаматных рецепторов нейронных структур ростральной части медиального вестибулярного ядра в модуляции дыхательного ритмогенеза в ПБСП мозга новорожденных крыс *in vitro*

В нашем исследовании установлено, что через нейронные структуры ростральной части МВЯ реализуется тоническое тормозное влияние на генератор дыхательного ритма в препаратах мозга 0–3 суточных новорожденных крыс. Согласно данным литературы (Johnston et al., 1994; Shao et al., 2004) нейроны МВЯ обладают спонтанной тонической активностью, базовый уровень которой поддерживается за счет высвобождающегося в терминалях первичных вестибулярных афферентов нейромедиатора глутамата. В данной серии экспериментов мы выяснили роль различных подтипов глутаматных рецепторов в модуляции степени выраженности тонического тормозного влияния МВЯ на генератор дыхательного ритма у новорожденных животных.

В условиях блокады NMDA рецепторов ростральной области МВЯ микроинъекцией селективного антагониста кетамина гидрохлорида происходило увеличение частоты генерации инспираторных разрядов почти в 2,5 раза в среднем с $4,12 \pm 1,26$ до $10,50 \pm 0,80$ мин⁻¹ ($p < 0,05$; парный t-тест), что было обусловлено как уменьшением общей продолжительности респираторного цикла на $70,1 \pm 14,2$ % ($p < 0,001$; парный t-тест), так и сокращением длительности инспираторного залпа на $40,7 \pm 4,8$ % ($p < 0,001$; парный t-тест) (рис. 3).

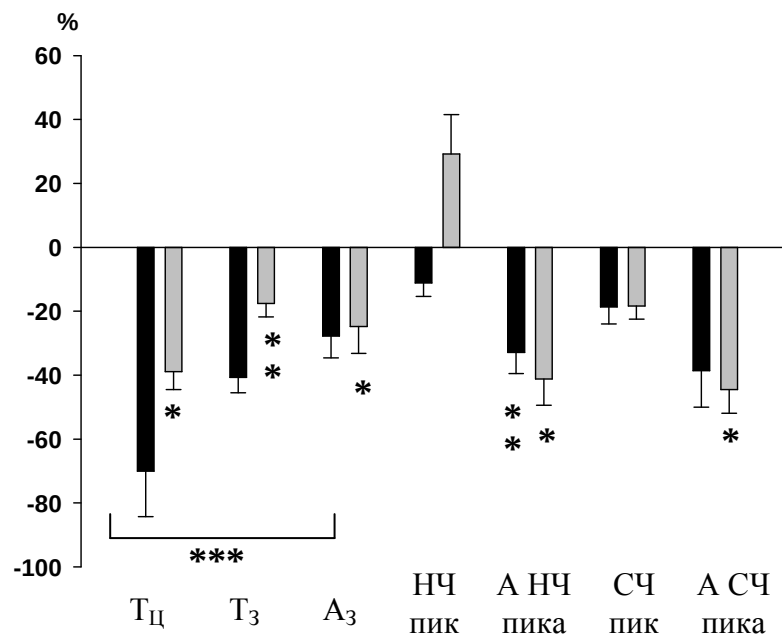


Рис. 3. Изменения параметров респираторной активности (в % от фоновых значений) ПБСП мозга 0–3 суточных крыс при микроинъекции кетамина гидрохлорида (черные столбики) и GAMS (серые столбики) в ростральную часть МВЯ. *, **, *** - статистически значимые различия параметров относительно фоновых значений, соответственно $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.

Анализ спектральных характеристик инспираторных залпов в условиях микроинъекции кетамина гидрохлорида в ростральную часть МВЯ показал уменьшение амплитуды низкочастотного пика на $32,9 \pm 6,6\%$ ($p < 0,01$; парный t-тест).

Блокада не-NMDA рецепторов рострального отдела МВЯ в результате микроинъекции GAMS вызывала меньший прирост частоты генерации инспираторных залпов (на $54,7 \pm 7,2\%$), чем блокада NMDA подтипа глутаматных рецепторов. Общая продолжительность респираторного цикла и длительность инспираторного залпа уменьшались соответственно на $38,9 \pm 5,6\%$ ($p < 0,05$; парный t-тест) и $17,6 \pm 4,2\%$ ($p < 0,01$; парный t-тест) и сопровождалась снижением амплитуды респираторного разряда. В частотном спектре инспираторных залпов также происходило уменьшение амплитуд низко- и среднечастотного пиков мощности на $41,2 \pm 8,2\%$ ($p < 0,05$; парный t-тест) и $44,5 \pm 7,4\%$ ($p < 0,05$; парный t-тест), соответственно.

Таким образом, результаты серии экспериментов с блокадой NMDA и не-NMDA подтипов глутаматных рецепторов нейронов ростральной части медиального вестибулярного ядра показали, что в механизме тонического тормозного влияния со стороны этой области вестибулярного комплекса на дыхательный центр ведущая роль принадлежит NMDA подтипу глутаматных рецепторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы показали, что среди структур вестибулярного ядерного комплекса ведущая роль в реализации респираторных реакций принадлежит нейронным популяциям МВЯ. Известно, что указанная структура вестибулярного комплекса ядер обладает наиболее сложным и гетерогенным нейронным составом (Walberg et al., 1990; Vibert et al., 2000; Eleore et al., 2004, 2005; Horii et al., 2004; Takazawa et al., 2004; Gittis, du Lac, 2007; Pasqualetti et al., 2007) и образует многочисленные двусторонние проекции с областями ствола мозга, которые участвуют в регуляции многих вегетативных функций, в том числе и дыхания (Balaban, Beryozkin, 1994; Balaban, 1996, 1999; Ruggiero et al., 1996; Porter, Balaban, 1997; Balaban et al., 2002; Jian et al., 2005).

Установлено, что у взрослых крыс глутаматергическая стимуляция МВЯ усиливает вентиляцию легких (Xu et al., 2002), тогда как неселективная электрическая стимуляция может вызывать ее снижение. Два типа реакций при электрической стимуляции МВЯ объясняется активацией разных типов нейронов и вовлечением в реализацию вестибуло-респираторных реакций различных нейротрансмиттерных систем (Mori et al., 2001; Yates et al., 2002). По-видимому, выявленный нами эффект угнетения активности дыхательного центра на фоне воздействия L-глутамата в исследуемую область вестибулярного комплекса у 0–1 суточных крыс, а также постепенное уменьшение выраженности тормозных влияний у 2–3 суточных животных, является специфической особенностью взаимодействия нейронных популяций ростральной части медиального вестибулярного ядра со структурами генератора

респираторного ритма только в период раннего постнатального онтогенеза и претерпевает существенные изменения по мере взросления.

Полученные нами данные о преобладающем участии NMDA подтипа глутаматных рецепторов нейронов рострального отдела МВЯ в механизме синаптической регуляции дыхательного ритмогенеза в ПБСП мозга 0-3 суточных новорожденных крыс со стороны вестибулярного комплекса согласуются с результатами исследований, выполненных на поперечных срезах продолговатого мозга крыс *in vitro* и взрослых животных *in vivo* (Lin, Carpenter, 1993; Kinney et al., 1994; Xu et al., 2002; Broussard, 2009). Установлено, что нейронную сеть медиального вестибулярного ядра формируют клетки двух основных типов: глутамат- и ГАМКергические, которые связаны между собой рекуррентными возбуждающими коллатералиями, при этом базовый уровень активности нейронов внутри сети обеспечивается преимущественно за счет глутаматных рецепторов, а введение антагонистов NMDA- и ГАМК_A-рецепторов подавляет активность пейсмекерных клеток. Считается, что NMDA подтип глутаматных рецепторов обеспечивает также процессы восстановления баланса вестибулярной афферентации после унилатерального разрушения лабиринтного входа и может изменять синаптическую передачу на уровне первичных афферентных волокон вестибулярного нерва, инициируя возникновение NMDA-зависимой долговременной потенциации (Grassi et al., 1995, 1998, 2001; Sans et al., 2000; Chen et al., 2000; Grassi, Pettorossi, 2001). В частности, возникновением феномена долговременной потенциации может быть опосредована длительная блокада дыхательного ритмогенеза в условиях микроинъекции L-глутамата в ростральную часть медиального вестибулярного ядра, зарегистрированная в наших экспериментах.

Таким образом, в настоящей работе установлено, что глутаматергическая система вестибулярного ядерного комплекса играет важную роль в центральных механизмах регуляции спонтанной биоэлектрической активности дыхательного центра, оказывая существенное влияние на функциональное состояние генератора респираторного ритма и структуры, ответственные за формирование респираторного паттерна.

ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ респираторных реакций на микроинъекции L-глутамата в различные функционально-специфические отделы вестибулярного ядерного комплекса показал, что основная роль в механизме регуляции ритмической активности дыхательного центра у новорожденных крыс принадлежит глутаматергической системе нейронов рострального и каудального отделов медиального вестибулярного ядра и, в меньшей степени, латерального и спинального ядер вестибулярного комплекса.
2. Локальное введение L-глутамата в ростральную область медиального вестибулярного ядра вызывает обратимую блокаду дыхательного ритмогенеза в ПБСП мозга 0–1 суточных новорожденных крыс и уменьшение частоты генерации инспираторных залпов в ПБСП мозга 2–3 суточных новорожденных крыс.

3. Микроинъекция L-глутамата в каудальную часть медиального вестибулярного ядра в ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс вызывает увеличение частоты генерации респираторных разрядов, уменьшение длительности инспираторных залпов и снижение в них мощности осцилляций низкочастотного диапазона.
4. В условиях выключения нейронных структур ростральной части медиального вестибулярного ядра выявлен эффект активации дыхательного ритмогенеза в ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс, свидетельствующий о наличии тонического тормозного влияния на ритмогенерирующие структуры дыхательного центра со стороны нейронных популяций ростральной области медиального вестибулярного ядра.
5. Блокада NMDA и не-NMDA подтипов глутаматных рецепторов нейронов ростральной части медиального вестибулярного ядра в ПБСП мозга 0–3 суточных новорожденных крыс выявила, что в механизме тонического тормозного влияния со стороны этой области вестибулярного комплекса на дыхательный центр ведущая роль принадлежит NMDA подтипу глутаматных рецепторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в журналах ВАК РФ

1. Тюрин Н.Л., Мирошниченко И.В., Пятин В.Ф., Алексеева А.С. Особенности спектральных характеристик электрической активности дыхательного центра в процессах мозга плодов и новорожденных крыс *in vitro* // Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2002, Т.88, №2, С. 248–256.
2. Тюрин Н.Л. Роль NMDA- и non-NMDA-подтипов глутаматных рецепторов нейронных структур медиального вестибулярного ядра в регуляции дыхательного ритмогенеза у новорожденных крыс *in vitro* //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009, Т. 147, №8, С. 129–133.

Работы, опубликованные в центральной печати и сборниках

3. Тюрин Н.Л., Сергеева М.С., Никитин О.Л., Алексеева А.С., Пятин В.Ф. Участие нейронных структур позадитрапещиевидного ядра в регуляции дыхательного ритмогенеза //Тезисы докладов XVII Съезда Физиологического Общества им. И.П. Павлова РАН. Ростов-на-Дону, 1998.-С.239.
4. Тюрин Н.Л., Мирошниченко И.В., Алексеева А.С. Влияние оксида азота на процесс дыхательного ритмогенеза в бульбоспинальных препаратах новорожденных крыс *in vitro* //Тезисы докладов Международной конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы современной науки». Самара, 2000.-Ч.2.-С.66.

5. Тюрин Н.Л., Алексеева А.С., Пятин А.В., Мирошниченко И.В. Влияние рН на спектр инспираторных осцилляций С₄-С₅ корешков в бульбоспинальных препаратах плодов и новорожденных крыс *in vitro* //Тезисы докладов Международной Конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы современной науки». Самара, 2000.- Ч.2.-С.10.
6. Тюрин Н.Л., Пятин В.Ф., Мирошниченко И.В., Алексеева А.С. Влияние оксида азота на дыхательную активность бульбоспинальных препаратов новорожденных крыс *in vitro* // Тезисы докладов Второго Российского Конгресса по патофизиологии с международным участием «Патофизиология органов и систем. Типовые патологические процессы». Москва, 2000.-С.114.
7. Тюрин Н.Л., Пятин В.Ф., Мирошниченко И.В., Алексеева А.С., Никитин О.Л. Механизмы дыхательного ритмогенеза в перинатальном онтогенезе //Тезисы докладов XVIII Съезда Физиологического Общества им. И.П. Павлова РАН. Казань, 2001.-С.413.
8. Тюрин Н.Л., Глазкова Е.Н., Пятин В.Ф., Татарников В.С. Участие зоны А5 в модуляции активности диафрагмального нерва и уровня системного артериального давления при натуральной вестибулярной стимуляции у крысы // Тезисы докладов XX Съезда Физиологического Общества им. И.П. Павлова РАН. Москва, 2007.-С.450.
9. Тюрин Н.Л., Глазкова Е.Н., Пятин В.Ф., Татарников В.С. Модуляция респираторной и гипертензивной реакции на болевой стимул у крыс при участии NO-ергического механизма зоны А5 моста // VI Сибирский физиологический съезд. Тезисы докладов. – Барнаул: Принтэкспресс, 2008. – В 2 томах. Т.1. – С.7.
- 10.Тюрин Н.Л., Глазкова Е.Н., Пятин В.Ф. Изменение активности С4 – С5 в препаратах мозга новорожденных крыс *in vitro* при микроинъекции глутамата в медиальное вестибулярное ядро // VI Сибирский физиологический съезд. Тезисы докладов. – Барнаул: Принтэкспресс, 2008. – В 2 томах. Т.1. – С.59-60.
- 11.Тюрин Н.Л., Глазкова Е.Н., Пятин В.Ф., Татарников В.С. Роль NMDA и АМРА-подтипов глутаматных рецепторов нейронных структур зоны А5 в регуляции дыхания и кровообращения при термоноцицептивной стимуляции у крыс // VI Сибирский физиологический съезд. Тезисы докладов. – Барнаул: Принтэкспресс, 2008. – В 2 томах. Т.1. – С.6.
- 12.Тюрин Н.Л., Глазкова Е.Н., Пятин В.Ф., Татарников В.С. Зона А5 модулирует реакции дыхания и кровообращения при соматической афферентной стимуляции у крыс // Нейронаука для медицины и психологии: 4-й Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Украина, 10-20 июня 2008 г.: Труды /Под ред. Лосевой Е.В., Логиновой Н.А. – МАКС Пресс, 2008. – С.100-101.
- 13.Tyurin N.L., Glazkova E.N., Pyatin V.F. Glutamatergic activation of different vestibular subnuclei evokes differential respiratory responses in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the neonatal rat *in vitro* //Нейронаука

для медицины и психологии: 4-й Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Украина, 10-20 июня 2008 г.: Труды /Под ред. Лосевой Е.В., Логиновой Н.А. – МАКС Пресс, 2008. – С. 301-302.

- 14.Тюрин Н.Л., Глазкова Е.Н., Алексеева А.С., Кузнецова О.Г., Борисова О.В. Глутаматергическая модуляция вестибуло-респираторных реакций в бульбоспинальных препаратах мозга новорожденных крыс *in vitro* //Сборник статей Всероссийской научно-практической конференции «Современные аспекты клинической физиологии в медицине», Самара, 2008. – С. 77 – 80.

Список сокращений

ВВЯ – верхнее вестибулярное ядро

ЛВЯ – латеральное вестибулярное ядро

МВЯ – медиальное вестибулярное ядро

СПЯ – спинальное вестибулярное ядро

ИЦСЖ – искусственная цереброспинальная жидкость

ПБСП – понтобульбоспинальный препарат

NMDA – N-метил-D-аспартат

GAMS – γ -D-глутамил-амино-метил-сульфоновая кислота

Подписано в печать 9.09.2009 г.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.
Объем 1 п. л. Тираж 100 экз. Заказ № 1440.
443099 г. Самара, ул.А.Толстого, 39
ФГУП «Типография «Солдат Отечества»