

УДК 612.751.3

РЕСПИРАТОРНЫЕ РЕАКЦИИ В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОСТИМУЛЯЦИИ БОЛЬШОГО ЯДРА СРЕДИННОГО ШВА КРЫС

© 2007 А.О. Орлова, А.Н. Инюшкин¹

В острых опытах на наркотизированных крысах изучены реакции инспираторных мышц и паттерна дыхания в зависимости от координат и параметров локальной электростимуляции большого ядра срединного шва продолговатого мозга. Установлено тормозное влияние на амплитудные параметры и активирующее – на частотно-временные показатели дыхания.

Введение

Большое ядро шва (БЯ), относящееся к вентральным ядрам срединного шва, нейрохимически относится к группе В3 серотонинергических нейронов [7]. Ростральная часть ядра содержит относительно большее количество серотонинергических нейронов, чем каудальная, причём во многих нейронах БЯ серотонин сосуществует с нейропептидами: с субстанцией Р и тиролиберином.

Хотя в БЯ обнаруживается некоторое количество нейронов, активность которых синхронна с дыханием [15], данное ядро традиционно не включается в состав дыхательного центра. Вместе с тем известно о выраженном модулирующем влиянии БЯ на центральные механизмы регуляции дыхания. В ранее выполненных работах показано, что электрическое или химическое раздражение БЯ вызывает респираторные реакции преимущественно ингибирующего характера [6, 23]. При этом до настоящего времени не был проведен систематический анализ особенностей изменений различных показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц в зависимости от координат локальной стимуляции БЯ и параметров электрического тока. Между тем, подобные исследования представляют особый интерес в плане обнаруженной зависимости соотношения нейромедиаторов, высвобождаемых из аксонных терминалей нейронов ядер шва от частоты и силы стимулирующего тока [4]. В настоящей работе производился анализ характера и выраженности реакций паттерна внешнего дыхания и электрической активности инспираторных мышц, наблюдавшихся при различных режимах электрической стимуляции БЯ.

¹ Орлова Анастасия Олеговна, Инюшкин Алексей Николаевич, Кафедра физиологии человека и животных, Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

1. Методика исследования

Эксперименты проводились на 28 взрослых нелинейных крысах обоего пола массой 180-250 г. Животных наркотизировали уретаном (1,5 г/кг внутривенно). Во всех экспериментах крысы дышали атмосферным воздухом. Паттерн дыхания регистрировали методом спирографии. Для этого использовали электронный спирограф с монотриггерным датчиком давления. На полученных спирограммах оценивали дыхательный объем (V_t , мл), длительность инспираторной (T_i , с) и экспираторной (T_e , с) фаз дыхательного цикла, длительность всего дыхательного цикла (T_t , с). Дополнительно рассчитывали частоту дыхания ($f = 60 / T_t$, мин⁻¹) и минутный объем дыхания ($V = f \cdot V_t$, мл/мин). Калибровку дыхательного объема производили в конце каждого опыта. Параллельно с паттерном дыхания регистрировали биоэлектрическую активность диафрагмы и наружных межреберных мышц (VI–VIII межреберье) с правой стороны тела животных с помощью стальных игольчатых электродов биполярным способом. На полученных электромиограммах рассчитывали максимальную амплитуду осцилляций (отн. ед.) в залпах активности инспираторных мышц. Для электростимуляции БЯ применяли биполярный концентрический электрод диаметром 0,02 мм. Введение микроэлектрода в исследуемую структуру осуществляли согласно стереотаксическим координатам атласа мозга крысы (1 точка – Р 9.8, V 10.2, L 0.0; 2 точка – Р 10.3, V 9.9, L 0.0; 3 точка – Р 10.8, V 10.1, L 0.0; 4 точка – Р 11.3, V 10.3, L 0.0). Для раздражения использовали электрический ток (частота 30 и 50 Гц, напряжение 9, 11, 13 и 15 В). Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием теста ANOVA для повторных измерений, а в случае обнаружения статистически значимых изменений для последующего попарного сравнения значений исследуемых параметров с исходными применяли Dunnett's test или (при несоответствии данных в выборках нормальному распределению) тест Tukey. Статистически значимыми считались изменения со значениями $p \leq 0,05$. Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals» (Geneva, 1990).

2. Результаты исследования и их обсуждение

В результате настоящего исследования выявлено, что электростимуляция четырех различных точек большого ядра срединного шва приводит к выраженному в той или иной степени уменьшению амплитудных показателей и увеличению частотно-временных параметров дыхания.

Так, при электростимуляции точки 1 БЯ током частотой 30 Гц параметры паттерна дыхания практически не изменялись относительно исходных значений. Ток с частотой 50 Гц приводил к изменению частоты дыхания и времени вдоха, при этом время выдоха оставалось прежним. В ходе эксперимента была отмечена тенденция к постепенному увеличению частоты дыхания и к уменьшению минутного объема дыхания. Время инспирации при этом также сокращалось и мак-

симальные изменения были зарегистрированы при использовании силы стимула 13 и 15 В: на 37% и 34% соответственно ($p \leq 0,05$; рис. 1. А, рис. 4. А). Дыхательный объем снижался как в условиях электростимуляции с частотой 30 Гц, так и 50 Гц, но статистически значимые изменения отмечены при воздействии на БЯ током 30 Гц и 9, 11 В (на 11% и 20% соответственно: $p \leq 0,05$; рис. 1. Б). Параметры биоэлектрической активности инспираторных мышц не изменялись при стимуляции током 30 Гц. При 50 Гц максимальная амплитуда осцилляций в залпах активности как диафрагмальной мышцы, так и интеркостальных мышц имела тенденцию к небольшому уменьшению (рис. 2. А, Б).

Раздражение электрическим током точки 2 БЯ приводило к изменениям показателей паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц при частоте тока 30 и 50 Гц. Была отмечена тенденция к увеличению частоты дыхания, уменьшению дыхательного объема, дыхательного цикла, времени экспирации и времени инспирации при 30 Гц. В условиях электростимуляции током 50 Гц продолжительность вдоха сокращалась и достигала максимального изменения на 36% относительно исходного значения при силе стимула 15 В ($p \leq 0,05$; рис. 3. А, рис. 4 Б). Минутный объем дыхания также снижался, наиболее выраженные изменения зарегистрированы при частоте стимулирующего тока 50 Гц (11 В – на 36%, 13 В – на 45% и 15 В – на 44%: $p \leq 0,05$; рис. 3. Б). Максимальная амплитуда осцилляций залповой активности наружных межреберных мышц оставалась неизменной при электростимуляции в настоящих экспериментальных условиях, хотя данный параметр диафрагмы при использовании тока 30 и 50 Гц имел тенденцию к уменьшению (рис. 5. А, Б).

Электростимуляции точки 3 БЯ не выявила статистически значимых изменений параметров паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц. Частота дыхания, дыхательный объем, минутный объем дыхания, продолжительность целого дыхательного цикла, время экспирации и инспирации оставались на исходном уровне в условиях действия тока 30 Гц, при повышении частоты до 50 Гц были отмечены тенденции к уменьшению данных показателей в зависимости от силы стимула. Максимальная амплитуда осцилляций залповой активности диафрагмы при частоте стимуляции 30 Гц и 50 Гц незначительно уменьшалась с увеличением силы электрического тока. Данный параметр биоэлектрической активности наружных межреберных мышц при действии тока частотой 30 Гц оставался неизменным, а при 50 Гц амплитуда имела тенденцию к уменьшению.

При электростимуляции точки 4 БЯ большинство параметров паттерна дыхания при действии тока частотой 30 Гц оставалось на исходном уровне, за исключением минутного объема дыхания, который характеризовался постепенным уменьшением, при этом было зарегистрировано статистически значимое снижение данного показателя на 16 % при силе тока 11 В ($p \leq 0,05$; рис. 3. В, рис. 4 В). Дыхательный объем, минутный объем дыхания, время целого дыхательного цикла, время вдоха и выдоха при электростимуляции током 50 Гц имели тенденцию к снижению, а частота дыхания – к увеличению относительно исходных значений. Максимальная амплитуда осцилляций залповой активности диафрагмальной мышцы при действии тока 30 и 50 Гц незначительно уменьшалась, при этом эф-

фekt оказался примерно одинаковым при использовании стимула силой 11, 13 и 15 В. Данный параметр интеркостальных мышц оставался неизменным при действии тока частотой 30 и 50 Гц.

Таким образом, полученные результаты электростимуляции БЯ показывают, что данное ядро оказывает модулирующее влияние на дыхание наркотизированных крыс. При этом наиболее характерные респираторные эффекты состояли в снижении дыхательного объёма и амплитудных показателей электрической активности инспираторных мышц и в повышении частоты дыхания за счёт соответствующего укорочения фаз цикла внешнего дыхания. Ранее похожие реакции были описаны *in vitro*, где было установлено, что стимуляция структур срединного шва или аппликация серотонина приводят к принципиально одинаковому результату – к росту частоты генерации инспираторных разрядов и снижению их амплитуды в корешках подъязычного нерва. Было сделано заключение о модулирующем влиянии ядер шва на скорость генерации залпов центральной инспираторной активности и снижении амплитуды моторного инспираторного выхода, реализующихся за счёт влияния серотонина, высвобождающегося на уровне структур дыхательного центра [17].

Результаты настоящей работы в целом согласуются с существующими представлениями об участии БЯ в центральной регуляции дыхания. В БЯ идентифицированы дыхательные нейроны, выявлена хемочувствительность расположенных здесь серотонинергических клеток к изменениям напряжения CO_2 и pH и установлено модулирующее влияние БЯ на выраженность вентиляторных ответов на гиперкапнию и гипоксию [9, 11, 18, 19, 20, 22]. Известно, также, что серотонинергические нейроны БЯ участвуют в защитных дыхательных рефlekсах, аспирационном рефlekсе. Нарушения в серотонинергической системе являются одной из причин синдрома внезапной смерти младенцев [16].

В ходе экспериментов, проведённых в рамках настоящего исследования, обнаружались определённые различия в характере и выраженности реакций на стимуляцию различных точек БЯ. Эти различия могут прежде всего объясняться нейрoхимической неоднородностью расположенных здесь нейронов, а также особенностями организации их эфферентных проекций. В частности, известно, что рoстральная часть БЯ, получающая афферентные входы от прелимбик, инфралимбик, медиальной и латеральной прецентральной коры, дорсальной части околoводопроводного серого вещества, является преимущественным источником несеротонинергических проекций к переднему мозгу, гипоталамусу и центральному ядру миндалины [5, 10]; от каудальной части ядра начинается большая часть нисходящих серотонин- и несеротонинергических проекций к спинному мозгу [5, 6]. В плане результатов настоящей работы стоит отметить обилие эфферентных связей БЯ со структурами бульбарного дыхательного центра и пневмотаксической системы моста: с парабрахияльным ядром, ядром Келликера-Фьюза, комплексом Бетцингера, комплексом пре-Бетцингера, вентральной и дорсальной дыхательными группами [8, 12, 21]. Есть все основания предполагать, что данные связи принимали непосредственное участие в механизмах реализации наблюдавшихся реакций на электростимуляцию БЯ. Известно, что использованная в наших экспериментах частота стимуляции (30 и 50 Гц) вызывает актив-

ное высвобождение из аксонных терминалей нейронов ядер шва, наряду с серотонином, его котрансмиттеров – субстанции Р и тиролиберина [3,4], обладающих выраженным тахипноическим влиянием на уровне структур дыхательного центра, как было продемонстрировано в наших предыдущих исследованиях [1-2,13]. Вместе с тем, не исключено, что снижение дыхательного объема было в определенной степени обусловлено ингибирующим влиянием прямых нисходящих проекций от нейронов БЯ к мотонейронам диафрагмы, поскольку ранее было показано, что высокочастотная электростимуляция БЯ у кошек *in vivo* приводит к угнетению инспираторных разрядов в данной группе мотонейронов [14].

Заключение

Результаты настоящего исследования показывают, что БЯ оказывает тормозное влияние на объёмные параметры внешнего дыхания и амплитуду залповой активности инспираторных мышц, и активирующее – на частотно-временные показатели дыхательного цикла. При этом более выраженные и статистически значимые респираторные реакции были зарегистрированы при стимуляции ростральных точек БЯ. Учитывая преимущественное расположение серотонинергических нейронов в данной части структуры, можно предположить более активное участие ростральных отделов БЯ в модулирующем влиянии на функцию дыхательного центра. Наиболее существенные изменения отмечены при раздражении БЯ электрическим током частотой 50 Гц, что может объясняться более интенсивным высвобождением из окончаний нейронов БЯ вместе с серотонином тиролиберина и субстанции Р.

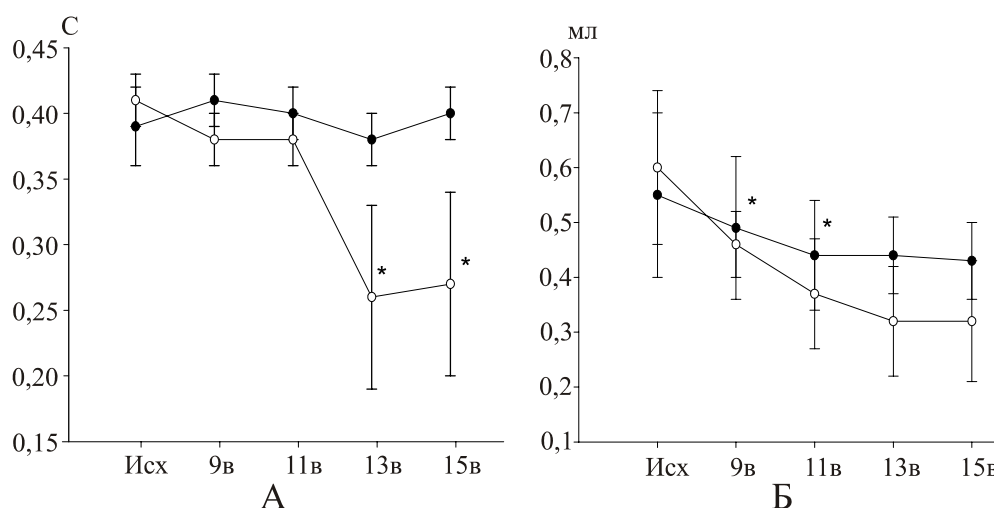


Рис. 1. Изменение продолжительности инспирации (А) и дыхательного объема (Б) при электростимуляции точки 1 большого ядра (—●— 30 Гц; —○— 50 Гц)*

* Данные представлены в виде средних арифметических $\pm$ стандартные ошибки средней.

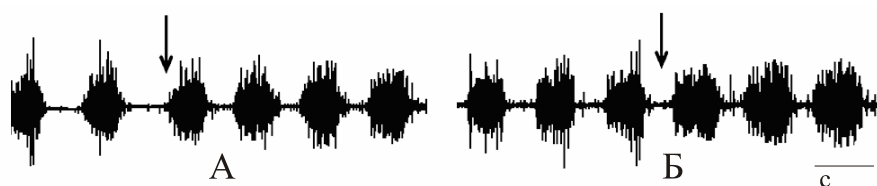


Рис. 2. Электромиограммы диафрагмы (А) и наружных межреберных мышц (Б) при электростимуляции точки 1 большого ядра током частотой 50 Гц и силой стимула 15 В (↓ – начало электростимуляции)

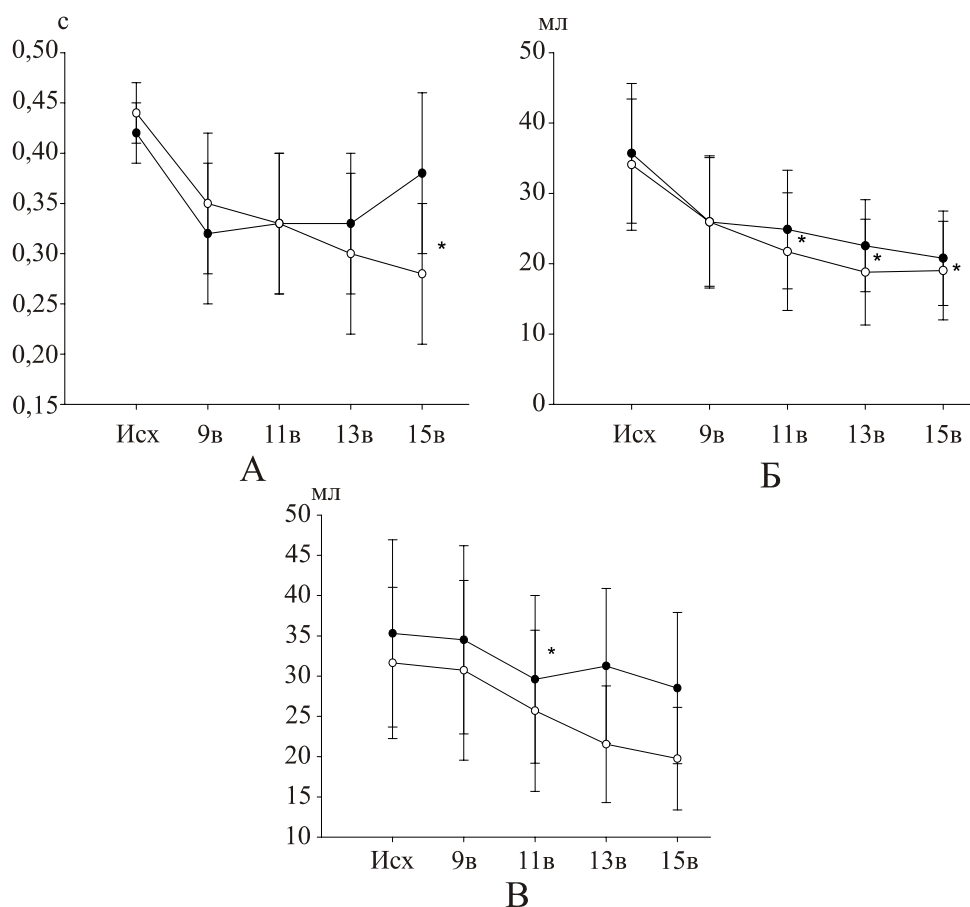


Рис. 3. Изменение времени инспирации (А), минутного дыхательного объема (Б) при электростимуляции точки 2 большого ядра и минутного объема (В) при электростимуляции точки 4 большого ядра (● – 30 Гц; ○ – 50 Гц)*

* Данные представлены в виде средних арифметических $\pm$ стандартные ошибки средней.

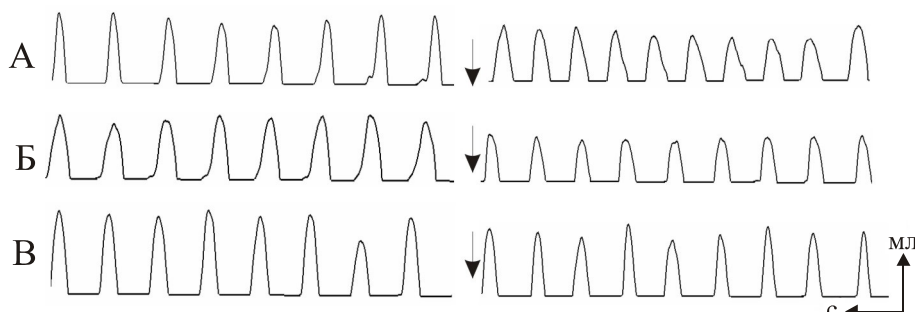


Рис. 4. А – спирограмма при электростимуляции точки 1 большого ядра частотой 50 Гц и силой стимула 15 В; Б – спирограмма при электростимуляции точки 2 большого ядра частотой 50 Гц и силой стимула 15 В; В – спирограмма при электростимуляции точки 4 большого ядра частотой 30 Гц и силой стимула 11 В (– начало электростимуляции)



Рис. 5. Электромиограммы диафрагмы при электростимуляции точки 2 большого ядра током частотой 30 Гц (А) 50 Гц (Б) и силой стимула 15 В (↓ – начало электростимуляции)

Литература

- [1] Инюшкин, А.Н. Комплекс пре-Бётцингера участвует в реализации респираторных эффектов тиролиберина / А.Н. Инюшкин, Н.А. Меркулова, С.А. Чепурнов // Российский физиол. ж. им. Сеченова. – 1998. – 84(4) – С.285-292.
- [2] Чепурнов, С.А. Влияние микроинъекций тахикининов в область ядра солитарного тракта на дыхание и кровообращение у крыс / С.А. Чепурнов, А.Н. Инюшкин // Российский физиол. ж. им. И.М. Сеченова. – 1997. – 83(4) – С.117-125.
- [3] Quantitative and qualitative aspects on distribution of 5-HT and its coexistence with substance P and TRH in cat ventral medullary neurons / U. Arvidsson [et. al.] // J. Chem. Neuroanat. – 1994. – 7(1-2) – P. 3-12.
- [4] Bartfai, T. Regulation of the release of coexisting neurotransmitters / T. Bartfai, K. Iverfeldt, G. Fisone // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1988. – 28 – P. 285-310.
- [5] Bowker, R.M. The relationship between descending serotonin projections and ascending projections in the nucleus raphe magnus: A double labeling study / R.M. Bowker // Neurosci. Lett. – 1986. – 70 – P. 348-353.
- [6] Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats / Y. Cao [et. al.] // Neurosci. Res. – 2006. – 56 – P. 322-331.

- [7] Dahlstrom, A. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system / A. Dahlstrom, K. Fuxe // *Acta Physiol. Scand.* – 1964. – 62 (232) – P.1 – 55.
- [8] Afferent projections to the Bötzing complex from the upper cervical cord and other respiratory related structures in the brainstem in cats: retrograde WGA-HRP tracing / S. Gang, [et. al.] // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 1995. – 56 – P. 1-7.
- [9] Gargaglioni, L.H. The nucleus raphe magnus modulates hypoxia-induced hyperventilation but not anapnoea in rats / L.H. Gargaglioni, N.C. Coimbra, L.G.S. Branco // *Neurosci. Lett.* – 2003. – 347(2) – P. 121-125.
- [10] Forebrain projections of the rostral nucleus raphe magnus shown by iontophoretic application of cholera toxin b in rats / D.M. Hermann [et. al.] // *Neurosci. Lett.* – 1996. – 216 – P.151-154.
- [11] Hodges, M.R. Transient attenuation of CO₂ sensitivity after neurotoxic lesions in the medullary raphe area of awake goats / M.R. Hodges, C. Opansky, B. Qian // *Journal of Applied Physiology.* – 2004. – 97(6) – P. 2303 – 2309.
- [12] Hornung, J-P. The human raphe nuclei and the serotonergic system / J-P. Hornung // *Journal of Chemical Neuroanatomy.* – 2003. – 26(4) – P. 331-343.
- [13] Inyushkin, A.N. Central respiratory effects of TRH in ultra-low doses / A.N. Inyushkin, S.A. Chepurinov // *Neuropeptides.* – 1993. – 24(4) – P. 216.
- [14] Lalley, P.M. Serotonergic and non-serotonergic responses of phrenic motoneurons to raphe stimulation in the cat / P.M. Lalley // *J. Physiol.* – 1986. – 380 – P. 373 – 385.
- [15] Distributed actions and dynamic associations in respiratory-related neuronal assemblies of the ventrolateral medulla and brain stem midline: evidence from spike train analysis / B.G. Lindsey [et. al.] // *J. Neurophysiol.* – 1994. – 72(4) – P. 1830-1851.
- [16] Messier, M.L. Inhibition of medullary raphe neurons has age-dependent effects on the CO₂ response in newborn piglets / M.L. Messier, A. Li, E.E. Nattie // *Journal of Applied Physiology.* – 2004. – 96 – P.1909 – 1919.
- [17] Depressant effect of raphe stimulation on inspiratory activity of the hypoglossal nerve: in vitro study in the newborn rat / D. Morin [et. al.] // *Neurosci. Lett.* – 1990. – 116(3) – P.299-303.
- [18] Nucci, T.B. Nitric oxide pathway in the nucleus raphe magnus modulates hypoxic ventilatory response but not anapnoea in rats / T.B. Nucci, L.G.S. Branco, L.H. Gargaglioni // *Brain Research.* – 2004. – 1017 – P. 39 – 45.
- [19] Ribas-Salgueiro, J.L. Characterization of efferent projections of chemosensitive neurons in the caudal parapyramidal area of the rat brain / J.L. Ribas-Salgueiro, S.P. Gaytan, J. Ribas // *Brain Research Bulletin.* – 2005. – 66 – P. 235 – 248.
- [20] Richerson, G.B. Chemosensitivity of serotonergic neurons in the rostral ventral medulla / G.B. Richerson, W. Wang, J. Tiwari // *Respiration Physiology.* – 2001. – 129(1-2) – P. 175-189.
- [21] Sim, L.J. Efferent projections of the nucleus raphe magnus / L.J. Sim, S.A. Joseph // *Brain Res. Bull.* – 1992. – 28(5) – P. 679-682.
- [22] Taylor, N.C. Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats / N.C. Taylor, A. Li, E.E. Nattie // *J. Physiol.* – 2005. – 566(2) – P. 543-557.

- [23] Verner, T.A. A mapping study of cardiorespiratory responses to chemical stimulation of the midline medulla oblongata in ventilated and freely breathing rats / T.A. Verner, A.K. Goodchild, P.M. Pilowsky // *J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – 287 – P. 411-421.
- [24] Wang, W. Quantification of the response of rat medullary raphe neurones to independent changes in pH and PCO₂ / W. Wang, S.R. Bradley, G.B. Richerson // *J. Physiol.* – 2002. – 540(3) – P. 951-970.

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

RESPIRATORY RESPONSES TO ELECTRICAL STIMULATION OF THE RAPHE MAGNUS NUCLEUS IN RATS

© 2007 A.O. Orlova, A.N. Inyushkin²

In acute experiments on anesthetized rats the dependence of the responses of inspiratory muscles and pattern of breathing on coordinates and parameters of local electrical stimulation of the raphe magnus nucleus are studied. Both an inhibitory effect on tidal volume and inspiratory activity, and a stimulatory effect on respiratory frequency and timing parameters are demonstrated.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

² Orlova Anastasia Olegovna, Inyushkin Alexey Nikolaevich, Dept. of Human and Animals Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.